

**Determinación de la cinética de los subtipos de anticuerpos anti SARS-CoV-2 en pacientes del Ecuador,
mediante una prueba de ELISA, utilizando la proteína Spike recombinante como antígeno**

Sarango Díaz, Jordan Alexis

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Ph.D. Reyna Bello, Armando

04 de marzo del 2022

Reporte de verificación de contenido



4CLTesis Final-Jordan-Sarango - copia.pdf

Scanned on: 20:29 March 2, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	426
Words with Minor Changes	0
Paraphrased Words	0
Omitted Words	2095

Firma:

**ARMANDO
REYNA BELLO**

Firmado digitalmente por ARMANDO
REYNA BELLO
Nombre de reconocimiento (DN): c=EC,
o=SECURITY DATA S.A. 1, ou=ENTIDAD DE
CERTIFICACION DE INFORMACION,
serialNumber=290620182334,
cn=ARMANDO REYNA BELLO
Fecha: 2022.03.04 13:43:32 -05'00'

Armando Reyna Bello, Ph.D.

C. C.: 1758891830

Director de proyecto de Investigación



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, **“Determinación de la cinética de los subtipos de anticuerpos anti SARS-CoV-2 en pacientes del Ecuador, mediante una prueba de ELISA, utilizando la proteína Spike recombinante como antígeno”** fue realizado por el señor Sarango Díaz, Jordan Alexis el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 04 de Marzo de 2022

Firma:

**ARMANDO
REYNA BELLO**

Firmado digitalmente por ARMANDO REYNA BELLO
 Nombre de reconocimiento (DN): cn=EC, o=SECURITY
 DATA S.A. 1, ou=ENTIDAD DE CERTIFICACION DE
 INFORMACION, serialNumber=290620182334,
 cn=ARMANDO REYNA BELLO
 Fecha: 2022.03.04 13:43:53 -05'00'

Armando Reyna Bello, Ph.D.

C. C.: 1758891830

Director de proyecto de Investigación



**DEPARTAMENTO DECIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo **Sarango Díaz, Jordan Alexis**, con cédula de ciudadanía n°2300337587, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Determinación de la cinética de los subtipos de anticuerpos anti SARS-CoV-2 en pacientes del Ecuador, mediante una prueba de ELISA, utilizando la proteína Spike recombinante como antígeno”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 04 de marzo de 2022

Firma

.....
Sarango Díaz, Jordan Alexis
C.C.: 2300337587



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo **Sarango Díaz, Jordan Alexis**, con cédula de ciudadanía n° 2300337587, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Determinación de la cinética de los subtipos de anticuerpos anti SARS-CoV-2 en pacientes del Ecuador, mediante una prueba de ELISA, utilizando la proteína Spike recombinante como antígeno”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 04 de marzo de 2022

Firma

.....
Sarango Díaz, Jordan Alexis
C.C.: 2300337587

Dedicatoria

Dedico el presente trabajo a mi familia, a mi madre quien con su apoyo incondicional me ha ayudado a mantenerme firme y seguir adelante con mis estudios. También a mi padre por su esfuerzo en ayudarme en todo lo que he necesitado. A Alisson Pérez, por estar apoyándome, motivándome y recordándome que puedo lograr cosas grandes si me lo propongo y me dedico. Y especialmente a Jordan Sarango quien de alguna u otra forma no se rindió en todo el trayecto y que por más dificultades que se le presentaron no se rindió, siguió avanzando.

Agradecimiento

A Laboratorios Zurita & Zurita quienes brindaron apoyo a esta esta tesis donando reactivos indispensables para el desarrollo de la tesis.

A Armando Reyna, quien me dio la confianza para realizar este trabajo. Quien además de ser un excelente y excepcional docente, es una gran persona y gran amigo, empedernido del método científico, de quien aprendí bastante durante la carrera universitaria. Que sin su tutela no hubiera sacado en adelante esta tesis.

A Vanessa Armijos y Katty Medina quienes estuvieron siempre al pendiente de lo que se necesitara en el laboratorio.

A Natasha Baer, Pedro Puente, Paola Proaño, Pablo Álvarez, Santiago Ulloa, Sandra Naranjo, docentes a quien los agradecimientos siempre les quedarán cortos. Por su excelente manera de enseñar dentro y fuera del aula de clase. Un ejemplo de personas.

A Harrison Delgado, Brandon Cusme, Jorge Alvear, Jorge Cueva, Carlos Estrella, Jhonny Maldonado y Stalyn Cunalata, amigos sin los cuales la Universidad no hubiese sido lo mismo, le agradezco por estar aportando siempre buenas cosas y también por los grandes lotes de felicidad y emociones que hemos pasado.

A Angela Verduga, Jessica Lapo, Kevin Cando, Boris Torres, Jairo Cueva y Joel Campos, Les agradezco por compañerismo , amistad y apoyo moral que me han brindado dentro y fuera de la Universidad.

A Mateo Botero, Génesis Dela y Hugo Andrade, personas indispensables en toda mi carrera Universitaria, siempre dispuestos a brindarme la mano cuando lo necesitaba. Son personas brillantes, con una capacidad intelectual envidiable. Siempre les estaré agradecido.

A mis Tíos Robin, Ercio, Yovin, Telmo, al igual que mis primas Enith y Daira, quienes siempre estuvieron al pendiente y apoyándome incondicionalmente para que yo culminara la carrera Universitaria.

A Alisson Pérez, quien ha estado conmigo apoyándome, motivándome , ayudándome a ver que puedo superarme cada día, por estar al pendiente de mí a que haga las cosas de la mejor manera. Tú ayuda a sido fundamental, y lo agradezco muchísimo...

A mi familia, especialmente a mi mamá y mi papá, quienes siempre se esforzaron para brindarme todo lo necesario para yo cumplir con este trabajo.

Índice de contenidos

Caratula	1
Reporte de verificación de contenido	2
Responsabilidad de Autoría.....	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimiento	7
Índice de contenidos.....	9
Listado de Tablas	12
Listado de figuras.....	13
Listado de abreviaturas.....	14
Resumen.....	15
Abstract	16
Capítulo I: Introducción.....	17
Formulación del Problema	17
Justificación del problema.....	19
Objetivos de la Investigación.....	21
Objetivo General.....	21

Objetivos Específicos.....	21
Capítulo II: Marco teórico	22
SARS-CoV-2 Generalidades.....	22
Virología del SARS-CoV-2	23
Genoma del SARS-CoV-2	26
Proteína S	28
Proteína de nucleocápside (N)	28
Proteína E	29
Epidemiología	31
Transmisión del SARS-CoV-2	31
Patogénesis del SARS-CoV-2 Signos Clínicos	31
Respuesta inmune a la infección por SARS-Cov-2	32
Técnicas de Diagnóstico	35
ELISA indirecto contra proteína RBD	37
Hipótesis.....	38
Capítulo III: Materiales y métodos.....	39
Obtención de las muestras.....	39
Reactivos específicos	40
Reactivos específicos	40

Estandarización de la técnica de ELISA indirecto para determinar anticuerpos	41
Determinación del punto de corte del ELISA.....	44
Diseño experimental.....	45
Análisis funcional	45
Capítulo IV: Resultados	46
Diferencias entre las diluciones de suero usando el protocolo 1	46
Diluciones del Conjugado anticuerpo secundario de cabra Anti IgG humana-conjugada con HRP	48
Soluciones de Boqueo (BSA o Soya).....	50
Diluciones de Antígeno (RBD).....	52
Determinación de la Línea de corte del ELISA estandarizado	54
Resultados de D.O de muestras positivas y negativas siguiendo los parámetros del protocolo número 4.....	55
Evaluación de la cinética de anticuerpos, en pacientes con varias dosis de vacunas, diferentes tipos de vacunas y vacunados que se contagiaron del SARS-CoV-2.....	56
Capítulo V: Discusión	60
Capítulo VI: Conclusiones.....	65
Capítulo VII: Recomendaciones	67
Capitulo VIII: Bibliografía.....	68

Listado de Tablas

Tabla 1. <i>Pruebas de detección del SARS-CoV-2</i>	35
Tabla 2. <i>Tabla resumen de los diferentes protocolos usados en la estandarización del ELISA para detectar anticuerpos anti SARS-CoV-2</i>	43
Tabla 3. <i>Análisis de Varianza para diluciones de suero</i>	46
Tabla 4. <i>Resultados de la prueba de significancia - Análisis Tukey ($P>0,05$) de diluciones de sueros</i>	47
Tabla 5. <i>ANOVA de diluciones de Conjugado</i>	48
Tabla 6. <i>Resultados prueba de significancia - Análisis Tukey ($P>0,05$) de diluciones del Conjugado</i>	49
Tabla 7. <i>ANOVA de Soluciones de Bloqueo</i>	50
Tabla 8. <i>Resultados prueba de significancia - Análisis Tukey ($P>0,05$) de diluciones de Bloqueo</i> .	51
Tabla 9. <i>ANOVA de Concentración de Antígeno</i>	52
Tabla 10. <i>Resultados prueba de significancia - Análisis Tukey ($P>0,05$) de diluciones de Bloqueo</i>	53

Listado de figuras

Figura 1. Cuadro del ciclo replicativo del SARS-Cov-2.....	25
Figura 2. <i>Estructura del genoma del SARS-CoV-2</i>	27
Figura 3. <i>Representación esquemática de la estructura de la proteína S.</i>	30
Figura 4. <i>Representación esquemática de la respuesta inmune contra el SARS-CoV-2.</i>	34
Figura 5. <i>Diferencia entre diluciones de sueros humanos positivos y negativos</i>	48
Figura 6. <i>Gráfico de diluciones Conjugado</i>	50
Figura 7. <i>Gráfico de diluciones de Bloqueo</i>	51
Figura 8. <i>Gráfico de diferencia de Densidad Óptica a diferentes concentraciones de antígeno</i> ...	53
Figura 9. <i>Determinación del Cut off</i>	54
Figura 10. <i>Gráfico de la DO de muestras positivas y negativas.</i>	55
Figura 11. <i>Cinética de anticuerpos Paciente 1</i>	57
Figura 12. <i>Cinética de anticuerpos Paciente 2</i>	58
Figura 13. <i>Cinética de anticuerpos Paciente 3</i>	59

Listado de abreviaturas

ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
PBS	solución salina tamponada con fosfato
BSA	Albúmina Bobina Sérica
OPD	Diclorhidrato de o-fenilendiamina
PBS-T	PBS – Tween 20 (0,1%v/v)
PBS-T/BSA	Solución de Bloqueo con BSA
PBS-T/L	Solución de Bloqueo con Leche de Soya
Ag	Antígeno
Ac	Anticuerpo
DO	Densidad Óptica
DS	Desviación Estandar
RBD	Receptor-binding domain
ORF	Marcos de lectura abiertos
Min	Minutos
H	Horas
HRP	Peroxidasa de rábano picante
mL	Mililitro
uL	Microlitros
ug	Microgramo

Resumen

La pandemia del síndrome respiratorio agudo severo causada por un coronavirus denominado (SARS-CoV-2), desafió los sistemas nacionales de salud y la economía mundial. El eje central para su control está constituido en el seguimiento de las tasas de infección y la seroprevalencia. El presente trabajo se da a costa de la actual situación sanitaria que enfrenta el país y el mundo en general. Si bien existen estimaciones de la gravedad de la enfermedad, sigue habiendo una gran laguna de conocimiento. Es así que el presente proyecto está elaborado con la finalidad de mejorar o incrementar el diagnóstico serológico de la COVID 19, para lo cual se espera utilizar la proteína S (fragmento RBD) (donada por la Division of Infectious Diseases and Vaccinology, School of Public Health, University of California, Berkeley) como antígeno en una prueba de ELISA indirecto. Para la estandarización del ensayo, se evaluó la mejor dilución de suero, usando Buffer PBS-Tween 20, diluciones a partir de 1/50, 1/100, 1/200 hasta 1/6400. Posteriormente se evaluaron diluciones de conjugado (1/6000, 1/8000, 1/10000, 1/12000 en Buffer PBS-Tween 20 y además, diferente concentración del antígeno (0.625µg/mL, 1.25µg/mL, 2.5µg/mL) diluido en PBS 1X, frente a sueros positivos y negativos, para determinar bajo que condición la razón entre ellos es mayor se usó un modelo estadístico DCA para determinar la significancia , lo que resultó en la distinción de las mejores condiciones; suero 1/100, conjugado 1/10000, antígeno 2.5µg/mL. Se logró establecer un protocolo para un ELISA fácil de realizar y robusto y para la detección de respuestas de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 dirigidos a la proteína RBD del virus.

Palabras Clave

- **RBD**
- **SARS-COV-2**
- **ELISA**

Abstract

The SARS pandemic caused by a coronavirus (SARS-CoV-2) has challenged national health systems and the world economy. The central axis for its control is constituted in the monitoring of infection rates and seroprevalence. The present work is given at the expense of the current health situation facing the country and the world in general. Although there are estimates of the severity of the disease, there is still a large knowledge gap. Thus, the present project is designed to improve or increase the serological diagnosis of COVID 19, for which the protein S (RBD fragment) (donated by the Division of Infectious Diseases and Vaccinology, School of Public Health, University of California, Berkeley) is expected to be used as an antigen in an indirect ELISA test. For assay standardization, the best serum dilution was evaluated, using PBS-Tween 20 Buffer, dilutions from 1/50, 1/100, 1/200 to 1/6400. Subsequently, dilutions of conjugate were evaluated (1/6000, 1/8000, 1/10000, 1/12000 in Buffer PBS-Tween 20 and in addition, different concentration of the antigen (0.625µg/mL, 1.25µg/mL, 2.5µg/mL) diluted in PBS 1X, against positive and negative sera, to determine under which condition the ratio between them is higher, a DCA statistical model was used to determine the significance, which resulted in the distinction of the best conditions; serum 1/100, conjugate 1/10000, antigen 2.5µg/mL. A protocol for an easy to perform and robust ELISA and for the detection of anti-SARS-CoV-2 antibody responses directed to the RBD protein of the virus was established.

Key Words

- RBD
- SARS-COV-2
- ELISA

Capítulo I: Introducción

Formulación del Problema

El actual coronavirus 2, relacionado con el síndrome respiratorio agudo severo y causante de la actual pandemia de SARS-CoV-2, es una emergencia de salud pública de importancia internacional. Es por ello, se hace indispensable contar con herramientas de diagnóstico sensibles y precisas (Krähling et al., 2021a).

El presente trabajo, viene dado a costa de la actual situación sanitaria que enfrenta el país y el mundo en general por la pandemia del SARS-Cov-2. Si bien existen estimaciones de la gravedad de la enfermedad, sigue habiendo una gran laguna de conocimiento, porque las infecciones leves o asintomáticas son difíciles de estimar. Es así que el presente trabajo está elaborado con la finalidad de mejorar o incrementar el diagnóstico serológico de la COVID 19, para lo cual se estandarizó un ELISA indirecto utilizando la proteína S (fragmento RBD).

Dado el rápido desarrollo de alternativas diagnósticas para detectar y diagnosticar la infección por SARS-CoV-2 y sus variantes asociadas, hay muchas opciones disponibles para diagnosticar la infección. Múltiples compañías de diagnóstico establecidas, ahora brindan alternativas diferentes de diagnóstico de la enfermedad, mientras que inicialmente, las pruebas se realizaban solamente era las qPCR.

En el tiempo, se han continuado desarrollando plataformas de prueba adicionales, incluidas aquellas pruebas de anticuerpos que se utilizan en ensayos de flujo lateral. Las pruebas

de anticuerpos también pueden diseñarse para detectar la presencia de anticuerpos neutralizantes que pueden prevenir la entrada del virus a través de la unión directa a la proteína S RBD (Ejazi et al., 2021)

Justificación del problema

La pandemia de COVID-19 es una crisis de salud mundial desafiante que afecta a los sectores social y económico, por ello se han desarrollado varios enfoques de diagnóstico para la COVID-19. Una de las estrategias por las cuales se optó fue la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (RT-qPCR) es el ensayo de base molecular que se utiliza en todo el mundo para detectar el ARN del SARS-CoV-2 (Sule & Oluwayelu, 2020). Una de las valiosas ventajas de la RT-qPCR es la facilidad con la que se puede cuantificar el ARN en general y la carga viral en particular, si se establecen los parámetros de ensayo adecuados y se incluyen los controles apropiados. Sin embargo, la prueba es costosa, requiere equipos específicos de qPCR, demanda mucha mano de obra, además, la recolección tardía de muestras, los suministros limitados y los requisitos estrictos para los entornos de laboratorio pueden retrasar un diagnóstico preciso (Fuchs Wightman et al., 2021). Estos problemas, combinados con el aumento drástico de los casos de contagio podría derivar en casos no detectados, en pacientes que no reciban tratamientos adecuados y aumentar el riesgo de propagación de la infección entre una población más grande.

Es por ello que estandarizar el ELISA es importante ya que las pruebas de anticuerpos se usan con frecuencia en el diagnóstico de infecciones virales, especialmente como una opción de menor costo para detectar infecciones virales crónicas. Esto es debido a que el ELISA puede detectar anticuerpos contra proteínas virales o también neutralizantes específicos contra el dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína S. Las utilidades potenciales de las pruebas de anticuerpos son numerosas. Pueden facilitar la detección de SARS-CoV-2 en pacientes después de

dos semanas de haberse infectados o con cargas virales muy bajas por debajo del límite de detección de los ensayos moleculares (Ejazi et al., 2021).

La prueba de anticuerpos específicos de SARS-CoV-2 es una buena opción para el diagnóstico rápido, simple y altamente sensible de COVID-19. Es así, que en el presente trabajo permitirá estandarizar un ELISA indirecto utilizando la proteína S (fragmento RBD) recombinante.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Determinar de la cinética de los subtipos de anticuerpos anti SARS-CoV-2 en pacientes del Ecuador, mediante una prueba de ELISA, utilizando la proteína Spike recombinante como antígeno .

Objetivos Específicos

- Realizar la recolección de muestras sanguíneas a personas debidamente informadas del proyecto que participen de forma voluntaria.
- Determinar la mayor razón entre sueros positivos y negativos
- Determinar el punto de corte (cut off) para cada grupo de muestras a ser analizadas

Capítulo II: Marco teórico

SARS-CoV-2 Generalidades

Las enfermedades infecciosas emergentes están ocurriendo con una frecuencia cada vez mayor en todo el mundo, lo que tiene un profundo impacto en la salud pública. En las últimas dos décadas surgieron dos coronavirus altamente patógenos y transmisibles, que causan enfermedades respiratorias graves: el síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 1 (SARS-CoV-1, en 2002) y el síndrome respiratorio de Oriente Medio coronavirus (MERS-CoV, en 2012) (Artese et al., 2020). Estos dos virus habían causado más de 10.000 casos acumulados, con tasas de mortalidad del 10 % para el SARS-CoV-1 y del 34,4 % para el MERS-CoV, lo que representa la primera amenaza mundial del siglo XXI.

Los coronavirus son agentes infecciosos recurrentes en animales y humanos. En los seres humanos, producen desde resfriados comunes (HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-HKU1 y Beta-CoV1), hasta las enfermedades graves como SARS y MERS. Los coronavirus son virus de ARN monocatenario no segmentado de sentido positivo de aproximadamente treinta mil nucleótidos (Santos-López et al., 2021a). Por medio de microscopía electrónica se observó que su forma es redondeada con espículas ubicadas en una estructura superficial parecida a una corona solar, derivando de ahí su nombre (Santos-López et al., 2021a)

Virología del SARS-CoV-2

Los coronavirus pueden infectar a una amplia gama de vertebrados, dentro de estos se encuentran murciélagos, pájaros, pangolines, serpientes, ratones y humanos. Debido a las similitudes de secuencia con las cepas de coronavirus de murciélago y pangolín RaTG13, actualmente el SARS-CoV-2 se infiere que es de origen zoonótico y ha adquirido secundariamente la capacidad de propagación de persona a persona (Asselah et al., 2021)

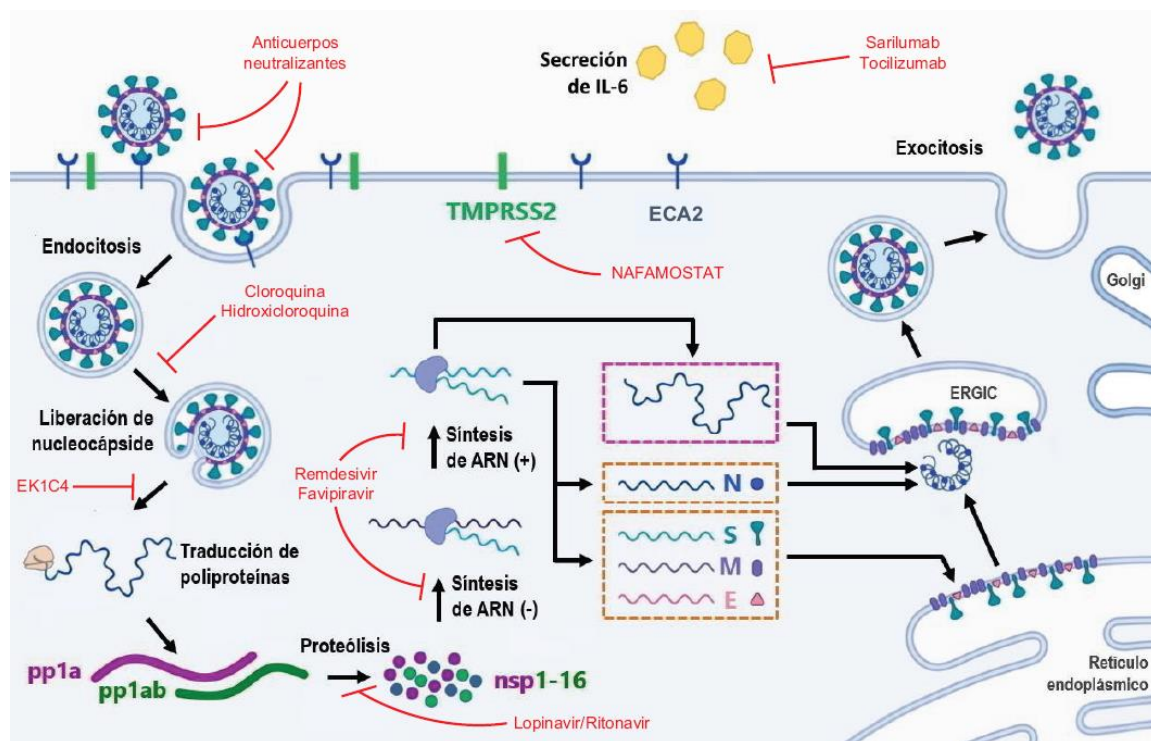
El virus se une a la célula hospedera mediante la unión de la proteína S con su receptor ECA2, esta última proteína se encuentra en mayor cantidad en el tejido respiratorio alto, como el epitelio nasal y oral, hasta el bajo, principalmente en los alveolos pulmonares .

Se ha definido que una proteína del hospedero, la serina proteasa transmembranal 2 (TMPRSS2), también tiene un papel en la entrada del virus a las células, ya que activa la proteína S. permitiéndole al virus ingresa mediante endocitosis a la célula (Hoffmann et al., 2020). Después de la interacción con el receptor, hay un cambio conformacional en la proteína S, lo que origina la fusión de las membranas viral y endosómica. Posterior a la liberación de la nucleocápside en el citoplasma, ocurre la traducción ribosomal del ARN genómico viral originándose la poliproteína pp1a (Santos-López et al., 2021b). Por un desplazamiento del marco de lectura (ribosomal frameshift) al final del código de la proteína pp1a, el marco de lectura se alarga para generar la poliproteína pp1ab. Estas poliproteínas son asimiladas por las proteasas virales PLpro y 3CLpro para producir 16 proteínas no estructurales con funciones enzimáticas y que intervienen en la síntesis del ARN viral y en el procesamiento proteolítico. Ciertas proteínas forman un complejo que se encarga de la sintetizar el genoma viral y los segmentos de ARN subgenómico que dan inicio a las proteínas estructurales que se sintetizan en los ribosomas asociados al retículo endoplasmático (Park, 2020).

Posteriormente, los productos virales se unen en el compartimiento intermedio del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi, donde los genes interrelacionan con la nucleoproteína para formar la nucleocápside y los otros elementos estructurales. Por último, el componente viral toma forma de vesícula en la membrana plasmática, para que posteriormente por exocitosis los nuevos viriones salgan de la célula (Santos-López et al., 2021b). Los pasos de este proceso se observan en la figura 1

Figura 1.

Cuadro del ciclo replicativo del SARS-Cov-2



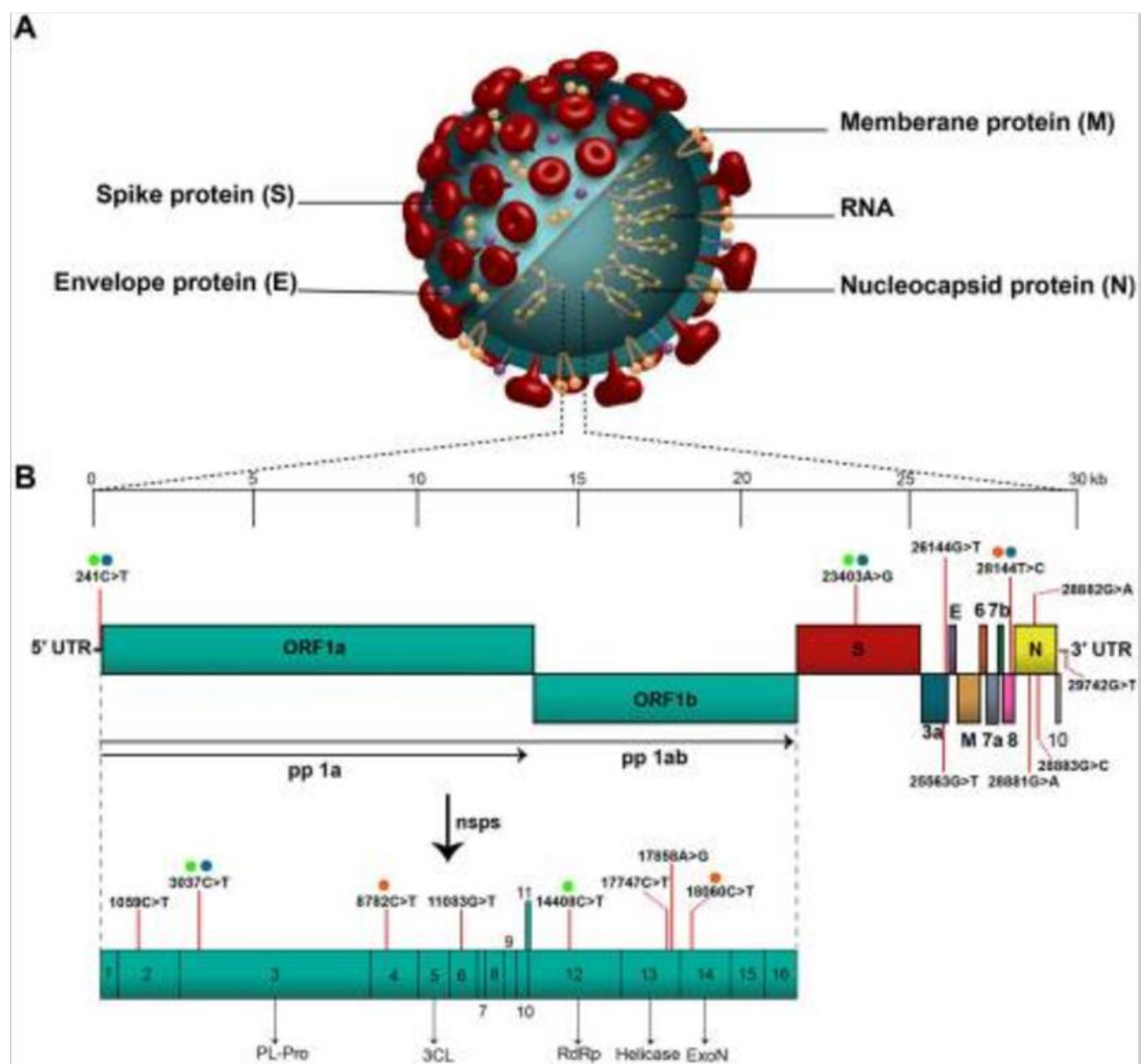
Nota: El gráfico representa ciclo replicativo de los coronavirus. Creado en parte con BioRender.com, con información de (Fehr & Perlman, 2015a) y (Lim et al., 2016)

Genoma del SARS-CoV-2

El virus SARS-CoV-2 pertenece a los β -coronavirus (β -CoV); esta familia comprende virus de ARN monocatenario de sentido positivo, no segmentado y envuelto, con una estructura de caperuza en 5' y una cola poli-A en 3', lo que permite desenvolverse como un ARNm para la traducción de las poliproteínas replicasa (Fehr & Perlman, 2015b). El genoma completo de los β -CoV codifica varias proteínas no estructurales y cuatro estructurales, incluida la espiga (S), la envoltura (E), la membrana (M) y la nucleocápside (N) (Cui et al., 2019; Ruan et al., 2003). Entre los virus de ARN conocidos, los coronavirus de ARN monocatenario y de sentido positivo, tienen con un contenido de GC que oscila entre el 32 % y el 43 % (Masters, 2006; Woo et al., 2010). Las secuencias genómicas del SARS-CoV-2 presentan una longitud diversa de 29,8 kb a 29,9 kb con 12 marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican 27 proteínas (Chan et al., 2020; Wu et al., 2020). La organización genómica incluye 5'- secuencia líder- ORF1/ab- S- ORF3a- E- M- ORF6a- ORF7a- ORF7b- ORF8- N- ORF10-3' de izquierda a derecha y carece del gen de la hemaglutinina-esterasa que se detecta en algunos β -CoV. Una serie de secuencias reguladoras de la transcripción (TRS) está situada en la unión entre cada uno de estos ORF, así como en el extremo 5' del ARN genómico aguas abajo de la secuencia líder de β -CoV. Alrededor de dos tercios del ARN del SARS-CoV-2 comprende la región ORF1a/b, que con 16 proteínas no estructurales (nsp1-16) se considera el ORF más grande. El tercio restante del genoma cerca del extremo 3' contiene ORF que codifican proteínas estructurales y accesorias (Cui et al., 2019).

Figura 2.

Estructura del genoma del SARS-CoV-2



Nota: El gráfico es una representación esquemática de la estructura y organización del genoma del SARS-CoV-2 . Tomado de Rahimi et al., (2021)

Proteína S

La glicoproteína espiga homotrimérica (proteína S), que sobresale de la superficie viral, es el primer punto de anclaje del virus a la célula huésped. La proteína S del SARS-CoV-2 comparte aproximadamente un 77 % de identidad de secuencia con la proteína S del SARS-CoV. (Wang et al., 2020). La proteína S (figura 3) tiene dos subunidades principales, S1 y S2. La subunidad S1 distal juega un papel en el reconocimiento y la unión del receptor, mientras que la subunidad S2 anclada a la membrana media la fusión de las membranas viral y de la célula huésped. La subunidad S2 existe en dos conformaciones estructuralmente distintas, prefusión y posfusión. La subunidad S1 tiene dos dominios estructurales bien definidos, el dominio de unión al receptor (RBD) y el dominio similar a la galectina N-terminal (S-NTD) (Arya et al., 2021).

Proteína de nucleocápside (N)

Es una proteína estructural importante que empaqueta el ARN viral en la ribonucleocápside helicoidal (RNP) e interactúa con otras proteínas estructurales durante el ensamblaje de los viriones, lo que lleva a la encapsidación del genoma (Chang et al., 2013) . La proteína N se produce en gran abundancia durante la infección y es altamente inmunogénica, por lo que es un objetivo potente para el desarrollo de vacunas (Padron-Regalado, 2020).

La proteína N del SARS-CoV-2 consta de dos dominios altamente conservados: el dominio de unión al ARN N-terminal (N-NTD; 46–174) y el dominio de dimerización C-terminal (N-CTD; 247–364) (Kang et al., 2020; Ye et al., 2020) separados por una región conectora intrínsecamente desordenada y altamente fosforilada, rica en serina/arginina. Los extremos N- y C-terminales de la proteína están desordenados (Kang et al., 2020).

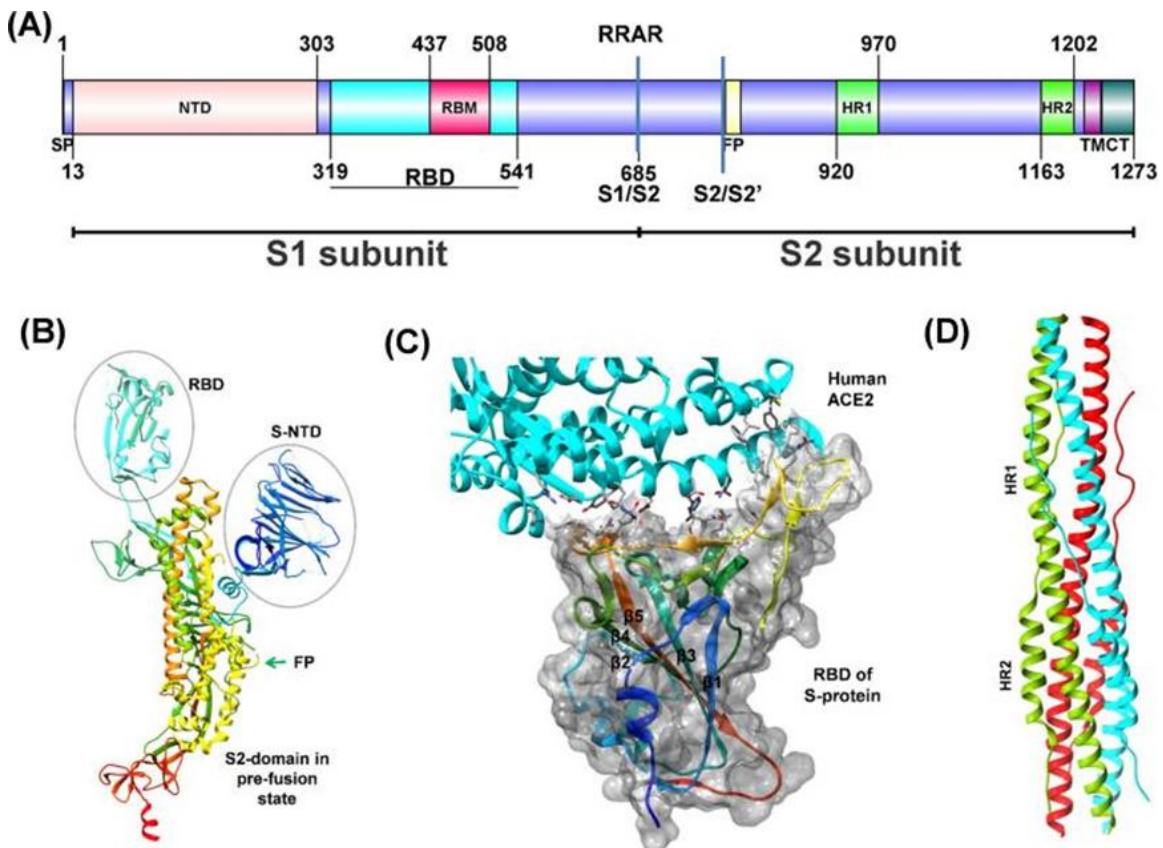
Proteína E

La proteína E del SARS-CoV-2 es la proteína estructural transmembrana más pequeña de 75 aminoácidos que comprende tres dominios: un ectodominio hidrofílico N-terminal, un dominio transmembrana hidrofóbico (TMD) seguido de un endodominio C-terminal hidrofílico largo. La estructura de RMN reciente de TMD de la proteína E del SARS-CoV-2 mostró un haz de hélice pentamérica que rodea un poro central hidrofílico catiónico estrecho, similar a las vioporinas (Mandala et al., 2020).

Los últimos cuatro aminoácidos (DLLV) de la proteína E están implicados en su interacción con proteínas asociadas a la unión del huésped (PALS1 y sintenina) que pueden facilitar la diseminación viral. Este evento junto con la actividad de vioporinas de la proteína E se proponen para inducir la tormenta de citoquinas. Los CoV recombinantes que carecen de proteína E muestran títulos virales reducidos, maduración viral alterada y propagación viral incompetente y, por lo tanto, se ha sugerido como un buen candidato a vacuna (Sarkar & Saha, 2020).

Figura 3.

Representación esquemática de la estructura de la proteína S.



Nota: El gráfico representa el dominio N-terminal (NTD), dominio de unión al receptor (RBD), motivo de unión al receptor (RBM), el monómero de la proteína S en la conformación abierta (PDB ID: 6VYB) con dominios marcados . Tomado de Structural insights into SARS-CoV-2 proteins, por Arya et al., (2021)

Epidemiología

Transmisión del SARS-CoV-2

Esta es una proteína considerada altamente antigénica, además de iniciar una buena respuesta de células T tras ser bien expresada en células presentadoras de antígenos(Rump et al., 2021). Por otra parte reportes indican que en otros tipos de coronavirus como el coronavirus de Turquía, el coronavirus murino y el coronavirus porcino, este es un antígeno bastante potente(Timani et al., 2004). Otros análisis como los de la Figura 5, muestran gran antigenicidad ante anticuerpos IgG, IgA e IgM, permitiendo confirmar que este es un buen candidato para el diagnóstico de la enfermedad en los pacientes(Zeng et al., 2020), además que la proteína N se mantiene en total expresión durante la infección(Timani et al., 2004), generando que los anticuerpos contra dicha proteína tengan una duración de hasta 52 semanas tras no presentar síntomas de la enfermedad(Rump et al., 2021).

Patogénesis del SARS-CoV-2 Signos Clínicos

Los CoV del resfriado común tienden a causar síntomas leves originando procesos inflamatorios en la cavidad nasal, oral, faringe y laringe y afectación gastrointestinal ocasional. Por el contrario, la infección por CoV altamente patógenos, incluido el SARS-CoV-2, causa síntomas similares a los de la gripe que pueden progresar a dificultad respiratoria aguda (SDRA), neumonía, insuficiencia renal y muerte. Los síntomas más comunes son fiebre, tos y disnea (Harrison et al., 2020b).

La COVID-19 se presenta inicialmente con síntomas parecidos a los de la 'gripe' y luego puede progresar a una inflamación sistémica potencialmente mortal y disfunción multiorgánica. El período de incubación en COVID-19 es de aproximadamente 5 a 6 días. A medida que avanza

la pandemia, se ha vuelto cada vez más claro que la COVID-19 engloba no solo enfermedades respiratorias/gastrointestinales, sino que también puede tener derivaciones a largo plazo, como la inflamación del miocardio (Puntmann et al., 2020).

Hoy día ha avanzado nuestro conocimiento sobre la COVID-19, sabemos que no se limita a la población anciana como se informó inicialmente, dado que los niños y los adultos jóvenes también están en riesgo de sufrir la faceta más grave de la enfermedad (Chao et al., 2020).

Respuesta inmune a la infección por SARS-Cov-2

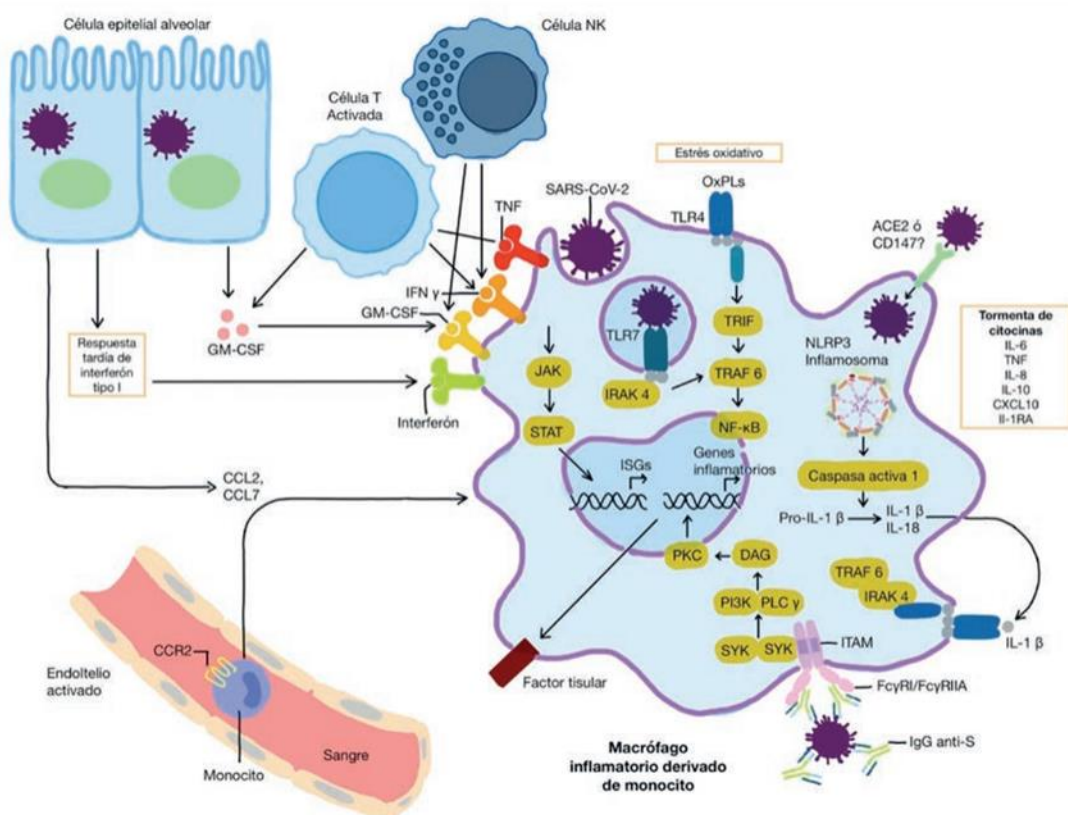
La infección por SARS-CoV-2 inicia en las células epiteliales en las vías respiratorias, células epiteliales alveolares, células endoteliales y macrófagos alveolares, ya que todos estos tipos celulares presentan en común el receptor ACE2, principal mecanismo de infección (Tay et al., 2020). El virus se replicará en estas células, las cuales se estresarán o serán destruidas, lo que permite, por un lado, la amplificación del ciclo viral y su transmisión a otras células adyacentes y, por otro lado, la generación de distintas señales de alarma. Estos signos, son detectados por mecanismos defensivos humorales tales como son las células dendríticas, macrófagos, mastocitos, natural killer (NK), entre otros (Sanz et al., 2021).

En el periodo inicial de la infección por SARS-CoV-2 se da la presencia de linfocitos T de memoria y anticuerpos inducidos producidos por células B plasmáticas, mismos que resultan indispensables para una eliminación rápido del virus. La presencia del virus o de células contiguas infectadas activan in situ a los macrófagos alveolares, lo que produce la liberación de citocinas proinflamatorias como la IL-6, IL-8, IL- β , factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Merad & Martin, 2020). Otros mecanismos inmunológicos como la activación de los mastocitos son encargados de liberar histaminas, el complemento que produce anafilotoxinas C3a y C5a o anticuerpos naturales o inducidos, de forma simultánea en la activación de los endotelios. Esto se deriva en un

reclutamiento de células inmigrantes y la amplificación de la inflamación inicial (Lozada-Requena & Ponce, 2020). Las primeras células que se filtran son los monocitos y los neutrófilos, siendo los monocitos rápidamente diferenciados a macrófagos, que reemplazarán a los macrófagos alveolares y a células dendríticas, estableciendo en el tejido respiratorio nuevas células inmunes. Las células presentadoras de antígeno, como las células dendríticas, recogerán partículas del virus, madurarán y migrarán a los órganos linfoides secundarios (OLS) más cercanos, donde podrán activar a linfocitos T colaboradores (Th) y citotóxicos (Tc) específicos del virus, que proliferarán y serán reclutados entre 6 y 10 días después al epitelio alveolar inflamado, donde se encargarán de dirigir una respuesta defensiva mucho más contundente, liberando grandes cantidades de citocinas y por ello produciendo la muerte de las células infectadas. Juntamente, las células T cooperadoras foliculares (Tfh) colaboran con las células B en los OLS, previamente activadas por el virus, produciendo un cambio de isotipo e hipermutación somática y elaborando anticuerpos más específicos frente al virus (Tay et al., 2020). En la figura 4 se describe de manera más gráfica la respuesta inmune contra el SARS-CoV-2.

Figura 4.

Representación esquemática de la respuesta inmune contra el SARS-CoV-2.



Nota: El gráfico representa la respuesta inmune contra el SARS-CoV-2. Modificado de (Merad & Martin, 2020)

Técnicas de Diagnóstico

Según el informe de la OMS, (2020) el diagnóstico de laboratorio de infección por SARS-CoV-2 resulta de gran ayuda para la atención clínica y el control de contagios. La finalidad de las pruebas diagnósticas permite la detección del virus (detección de ARN viral o de antígenos virales) o la detección de la respuesta inmunológica humana a la infección (anticuerpos u otros biomarcadores) (Tabla 1).

Tabla 1.

Pruebas de detección del SARS-CoV-2

	RT-PCR (exudado nasofaríngeo /orofaríngeo)	RT-PCR (saliva)	RT-PCR en exudado nasofaríngeo (Multiplex)	Test antigénicos rápidos de última generación (exudado nasofaríngeo)	Test de determinación de anticuerpos
Sensibilidad	85-90% (Gold standard)	Muy variable (5-91%)	Similar al gold standard	<ul style="list-style-type: none"> • Sintomáticos: >95% • sintomáticos: (escasa evidencia) 	Dependiente del tiempo desde inicio de síntomas <ul style="list-style-type: none"> • 1-5 d: <50% • 6-10 d: 50- 75% • 10-20 d: >75% • >20 d: >90%
Especificidad	99,5% (Gold Standard)	Similar al gold standard	Similar al gold standard	95-99%	90- 99%
Hisopo	Si	No	Si	Si	No
Toma de muestra por					Sí* / No**

personal especializado	Si	No	Si	Si	* Venopunción ** Sangre capilar
Tiempo de respuesta	1-6h	2-6h	2-6h	15 min	15 min-3 h
Comentarios	La RT-PCR y otras pruebas NAAT (pruebas de amplificación de ácido nucleico) pueden producir resultados positivos durante semanas o meses después de la infección inicial y pueden detectar niveles de ácido nucleico viral incluso cuando no se puede cultivar el virus, lo que sugiere que la presencia de ácido nucleico viral no siempre indica contagiosidad(Testing CDC, 2021)			Las pruebas de antígenos son inmunoensayos que detectan la presencia de un antígeno viral específico, lo que implica una infección viral actual. • Sensibilidad en sintomáticos: >93%: Bajo condiciones óptimas de uso; ensayo realizado durante los primeros 5-7 días tras el inicio de la clínica. • Sensibilidad en asintomáticos: Existe poca experiencia aún. Los resultados aportados por el CNM alcanzan hasta el 90%	• Principal utilidad: estudio de seroprevalencia • Criterio diagnóstico de infección pasada. • Aporta información sobre la cronología de infecciones asintomáticas

ELISA indirecto contra proteína RBD

ELISA son ensayos simples, rápidos y seguros que analizan muestras de suero o plasma de pacientes infectados. El diagnóstico por ELISA se basa en la detección de anticuerpos IgM e IgG contra la proteína RBD del SARS-CoV-2 durante las etapas iniciales de la enfermedad por COVID-19 (Singh et al., 2020). Esta es una técnica en la cual se da una detección indirecta, es decir que no se detecta el virus, sino que ponemos de manifiesto la respuesta inmune frente a el (Beavis et al., 2020).

Los anticuerpos neutralizantes del coronavirus se dirigen a la proteína S (Spike) que a su vez interviene en la entrada del virus en la célula huésped. El trabajo de Oliveira et al.,(2020) describe el desarrollo de ensayos serológicos para la detección de anticuerpos neutralizantes, así como anticuerpos contra las proteínas N y S, las subunidades S1 y el dominio de unión al receptor (RBD) de la proteína S del SARS-CoV-2. Se expone que los anticuerpos reaccionaron con las proteínas S, S1 y RBD del SARS-CoV-2, además señala a S1 como el antígeno más específico para el diagnóstico de COVID-19. Al evaluar los otros dominios de la proteína S, observaron que la subunidad S2 es la más conservada, desempeñando un papel en la reactividad cruzada con la proteína S del MERS-CoV.

Aunque el ELISA para la detección de proteína S es más específico, en pacientes con infección leve, las proteínas N y RBD fueron más sensibles que S1, lo que indica la necesidad de detectar anticuerpos contra diferentes antígenos para evitar falsos negativos

Hipótesis

H1: La estandarización del ELISA indirecto permite la detección de anticuerpos contra la proteína RBD del SARS-Cov-2.

Ho: La estandarización del ELISA indirecto no permite la detección de anticuerpos contra la proteína RBD del SARS-Cov-2

Capítulo III: Materiales y métodos

Obtención de las muestras

Las muestras de sueros control (negativo) pre-pandemia (n=18), fueron donados por Zurita y Zurita Laboratorios sucursal de Cumbayá, Quito. Que habían sido confirmados por clínica y laboratorio y que no recibieron tratamiento. Para proteger la identidad de los pacientes se entregó las muestras bajo codificación, por lo cual no se conoce el nombre ni la edad del paciente, la procedencia, la fecha exacta de la toma de la muestra, ni el tiempo en que esta había estado guardada.

Se recolectaron muestras problemas (vacunados y no vacunados) en la Ciudad de Santo Domingo de Los Tsáchilas, (n=25), procurando que los individuos vacunados tengan más de dos semanas de inmunizados contra la COVID-19. Igual que en el caso anterior las muestras se las codificó y se omitió toda información personal del paciente.

Reactivos específicos

Antígeno RBD: El antígeno (Ag) es una proteína recombinante RBD-SARS-CoV-2 (rRBD), donado por Division of Infectious Diseases and Vaccinology, School of Public Health, University of California, Berkeley.

Reactivos requeridos

- Albúmina Bovina Sérica (BSA)
- Leche de SOYA descremada en polvo 5%
- Conjugado: Anticuerpo secundario de cabra Anti IgG humana-conjugada con Peroxidasa de rábano picante (HRP)
- Sustrato: Comprimidos de diclorhidrato de o-fenilendiamina (OPD)
- Detergente Monolaurato de polioxietileno-20-sorbitán (Tween 20)
- Peróxido de hidrogeno al 30%

Estandarización de la técnica de ELISA indirecto para determinar anticuerpos

Fijación de antígeno (RBD): se utilizaron placas de poliestireno (Thermo Scientific MaxiSorp, Immulon 4 HBX) de 96 pocillos de fondo plano. El antígeno de RBD se preparó en diferentes concentraciones, diluido en PBS (Buffer fosfato salino) (tabla2). De las soluciones diluidas se colocaron 50 μ L por pozo y se dejaron en incubación a temperatura ambiente durante toda la noche, para que los antígenos se fijen adecuadamente a los pocillos.

Lavados de placa: se realizan con el buffer de lavado el cual consistía en una solución de 600mL PBS con 0.6mL Tween 20 (PBS-T). Los lavados se realizaron con 270 μ L de PBS-T después de cada fase, usando una micropipeta multicanal; después de la fijación del antígeno, la placa se lavó 5 veces después del bloqueo, 5 veces después de añadir los sueros y 7 veces después de añadir el conjugado. Esta solución además de usarse para el lavado de microplacas ELISA, se utiliza como solución base para la solución de bloqueo, dilución de los sueros y dilución del conjugado.

Fase de Bloqueo: como diluciones de bloqueo se evaluaron dos, PBS-T/BSA (Solución de Bloqueo con Albumina Sérica) 4% p/v y PBS-T/L (Solución de Bloqueo con Leche de Soya) 5% p/v. Añadido la solución de bloqueo se deja incubar a 37°C por 30 minutos.

Unión Ag-Ac: se evaluaron distintas diluciones de los sueros (Tabla2) desde 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, ... , 1/6400 diluidos en Buffer dilución (PBS-T/L). Se añadieron 100 μ L de cada una de las muestras diluidas en el buffer y se distribuyeron en la microplaca ELISA. Se incubó por a 37°C por 1 hora.

Adición del conjugado: se prepararon 4 diluciones de conjugado diferentes a evaluar (tabla2). Para cada pocillo de la microplaca se adicionaron 100 μ L del conjugado diluido en PBS-T/L. Se incubó a 37°C por 30 minutos.

Adición de Sustrato: Es un comprimido de diclorhidrato de o-fenilendiamina (OPD) de 5 mg, que se diluyó en un frasco ámbar, con 10 mL de agua, previo al uso se añadió 5 μ L H₂O₂ 30% (peróxido de hidrogeno) y homogenizó. A continuación, se incubó 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.

Parado de la reacción: se realizó añadiendo 100 μ L / pocillo de ácido clorhídrico 3N.

Lectura de las densidades ópticas: se realizaron lecturas a 450 nm de longitud de onda, en un lector de ELISA (Multiscan PLUS, Thermo ELECTRON CORPORATION).

Para los tiempos de cada etapa se siguió el protocolo establecido por el Instituto de Investigación en Zoonosis – CIZ.

Tabla 2.

Tabla resumen de los diferentes protocolos usados en la estandarización del ELISA para detectar anticuerpos anti SARS-CoV-2.

Protocolo	Dilución de sueros	Dilución Bloqueo	Dilución del conjugado	Dilución del antígeno	Tiempo y temperatura de incubación con el suero	Tiempo y temperatura de incubación con el conjugado	Tiempo y temperatura de incubación con el sustrato
1	1/50						
	1/100						
	1/200	-SOYA					
	1/400	30 minutos a 37°C	1/8000	2,5 µg/mL	1 hora a 37°C	30 minutos a 37°C	10 minutos
	1/800						
	1/1600						
	1/3200						
	1/6400						
2		-BSA	1/6000	2,5 µg/mL	1 hora a 37°C	30 minutos a 37°C	10 minutos
	1/100	30 minutos a 37°C	1/8000				
	1/200		1/10000				
			1/12000				
3		-SOYA					
	1/100	-BSA 30 minutos a 37°C	1/10000	2,5 µg/mL	1 hora a 37°C	30 minutos a 37°C	10 minutos
4				0,625 µg/mL			
	1/100	-SOYA 30 minutos a 37°C	1/10000	1,25 µg/mL	1 hora a 37°C	30 minutos a 37°C	10 minutos
	1/200			2,5 µg/mL			

Determinación del punto de corte del ELISA

Para la determinación del punto de corte del ELISA estandarizado, se utilizaron las diluciones de los sueros, conjugado y del antígeno previamente estandarizado, de la siguiente manera: 1/100, 1/10000 y 2,5 µg/mL respectivamente.

En estas condiciones, se procesaron 20 muestras negativas (prepandemia) por duplicado. Los valores de DO de estas muestras, fueron promediados y se determinó la desviación estándar (DS), al valor promedio se le sumó el valor de 3 veces la desviación estándar y de esta manera se encontró el cut-off del test.

Evaluación de la cinética de anticuerpos, en pacientes que sufrieron COVID-19 después de la segunda vacunación en comparación con sus propios sueros prevacunados, con una y dos dosis

Para este análisis se trabajó con casos fortuitos de pacientes, de los cuales ya se habían obtenido muestras sin vacuna y con vacuna. Sin embargo, se dio el suceso de que pacientes vacunados adquirieron la infección por SARS-CoV-2, que fue confirmada por una prueba de antígeno de hisopado.

Se tomó la muestra de 3 pacientes, en donde del Paciente 1 (P1) inmunizado con BNT162B2 (Pfizer-BioNTech), se tenía muestras prevacunación, con primera dosis, con segunda dosis. Luego de la segunda dosis, este paciente se contagió con el SARS-CoV-2 y se tomó una muestra 30 días después de su recuperación.

Para los pacientes 2 y 3 (P1-P2) que habían sido inmunizados con CoronaVac (Sinovac) y con BNT162B2 (Pfizer-BioNTech) respectivamente, se tenían muestras prevacunados, con primera dosis y con segunda dosis, pero adquirida la infección por SARS-CoV-2.

Diseño experimental

En este trabajo se usó un modelo de DCA (Diseño experimental completamente aleatorizado) para verificar si existe diferencia significativa entre la razón de sueros positivo y negativos aplicando cada uno de los protocolos planteados: Se evaluó la diferencia de las DO, de muestras positivas entre negativas, aplicando el DCA, para constatar o no, si existe diferencia significativa al usar parámetros de: diluciones de los sueros, las concentraciones de conjugado y antígeno, así también el tipo solución de bloqueo (BSA o Soya). Se utilizaron los programas Infostat versión 20201 y SPSS Statistics versión 27.0.1.

El nivel de significancia a usarse fue de 0.05.

Análisis funcional

Para las variables, cuyos análisis de varianza resultaron significativos, se aplicó la prueba de significancia de Tukey al 5 %.

Capítulo IV: Resultados

Diferencias entre las diluciones de suero usando el protocolo 1

Realizadas las diluciones seriadas de los sueros humanos de 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200 y 1/6400 en el buffer de dilución (PBS-T/L), acogiéndose al protocolo número uno (tabla 2), los resultados del ANOVA (tabla 3) nos muestran que existe diferencia significativa en la DO resultante de las diferentes diluciones de los sueros (la diferencia de la densidad óptica de las muestras se encontró restando las DO de sueros positivos contra sueros negativos). Figura 5

Tabla 3.

Análisis de Varianza para diluciones de suero

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
MODELO	0,12	7	0,02	34,64	<0,0001
DILUCIÓN SUEROS	0,12	7	0,02	34,64	<0,0001
ERROR	4,1E-03	8	5,1E-04		
TOTAL	0,13	15			

Para verificar que dilución de suero presenta la mayor diferencia entre positivo y negativo se realizó una prueba de Tuckey con un nivel de significancia del 5% (tabla 4). En donde se formaron 5 grupos independientes, siendo el grupo E que pertenece a la dilución 1/100 la que presentaba mayor diferencia entre sueros positivos y negativos con una media de 0,272. Mientras que la dilución 1/50 arroja una media de 0,235, cercana a la dilución 1/100 pero, con la diferencia estadística respectiva.

Tabla 4.

Resultados de la prueba de significancia - Análisis Tukey ($P > 0,05$) de diluciones de sueros

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,08967

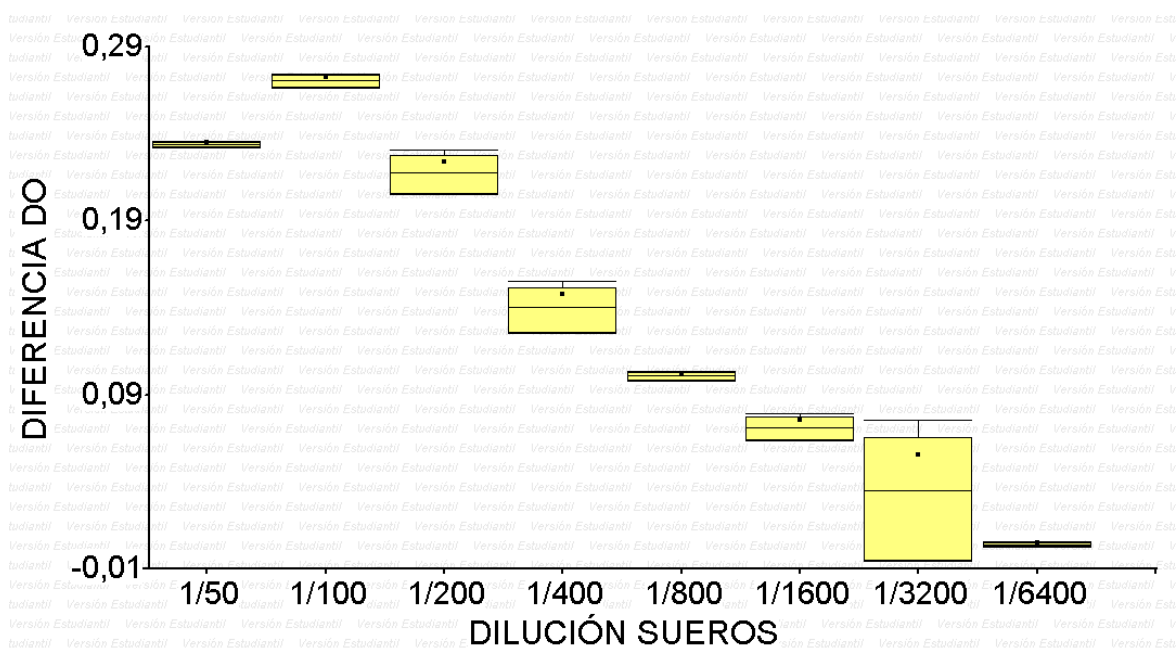
Error: 0,0005 gl: 8

DILUCIÓN SUEROS	MEDIAS	n	E.E			
1/6400	0,010	2	0,016	A		
1/3200	0,059	2	0,016	A	B	
1/1600	0,079	2	0,016	A	B	C
1/800	0,105	2	0,016		B	C
1/400	0,150	2	0,016			C D
1/200	0,225	2	0,016			D E
1/50	0,235	2	0,016			D E
1/100	0,272	2	0,016			E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 5.

Diferencia entre diluciones de sueros humanos positivos y negativos



Nota. En el gráfico se muestra, que la dilución 1/100 es la que mayormente se diferencia del resto de diluciones sueros positivos contra negativos

Diluciones del Conjugado anticuerpo secundario de cabra Anti IgG humana-conjugada con HRP

Respecto al protocolo 2, en el que se probaron cuatro diluciones de conjugado (1/6000, 1/8000, 1/10000, 1/12000), después del análisis de varianza (tabla 5) de la diferencia entre sueros positivos y negativos, se encontró que existe diferencia entre las diluciones del conjugado .

Tabla 5.

ANOVA de diluciones de Conjugado

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
MODELO	0,08	3	0,03	0,94	0,5013
DILUCIÓN CONJUGADO	0,08	3	0,03	0,94	0,5013
ERROR	0,12	4	0,03		
TOTAL	0,20	7			

Para comprobar la diferencia existente entre las diluciones de Conjugado se realizó una prueba de significancia de Tukey (tabla 6).

Tabla 6.

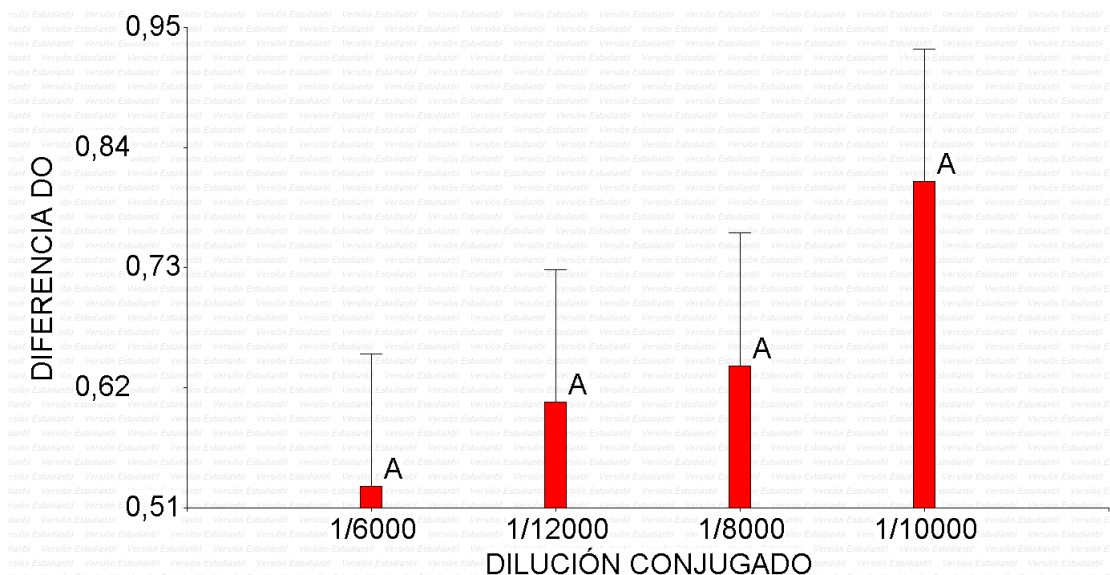
Resultados prueba de significancia - Análisis Tukey ($P > 0,05$) de diluciones del Conjugado

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,69874				
Error: 0,0295 gl: 4				
DILUCIÓN CONJUGADO	MEDIAS	n	E. E	GRUPOS HOMOGÉNEOS
1/6000	0,53	2	0,12	A
1/12000	0,61	2	0,12	A
1/8000	0,64	2	0,12	A
1/10000	0,81	2	0,12	A

Se encontró un grupo homogéneo A, lo que denota que no hay diferencia entre las diluciones del conjugado, sin embargo, el grupo que visualmente (Figura 6) se ve más alejado en comparación del resto es la dilución 1/10000.

Figura 6.

Gráfico de diluciones Conjugado



Nota. Se muestra como las diluciones de conjugado muestran diferencias en las DO entre sueros positivos y negativos.

Soluciones de Bloqueo (BSA o Soya)

En lo que se refiere a la Solución de Bloqueo se probaron dos tipos con 20 sueros negativos prepandemia; BSA 4% p/v y Leche de Soya en polvo descremada 5% p/v, se encontró con ayuda del ANOVA (tabla7) que existe una diferencia entre las diferentes diluciones de bloqueo, sin embargo, esta diferencia al realizar las pruebas de significancia se apreció que no es estadísticamente significativa (tabla8) .

Tabla 7.

ANOVA de Soluciones de Bloqueo

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
MODELO	0,01	1	0,01	0,99	0,3248
SOLUCIONES BLOQUEO	0,01	1	0,01	0,99	0,3248
ERROR	0,19	38	0,01		

TOTAL	0,20	39
-------	------	----

Tabla 8.

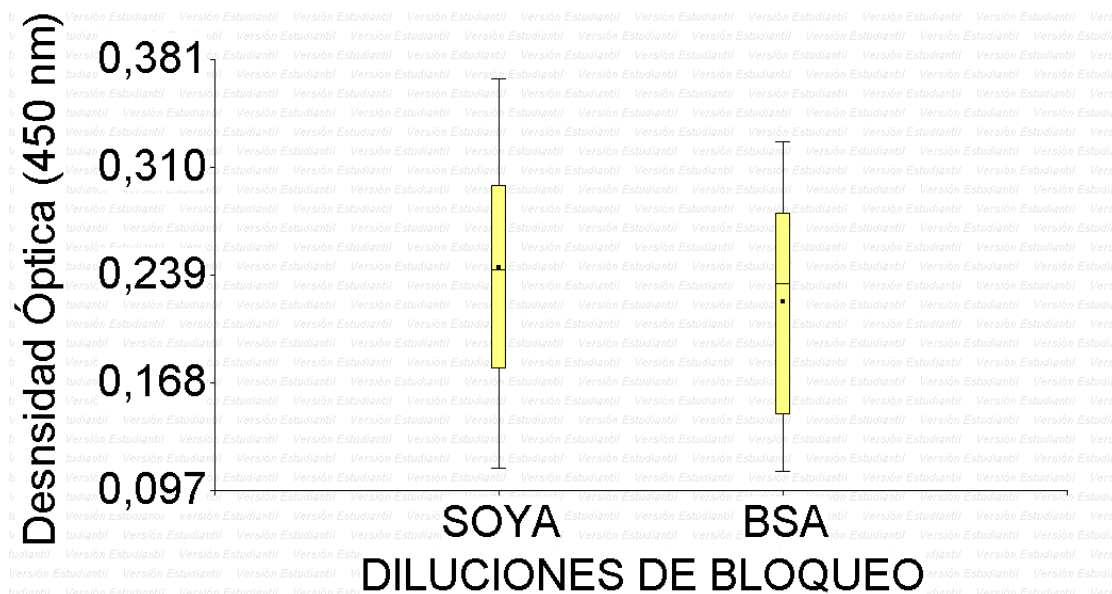
Resultados prueba de significancia - Análisis Tukey ($P>0,05$) de diluciones de Bloqueo

Test: Tukey Alfa=0,0051 DMS=0,04556				
Error: 0,051 gl: 38				
DILUCIÓN BLOQUEO	MEDIAS	n	E. E	GRUPOS HOMOGÉNEOS
BSA	0,22	20	0,02	A
SOYA	0,24	20	0,02	A

Se observa, que las densidades ópticas para cada caso BSA y Soya no varían significativamente por lo que se formó un solo grupo homogéneo A, lo que denota que no hay efecto relevante en la densidad óptica por el uso de estas dos diluciones. Mas claramente se lo observa en la figura 7 en el diagrama de Cajas y Bigotes

Figura 7.

Gráfico de diluciones de Bloqueo



Nota: Gráfico realizado usando software Infostat versión 20201

Diluciones de Antígeno (RBD)

Para esta variable se realizó un recubrimiento de la placa con tres concentraciones diferentes del antígeno (RBD); 0.625 µg/mL, 1.25µg/mL y 2.5µg/mL. Y usando sueros humanos de gente vacunada y no vacunada, este ELISA se realizó siguiendo los parámetros del protocolo 4, descritos en la tabla 2.

Los resultados del ANOVA mostraron que existía una diferencia altamente significativa entre los tres tipos de concentración de antígeno (tabla 9).

Tabla 9.

ANOVA de Concentración de Antígeno

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
MODELO	0,08	2	0,04	51,73	0,0002
CONCENTRACIÓN DE ANTIGENO	0,08	2	0,04	51,73	0,0002
ERROR	4,8E-03	6	8,1E-04		
TOTAL	0,09	8			

Al verificar que al menos una concentración de antígeno es mejor que el resto se procedió a realizar una prueba de significancia de Tukey ($p > 0,05$) y contrastar cuál de las concentraciones causa mayor diferencia de sueros positivos y negativos (tabla 10).

Tabla 10.

Resultados prueba de significancia - Análisis Tukey (P>0,05) de diluciones de Antígeno

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0, 07114				
Error: 0,0008		gl: 6		
DILUCIÓN ANTÍGENO	MEDIAS	n	E. E	GRUPOS HOMOGÉNEOS
0,625µg/mL	0,20	3	0,02	A
1,25µg/mL	0,35	3	0,02	B
2,5µg/mL	0,43	3	0,02	C

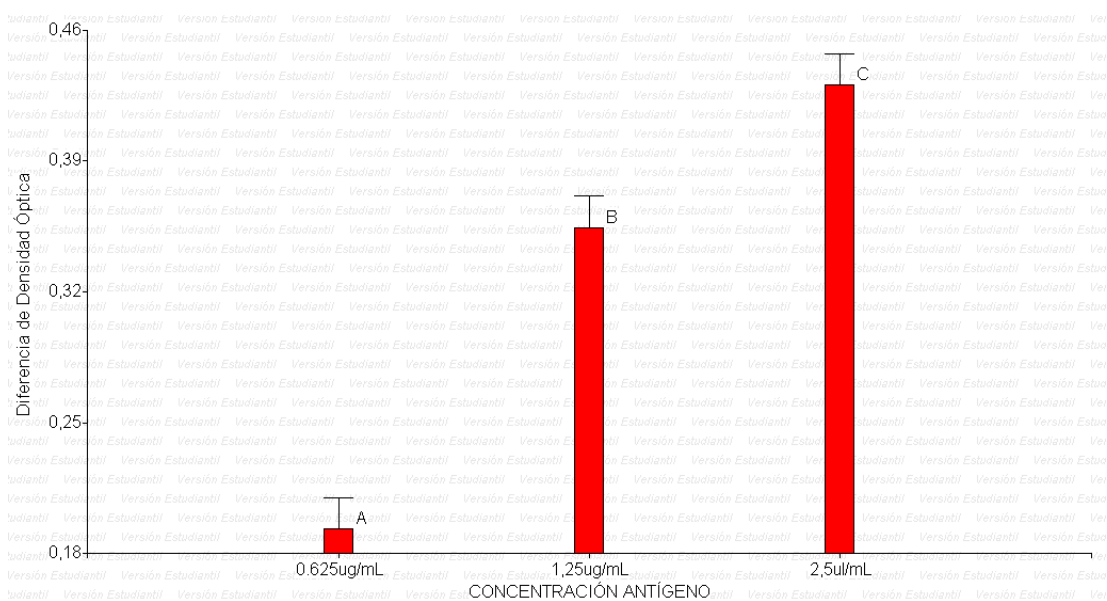
Se constató que

existe diferencia

significativa entre las concentraciones de antígeno y el análisis de Tukey permitió saber que la concentración que permitió mayor diferencia entre sueros positivos de los negativos fue la de 2,5µg/mL. Se lo evidencia de manera más gráfica en la figura 8.

Figura 8.

Gráfico de diferencia de Densidad Óptica a diferentes concentraciones de antígeno



Determinación de la Línea de corte del ELISA estandarizado

Para la el cálculo del cut-off se procedió a usar el protocolo 4 (tabla 2). Se midió la absorbancia a 450nm de 20 sueros NEGATIVOS prepandemia (figura 9), para a continuación sacar la respectiva media y desviación estándar.

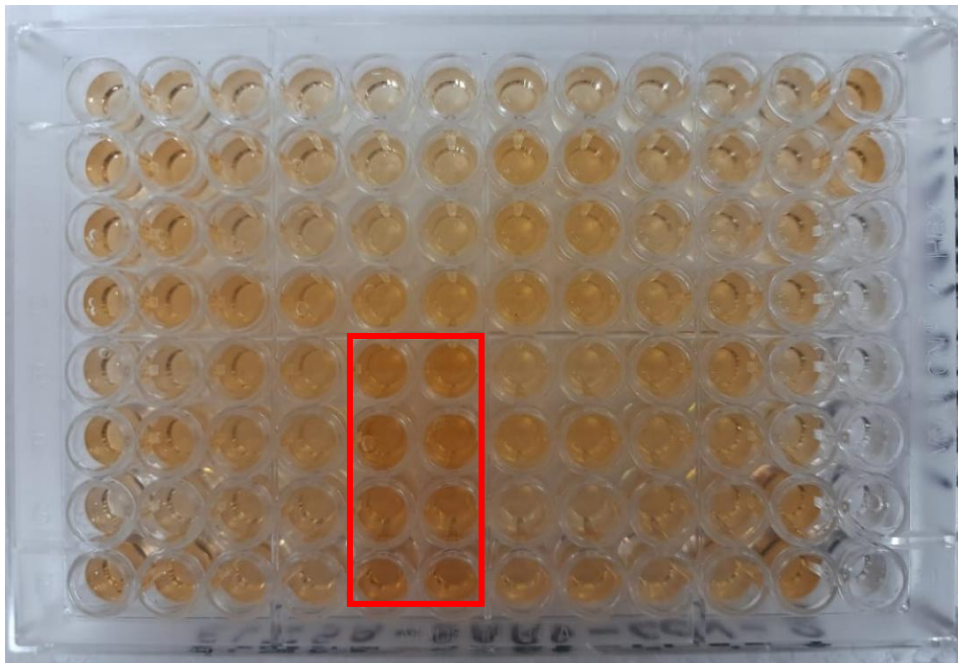
$$\text{Cut off} = \text{Media} + 2DS + o 3DS + o 4DS$$

$$\text{Cut off} = 0,13 + (0,09 * 3)$$

$$\text{Cut off} = 0,4$$

Figura 9.

Determinación del Cut off



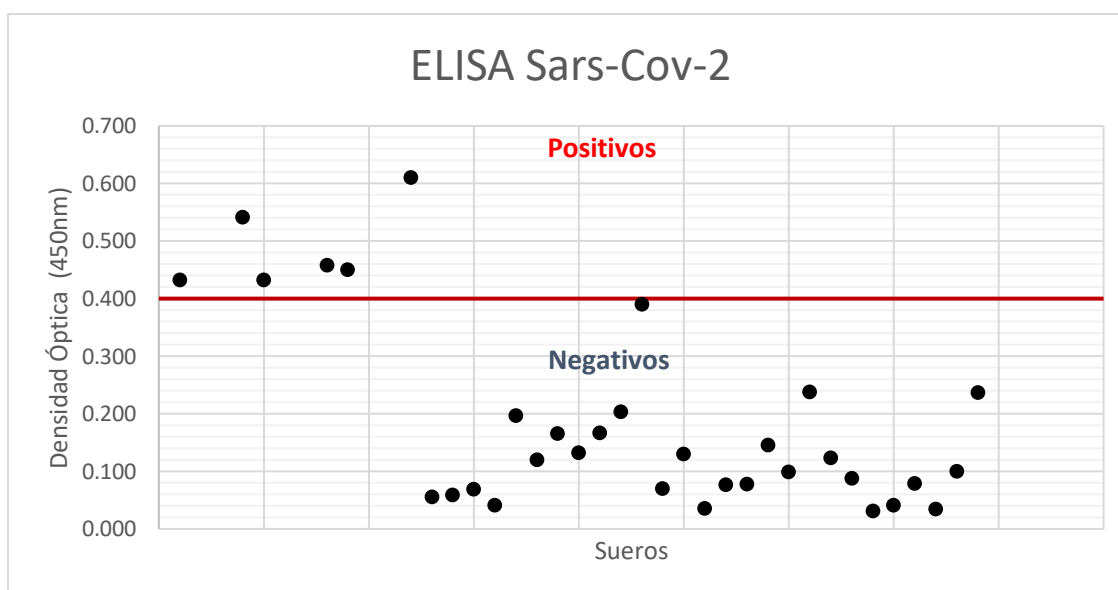
Nota. El rectángulo rojo que se muestra en el gráfico, son sueros positivos, se usaron para establecer diferencias más visuales en el ELISA. El resto de pocillos son muestras pre pandemia, con sus respectivas réplicas

Resultados de D.O de muestras positivas y negativas siguiendo los parámetros del protocolo número 4

Para este ensayo se probaron un total de 33 muestras, de los cuales 12 de estos sueros pertenecían a 6 pacientes, a los cuales se les tomo una muestra sin vacuna, y con vacuna después de 2 semanas de inmunizados. El resto de sueros (n=21) eran pacientes sin vacuna.

Figura 10.

Gráfico de la DO de muestras positivas y negativas.



Nota. Línea roja es el cut off que permite la discriminación entre sueros positivos y negativos

En la figura 10 se observa que bajo las condiciones establecidas del protocolo N°4, la dilución de sueros 1/100, conjugado 1/10000, con Bloqueo de leche de Soya 30 minutos, concentración de antígeno 2.64µg/ml y los tiempos de 1 hora de incubación de suero, 30 minutos de conjugado, 10 minutos de sustrato. Se logró obtener una buena discriminación entre los valores de DO entre sueros positivos y negativos.

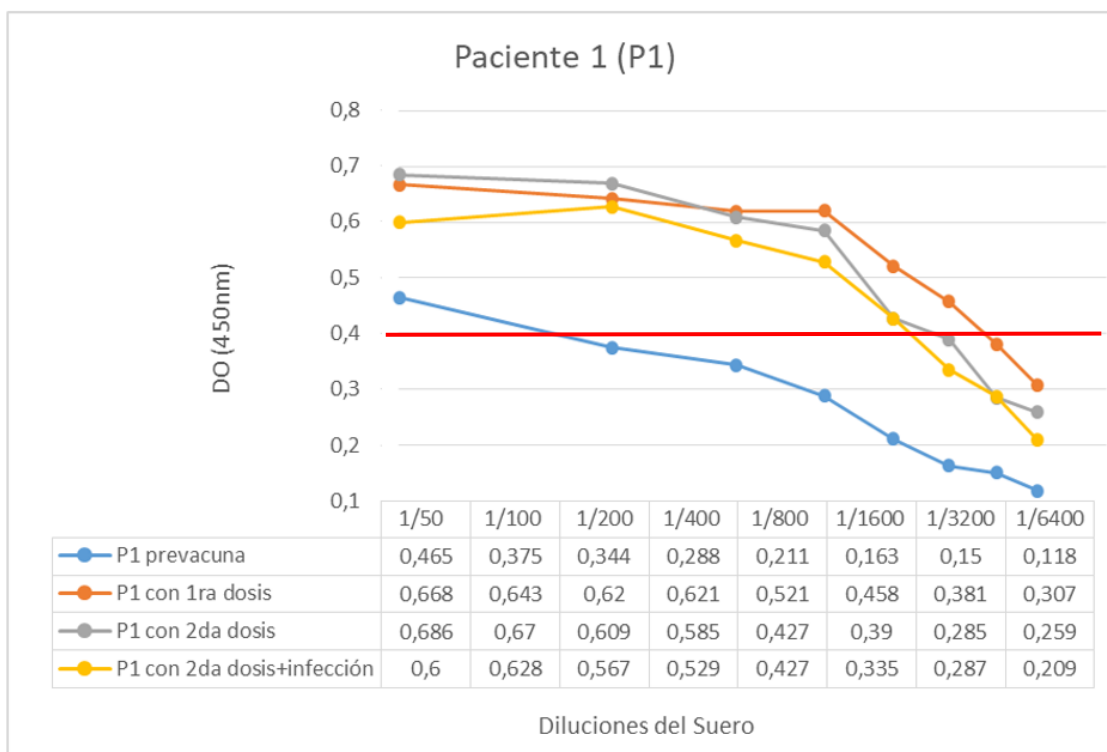
Se encontró que de los 12 sueros de los pacientes de los cuales se extrajo la muestra antes y después de la vacunación, se pudo diferenciar en función de las DO, los que presentaban anticuerpos contra la COVID-19 pudiendo discriminar los sueros de las 6 personas vacunadas contra los sueros de las mismas personas, pero sin vacuna. Y, en lo que respecta al resto de sueros, las 21 muestras presentaron DO inferiores al cut off, manteniéndose como negativos.

Para confirmar la fiabilidad y la repetibilidad, se utilizó un control positivo, un control negativo y un blanco en cada placa.

Evaluación de la cinética de anticuerpos, en pacientes con varias dosis de vacunas, diferentes tipos de vacunas y vacunados que se contagiaron del SARS-CoV-2

Para este ensayo se usaron sueros de tres pacientes en diferentes estadios de tiempo/condiciones. El paciente 1 (P1), se tomaron muestras prevacunación, luego de la primera dosis con BNT162B2 de Pfizer-BioNTech y de la segunda. Luego de la segunda dosis, este paciente se contagió con el SARS-CoV-2 y se tomó una muestra 30 días después de su recuperación.

Para el primer paciente los resultados de las DO mostraron (figura 11), que sus niveles de anticuerpos fueron en aumento desde la primera dosis de la vacuna, hasta la segunda dosis, y los niveles se mantuvieron después de la infección con SARS-CoV-2, siendo en este paciente homogéneo los niveles de anticuerpo, después de la primera y segunda dosis, incluso aun después de haberse contagiado.

Figura 11.*Cinética de anticuerpos Paciente 1*

Nota. La línea horizontal de color rojo representa el punto de corte que es de 0,4.

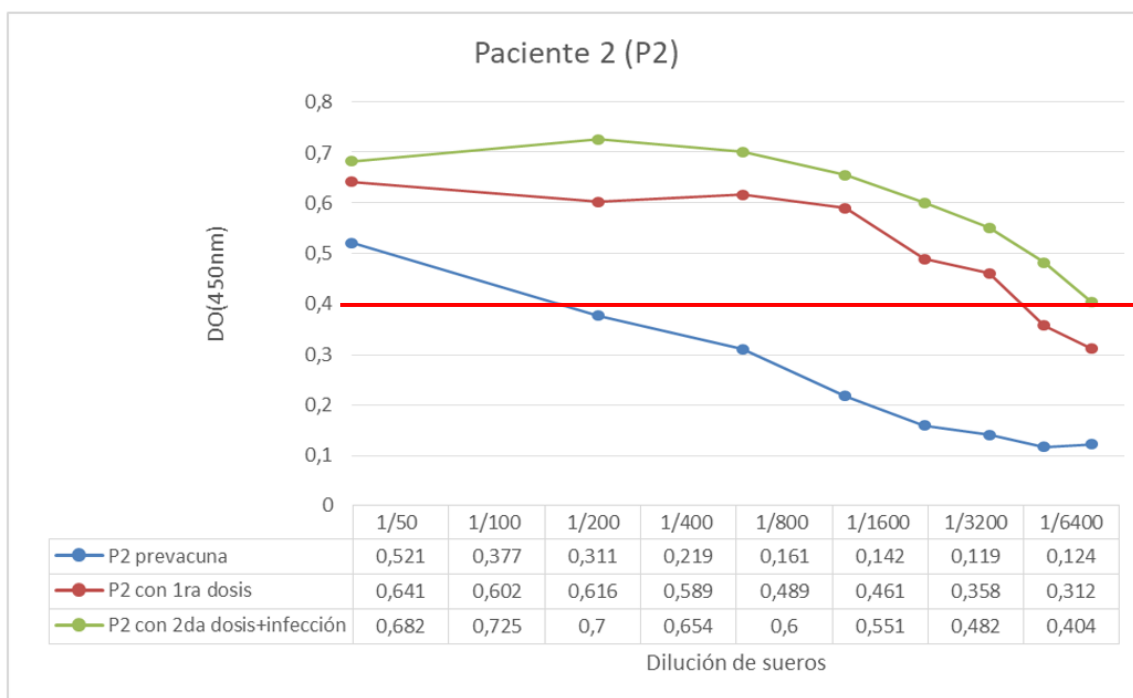
Como se puede observar en la gráfica, los mayores títulos de anticuerpo son obtenidos por el paciente P1, luego de la primera dosis, observándose que pasa el punto de corte en la dilución 1/3200. Curiosamente, luego de las dos dosis y la enfermedad, el suero de este paciente, cruza el punto de corte a los 1/1600, al igual que después de la segunda dosis. En cuanto al suero pre-vacunación, esta cruza el punto de corte en la dilución 1/100, señalando efectivamente su negatividad

Para el Paciente 2, se tomaron muestras con la primera dosis de vacuna, con la segunda dosis y una muestra más 12 días después de que el paciente adquirió el virus del SARS-CoV-2. El paciente fue sido inmunizado con la vacuna CoronaVac de Sinovac.

Los resultados del segundo paciente (figura12) arrojaron que hubo un aumento considerable de los anticuerpos en el suero con segunda dosis más infección por SARS-CoV-2, en comparación con el suero del mismo paciente con únicamente la segunda dosis sin la infección, esto en función de las DO registradas.

Figura 12.

Cinética de anticuerpos Paciente 2



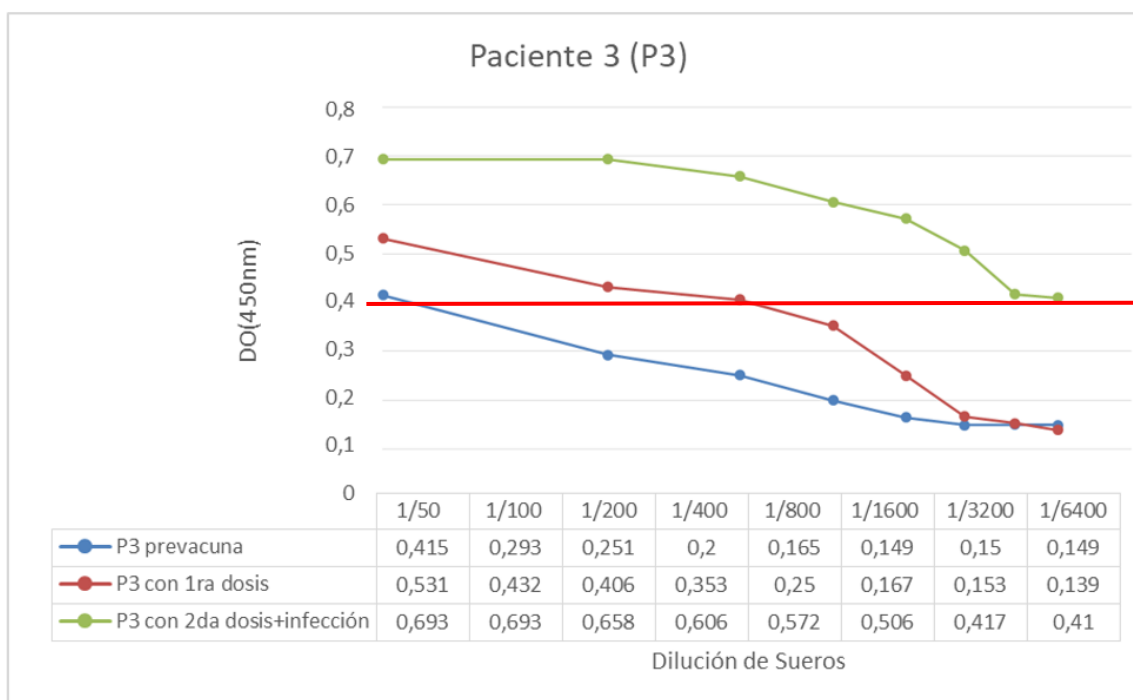
Nota. La línea horizontal de color rojo representa el punto de corte que es de 0,4.

En el caso del Paciente 3, se tomaron muestras con la primera dosis de vacuna, con segunda dosis; el paciente se contagió con el SARS-CoV-2 y se tomó nuevamente una muestra 12 días después de su recuperación. El paciente fue sido inmunizado con la vacuna BNT162B2 de Pfizer-BioNTech.

Para el Paciente 3, los resultados de las DO nos muestran que se repite la tendencia del Paciente 2, en donde las mayores DO obtenidas fueron en el caso del suero con segunda dosis más infección por SARS-CoV-2.

Figura 13.

Cinética de anticuerpos Paciente 3



Nota. La línea horizontal de color rojo representa el punto de corte que es de 0,4.

Capítulo V: Discusión

Los datos obtenidos en este ensayo, demostraron que la mejor dilución de sueros, donde se encuentra la mayor diferencia positivo/negativo, se da en la dilución 1/100 resultado que coincide con valores obtenidos en un protocolo establecido en el Centro Internacional de Zoonosis (CIZ). Además (Krähling et al., 2021b), reportan en el procedimiento de su estudio el uso de una dilución 1/101 para los sueros de pacientes con COVID-19. Con lo cual podemos decir que nuestro escrutinio de la mejor dilución de los sueros es la óptima para la estandarización de este ELISA.

En lo que respecta a la solución de Bloqueo este es un paso necesario para llevarse a cabo el ELISA. Este Buffer de Bloqueo rellena los espacios que no han sido ocupados por las proteínas o los anticuerpos inmovilizados en la placa en este caso el antígeno RBD, esto con la función de prevenir uniones inespecíficas de los anticuerpos y así evitar falsos positivos o a su vez problemas de ruido de fondo (Abyntek, 2016). En el presente estudio se analizaron dos soluciones de Bloqueo, Leche de Soya 5%p/v y BSA 4%pv. Se obtuvo (tabla 3) que no hay diferencia significativa en las densidades ópticas al usar cualquiera de estas soluciones bloqueantes. Optando por la leche de Soya para la estandarización, debido que trae varios beneficios usarla, tal como lo describe (Abyntek, 2016) dentro de los que se encuentran su bajo coste y su fácil adquisición.

Sin embargo, tiene también sus desventajas y es que contiene proteínas fosforiladas, por lo que su uso junto con anticuerpos fosfoespecíficos podría incrementar el ruido de fondo. Además, tampoco se debe utilizar con sistemas de detección de avidina-biotina, ya que también en su composición se encuentra la biotina endógena. No obstante, para este estudio no aplican estas situaciones.

En lo que respecta el BSA, junto con la leche de Soya y la gelatina, son los agentes de bloqueo de uso más frecuente y este no interfiere con anticuerpos fosfoespecíficos, aunque puede contener IgG o proteínas séricas que pueden originar ruido de fondo inespecífico, además está el hecho de que tiene un coste más elevado en comparación con la leche de Soya (Xu et al., 2018).

Para encontrar la mejor dilución de conjugado se probaron cuatro diluciones, de las cuales resultó ser 1/10000, la que mejor discriminaba entre los sueros positivos y los negativos. Puesto que con las concentraciones de 1/6000, 1/8000 y 1/12000 las DO obtenidas resultaban menores a las deseadas en los sueros positivos y muy elevadas en los sueros negativos, produciendo una baja discriminación entre los sueros, por tanto, estas condiciones de trabajo no eran las adecuadas para conducir una prueba de ELISA.

Y según bibliografía consultada se puede llegar a observar que las diluciones del conjugado son muy variables en los estudios como es el ejemplo del trabajo de Klumpp-Thomas et al., (2021) el cual usa el mismo anticuerpo anti-IgG humana de cabra conjugada con HRP, a una dilución de 1/4000, con lo que se concluye diciendo que esta variable se debe probar o estandarizar en cada laboratorio.

En relación al antígeno, se encontró que la mejor concentración en donde la absorbancia de los sueros positivos no fue muy baja y la de los sueros negativos no fue muy elevada fue de 2,5µg/mL. Resultado que se asemeja con el trabajo de (Klumpp-Thomas et al., 2021) el cual usó una concentración de 2µg/mL del antígeno RBD para sensibilizar las placas. De igual manera para evaluar los anticuerpos que se unen a la RBD del SARS-Cov-2 (Robbiani et al., (2020) usan una concentración de 1µg/mL. En este estudio también se informó que el valor de absorbancia entre muestras positivas y negativas fue mayor cuando se usó la proteína de pico que cuando se usó la

proteína S-RBD. Sin embargo, las lecturas de absorbancia producidas se consideran que fueron notablemente similares.

La evaluación de la cinética de los anticuerpos en los pacientes mostró que los niveles fueron en aumento a partir de la inoculación con una primera dosis independientemente de la vacuna utilizada, y estos niveles fueron en aumento con la segunda dosis y de igual forma aumentaron con la segunda dosis más infección con SARS-CoV-2 a excepción del Paciente 1, que sus niveles de anticuerpos disminuyeron. Lo que muestra que después de la inmunización se elevan los niveles de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 y de manera mucho más evidente cuando se tienen vacunas de refuerzo. Lo que constata (Galván-Casas et al., 2021), que las vacunas entrenan al sistema inmunológico usando antígenos inofensivos del SARS-CoV-2 para estimular una respuesta inmunitaria y por medio de la administración intramuscular inducen fundamentalmente una inmunidad humoral, pero son capaces de mejorar la respuesta con un refuerzo homólogo. Como Voysey et al., (2021) lo informa en su estudio que una segunda dosis de la vacuna ChAdOx1 nCoV-19 induce un aumento de los niveles de anticuerpos y probablemente sea necesaria para una protección duradera. De igual manera (Hervé et al., 2019) nos dice que, una administración conjunta de vacunas proporciona ventajas significativas para garantizar una cobertura y un cumplimiento óptimos de la vacuna. Como se observa en este estudio, la segunda dosis logró elevar la cantidad de anticuerpos totales circulantes en pacientes de Ecuador.

Cada vacuna desencadena una respuesta inmune específica que, a su vez, genera la memoria inmunitaria que permite combatir al SARS-CoV-2 ante futuras exposiciones (Galván-Casas et al., 2021). En el presente estudio se presentaron resultados en donde se observa que independientemente del tipo de vacuna se observa un incremento en los anticuerpos circulantes, en función de las DO y las diluciones evaluadas.

En nuestro caso, se pueden observar algunas diferencias entre los pacientes, esto se puede deber a que la recolección de las muestras se realizó en tiempos distintos, pues fueron casos especiales con los que se pudo trabajar. Esta diferencia de tiempos pudo hacer que no se encuentren mayores diferencias entre los niveles de anticuerpos de los pacientes.

Se ha reportado que con la vacuna CoronaVac de Sinovac a partir de la tercera semana después de la segunda dosis, se experimentó una disminución significativa en la seropositividad y se evidenció también que los niveles de anticuerpos fueron menores entre las personas de 60 años o más que entre las de 18 a 39 años. En este mismo estudio se mostró que con un refuerzo con la vacuna de Sinovac o de otro tipo, se podría restaurar los niveles de anticuerpos (Sauré et al., 2022). Con la vacuna BNT162b2 de Pfizer-BioNTech, se observó en cambio que la seropositividad se mantenía por más tiempo en comparación con CoronaVac, sin embargo, sucedía el mismo caso con los grupos de personas mayores de 60 años, se observó una seropositividad más baja entre estos participantes que entre los de 18 a 39 años. Para prevenir la hospitalización, un ensayo de Fase 3 en 10.000 voluntarios encontró que un refuerzo de Pfizer-BioNTech tiene una eficacia del 95,6 por ciento contra la enfermedad (Walsh et al., 2020), mostraron un claro beneficio de una segunda dosis.

Existen varios factores por los cuales una vacuna puede inducir altos o bajos niveles de anticuerpos y que estos sean duraderos en el tiempo, dentro de estos factores está el hecho de cómo se da la presentación del antígeno en el sistema inmune. En el caso de Sinovac al ser una vacuna de tipo inactivada debido a que se presenta todo el virus al sistema inmunitario es probable que las respuestas inmunitarias se dirijan no solamente a la proteína espiga del SARS-CoV-2, sino también a la matriz, la envoltura y la nucleoproteína, lo que afectaría el rendimiento de la vacuna disminuyendo la eficiencia al ser menos específica (Krammer, 2020).

En cambio, las vacunas de Pfizer-BioNTech que trabajan con ARNm, tienen la ventaja de que, en lugar de presentar el antígeno completo, se entrega la información genética de este, y luego el antígeno se expresa en las células del individuo vacunado, para a continuación ser localizado y reconocido por el sistema inmune. La ventaja de este enfoque de ARNm incluye la capacidad de imitar la infección natural, además de estimular una respuesta inmune mucho más potente, específica y posiblemente más duradera (Alturki et al., 2020).

Para el caso de los pacientes 2 y 3 con vacunas de Sinovac y Pfizer-BioNTech respectivamente (figuras 12 y 13), los niveles de anticuerpos cuando tenían la infección por SARS-Cov-2, fue más elevada en comparación cuando se tenía la segunda dosis sin infección, esto se puede deber que a que una estimulación por parte del virus, desencadena una reacción inmune mucho más completa. Lo que tendría sentido comparando con el estudio de Sun et al., (2020) en donde las respuestas IgM e IgG específicas del SARS-CoV-2 aumentaron con el curso de la enfermedad en pacientes con COVID-19.

En lo que respecta específicamente a la reacción inmune contra el receptor RBD artículos recientes han demostrado que los anticuerpos que se unen al dominio de unión al receptor RBD son fundamentales para la inmunidad protectora a largo plazo contra la infección por COVID-19 y se asocian con una mejor supervivencia del paciente (Barnes et al., 2020). Estos autores concluyen que la medición de anticuerpos contra epítomos específicos de los antígenos del SARS-CoV-2 ofrece una evaluación más precisa de la inmunidad esterilizante y clínicamente significativa. Por lo tanto, es importante analizar la naturaleza y especificidad de las respuestas de IgG a COVID-19, puesto que, si los anticuerpos no se dirigen al RBD y no pueden unirse de manera efectiva a los trímeros de punta, es probable que sean ineficaces para prevenir la infección (Jordan, 2021).

Capítulo VI: Conclusiones

Se estableció un protocolo para un ELISA fácil de realizar y robusto y para la detección de respuestas de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 dirigidos a la proteína RBD del virus. El protocolo N°4 establecido durante el trabajo y que permitió discriminar de manera más notoria los sueros positivos de los negativos, constó de las siguientes condiciones: dilución de sueros 1/100, conjugado 1/10000, con Bloqueo de leche de Soya 30 minutos, concentración de antígeno 2.64µg/ml y los tiempos, 1 hora de incubación de los sueros, 30 minutos de conjugado, 10 minutos de sustrato.

Se encontró que el punto de corte fue de 0,4. Los resultados se expresan como: Positivos si las muestras presentan valores superiores en por lo menos 0,100 de Absorbancia del nivel del cut off y superiores.

Variables como la concentración de Conjugado, deben estandarizarse en cada laboratorio al igual que el punto de corte.

La solución de Bloqueo de Leche de Soya es la más práctica para este ensayo, ya que reduce costos, es de fácil adquisición y además se comprobó que no presenta diferencia significativa en las lecturas de densidad óptica al compararlo con BSA.

En lo que respecta a la concentración del antígeno (2,5ug/mL), se concluye que está dentro de los valores usados en la mayoría de los estudios, que han trabajado con la estandarización de ensayos serológicos contra el SARS-CoV-2.

Se concluye que es importante analizar la naturaleza y especificidad de las respuestas de IgG a COVID-19, puesto que, si los anticuerpos no se dirigen al RBD y no pueden unirse de manera efectiva a los trímeros de punta, es probable que sean ineficaces para prevenir la infección.

Se concluye que las personas muestreadas, desarrollaron anticuerpos IgG contra el antígeno RBD del virus SARS-CoV-2 causante de la COVID-19, y además se constató que dependiendo de la vacuna aplicada la positividad de IgG era más alta, en este caso la vacuna BNT162b2 de Pfizer-BioNTech mostró niveles de anticuerpos más elevados en comparación a CoronaVac de Sinovac, además la vacuna de Pfizer-BioNTech evidenció que mantuvo una seropositividad por más tiempo que la vacuna de Sinovac. Este tipo de ensayos son de gran ayuda para monitorear la positividad de IgG de la población al SARS-CoV-2 en presencia o ausencia de vacunación y determinar la disminución de anticuerpos a lo largo del tiempo, lo que proporciona datos que son de gran utilidad para evaluar futuras estrategias de vacunación.

Capítulo VII: Recomendaciones

Se recomienda realizar el mismo estudio haciendo un seguimiento a más pacientes y verificar en que lapso de tiempo los niveles de anticuerpos comienzan a disminuir con diferentes vacunas.

Se recomienda que el nivel de cut off se estandarice en cada laboratorio, además de calcularlo para cada grupo de muestras que se procesan.

Realizar alícuotas de las muestras de suero en diferentes tubos eppendorf para que en el proceso de congelación y descongelación se tenga siempre sueros sin descongelar, pues los niveles de anticuerpos tienden a disminuir al realizar continuamente este proceso.

Capítulo VIII: Bibliografía

Abyntek. (2016, October 13). Tips para elegir el buffer de bloqueo. <https://www.abbyntek.com/tips-para-elegir-el-buffer-de-bloqueo/>

Alturki, S. O., Alturki, S. O., Connors, J., Cusimano, G., Kutzler, M. A., Izmirly, A. M., & Haddad, E. K. (2020). The 2020 pandemic: Current SARS-CoV-2 vaccine development. *Frontiers in Immunology*, 11, 1880. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01880>

Artese, A., Svicher, V., Costa, G., Salpini, R., di Maio, V. C., Alkhatib, M., Ambrosio, F. A., Santoro, M. M., Assaraf, Y. G., Alcaro, S., & Ceccherini-Silberstein, F. (2020). Current status of antivirals and druggable targets of SARS CoV-2 and other human pathogenic coronaviruses. *Drug Resistance Updates*, 53, 100721. <https://doi.org/10.1016/J.DRUP.2020.100721>

Arya, R., Kumari, S., Pandey, B., Mistry, H., Bihani, S. C., Das, A., Prashar, V., Gupta, G. D., Panicker, L., & Kumar, M. (2021). Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. *Journal of Molecular Biology*, 433(2), 166725. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2020.11.024>

Asselah, T., Durantel, D., Pasmant, E., Lau, G., & Schinazi, R. F. (2021). COVID-19: Discovery, diagnostics and drug development. *Journal of Hepatology*, 74(1), 168. <https://doi.org/10.1016/J.JHEP.2020.09.031>

Barnes, C. O., Jette, C. A., Abernathy, M. E., Dam, K. M. A., Esswein, S. R., Gristick, H. B., Malyutin, A. G., Sharaf, N. G., Huey-Tubman, K. E., Lee, Y. E., Robbani, D. F., Nussenzweig, M. C., West, A. P., & Bjorkman, P. J. (2020). SARS-CoV-2 neutralizing antibody structures inform therapeutic strategies. *Nature*, 588(7839), 682–687. <https://doi.org/10.1038/S41586-020-2852-1>

Beavis, K. G., Matushek, S. M., Abeleda, A. P. F., Bethel, C., Hunt, C., Gillen, S., Moran, A., & Tesic, V. (2020). Evaluation of the EUROIMMUN Anti-SARS-CoV-2 ELISA Assay for detection of IgA and IgG antibodies. *Journal of Clinical Virology*, 129, 104468. <https://doi.org/10.1016/J.JCV.2020.104468>

Chan, J. F. W., Kok, K. H., Zhu, Z., Chu, H., To, K. K. W., Yuan, S., & Yuen, K. Y. (2020). Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 221–236. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1719902>

Chang, C. ke, Chen, C. M. M., Chiang, M. hui, Hsu, Y. lan, & Huang, T. huang. (2013). Transient oligomerization of the SARS-CoV N protein--implication for virus ribonucleoprotein packaging. *PloS One*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0065045>

Chao, J. Y., Derespina, K. R., Herold, B. C., Goldman, D. L., Aldrich, M., Weingarten, J., Ushay, H. M., Cabana, M. D., & Medar, S. S. (2020). Clinical Characteristics and Outcomes of Hospitalized and Critically Ill Children and Adolescents with Coronavirus Disease 2019 at a Tertiary Care Medical Center in New York City. *The Journal of Pediatrics*, 223, 14-19.e2. <https://doi.org/10.1016/J.JPEDI.2020.05.006>

Cui, J., Li, F., & Shi, Z. L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews. Microbiology*, 17(3), 181–192. <https://doi.org/10.1038/S41579-018-0118-9>

Ejazi, S. A., Ghosh, S., & Ali, N. (2021). Antibody detection assays for COVID-19 diagnosis: an early overview. *Immunology and Cell Biology*, 99(1), 21–33. <https://doi.org/10.1111/IMCB.12397>

Fehr, A. R., & Perlman, S. (2015a). Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1282, 1–23. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1

Fehr, A. R., & Perlman, S. (2015b). Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1282, 1–23. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1

Fuchs Wightman, F., Godoy Herz, M. A., Muñoz, J. C., Stigliano, J. N., Bragado, L., Moreno, N. N., Palavecino, M., Servi, L., Cabrerizo, G., Clemente, J., Avaro, M., Pontoriero, A., Benedetti, E., Baumeister, E., Rudolf, F., Remes Lenicov, F., Garcia, C., Buggiano, V., Kornblihtt, A. R., ... Petrillo, E. (2021). A DNA intercalating dye-based RT-qPCR alternative to diagnose SARS-CoV-2. *RNA Biology*, 18(12), 2218. <https://doi.org/10.1080/15476286.2021.1926648>

Galván-Casas, C., Català, A., & Muñoz-Santos, C. (2021). Vacunas frente a SARS-CoV-2 y piel. *Actas Dermo-Sifiliograficas*, 112(9), 828. <https://doi.org/10.1016/J.AD.2021.05.011>

Harrison, A. G., Lin, T., & Wang, P. (2020a). Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends in Immunology*, 41(12), 1100. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2020.10.004>

Harrison, A. G., Lin, T., & Wang, P. (2020b). Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends in Immunology*, 41(12), 1100. <https://doi.org/10.1016/J.IT.2020.10.004>

Hervé, C., Laupèze, B., del Giudice, G., Didierlaurent, A. M., & da Silva, F. T. (2019). The how's and what's of vaccine reactogenicity. *NPJ Vaccines*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/S41541-019-0132-6>

Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S.

(2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 181(2), 271-280.e8. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.02.052>

Jordan, S. C. (2021). Innate and adaptive immune responses to SARS-CoV-2 in humans: relevance to acquired immunity and vaccine responses. *Clinical and Experimental Immunology*, 204(3), 310. <https://doi.org/10.1111/CEI.13582>

Kang, S., Yang, M., Hong, Z., Zhang, L., Huang, Z., Chen, X., He, S., Zhou, Z., Zhou, Z., Chen, Q., Yan, Y., Zhang, C., Shan, H., & Chen, S. (2020). Crystal structure of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites. *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, 10(7), 1228–1238. <https://doi.org/10.1016/J.APSB.2020.04.009>

Klumpp-Thomas, C., Kalish, H., Drew, M., Hunsberger, S., Snead, K., Fay, M. P., Mehalko, J., Shunmugavel, A., Wall, V., Frank, P., Denson, J. P., Hong, M., Gulten, G., Messing, S., Hicks, J., Michael, S., Gillette, W., Hall, M. D., Memoli, M. J., ... Sadtler, K. (2021). Standardization of ELISA protocols for serosurveys of the SARS-CoV-2 pandemic using clinical and at-home blood sampling. *Nature Communications* 2021 12:1, 12(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20383-x>

Krähling, V., Halwe, S., Rohde, C., Becker, D., Berghöfer, S., Dahlke, C., Eickmann, M., Ercanoglu, M. S., Gieselmann, L., Herwig, A., Kupke, A., Müller, H., Neubauer-Rädel, P., Klein, F., Keller, C., & Becker, S. (2021a). Development and characterization of an indirect ELISA to detect SARS-CoV-2 spike protein-specific antibodies. *Journal of Immunological Methods*, 490, 112958. <https://doi.org/10.1016/J.JIM.2021.112958>

Krammer, F. (2020). SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature*, 586(7830), 516–527. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2798-3>

Li, Q., Guan, X., Wu, P., Wang, X., Zhou, L., Tong, Y., Ren, R., Leung, K. S. M., Lau, E. H. Y., Wong, J. Y., Xing, X., Xiang, N., Wu, Y., Li, C., Chen, Q., Li, D., Liu, T., Zhao, J., Liu, M., ... Feng, Z. (2020). Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. *The New England Journal of Medicine*, 382(13), 1199–1207. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA2001316>

Lim, Y., Ng, Y., Tam, J., & Liu, D. (2016). Human Coronaviruses: A Review of Virus-Host Interactions. *Diseases (Basel, Switzerland)*, 4(3), 26. <https://doi.org/10.3390/DISEASES4030026>

Lozada-Requena, I., & Ponce, C. N. (2020). COVID-19: respuesta inmune y perspectivas terapéuticas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 37(2), 312–319. <https://doi.org/10.17843/RPMESP.2020.372.5490>

Mandala, V. S., McKay, M. J., Shcherbakov, A. A., Dregni, A. J., Kolocouris, A., & Hong, M. (2020). Structure and drug binding of the SARS-CoV-2 envelope protein transmembrane domain in lipid bilayers. *Nature Structural & Molecular Biology*, 27(12), 1202–1208. <https://doi.org/10.1038/S41594-020-00536-8>

Masters, P. S. (2006). The molecular biology of coronaviruses. *Advances in Virus Research*, 66, 193–292. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)66005-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)66005-3)

Merad, M., & Martin, J. C. (2020). Author Correction: Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages (*Nature Reviews Immunology*, (2020), 20, 6, (355-362), 10.1038/s41577-020-0331-4). *Nature Reviews Immunology*, 20(7), 448. <https://doi.org/10.1038/S41577-020-0353-Y>

Oliveira, B. A., de Oliveira, L. C., Sabino, E. C., & Okay, T. S. (2020). SARS-CoV-2 and the COVID-19 disease: a mini review on diagnostic methods. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 62, 1–8. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946202062044>

OMS. (2020). Pruebas diagnósticas para el SARS-CoV-2. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/335830/WHO-2019-nCoV-laboratory-2020.6-spa.pdf>

Padron-Regalado, E. (2020). Vaccines for SARS-CoV-2: Lessons from Other Coronavirus Strains. *Infectious Diseases and Therapy*, 9(2), 255–274. <https://doi.org/10.1007/S40121-020-00300-X>

Park, S. E. (2020). Epidemiology, virology, and clinical features of severe acute respiratory syndrome -coronavirus-2 (SARS-CoV-2; Coronavirus Disease-19). *Clinical and Experimental Pediatrics*, 63(4), 119. <https://doi.org/10.3345/CEP.2020.00493>

Puntmann, V. O., Carerj, M. L., Wieters, I., Fahim, M., Arendt, C., Hoffmann, J., Shchendrygina, A., Escher, F., Vasa-Nicotera, M., Zeiher, A. M., Vehreschild, M., & Nagel, E. (2020). Outcomes of Cardiovascular Magnetic Resonance Imaging in Patients Recently Recovered From Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiology*, 5(11), 1265–1273. <https://doi.org/10.1001/JAMACARDIO.2020.3557>

Rahimi, A., Mirzazadeh, A., & Tavakolpour, S. (2021). Genetics and genomics of SARS-CoV-2: A review of the literature with the special focus on genetic diversity and SARS-CoV-2 genome detection. *Genomics*, 113(1), 1221. <https://doi.org/10.1016/J.YGENO.2020.09.059>

Robbiani, D. F., Gaebler, C., Muecksch, F., Lorenzi, J. C. C., Wang, Z., Cho, A., Agudelo, M., Barnes, C. O., Gazumyan, A., Finkin, S., Häggelöf, T., Oliveira, T. Y., Viant, C., Hurley, A., Hoffmann,

H. H., Millard, K. G., Kost, R. G., Cipolla, M., Gordon, K., ... Nussenzweig, M. C. (2020). Convergent Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Convalescent Individuals. *Nature*, 584(7821), 437. <https://doi.org/10.1038/S41586-020-2456-9>

Ruan, Y. J., Wei, C. L., Ee, L. A., Vega, V. B., Thoreau, H., Yun, S. T. S., Chia, J. M., Ng, P., Chiu, K. P., Lim, L., Tao, Z., Peng, C. K., Ean, L. O. L., Lee, N. M., Sin, L. Y., Ng, L. F. P., Ren, E. C., Stanton, L. W., Long, P. M., & Liu, E. T. (2003). Comparative full-length genome sequence analysis of 14 SARS coronavirus isolates and common mutations associated with putative origins of infection. *Lancet (London, England)*, 361(9371), 1779–1785. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13414-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13414-9)

Santos-López, G., Cortés-Hernández, P., Vallejo-Ruiz, V., & Reyes-Leyva, J. (2021a). SARS-CoV-2: basic concepts, origin and treatment advances. *Gaceta Medica de Mexico*, 157(1), 84–89. <https://doi.org/10.24875/GMM.M21000524>

Santos-López, G., Cortés-Hernández, P., Vallejo-Ruiz, V., & Reyes-Leyva, J. (2021b). SARS-CoV-2: generalidades, origen y avances en el tratamiento. *Gaceta de México*, 157(1). <https://doi.org/10.24875/GMM.20000505>

Sanz, J. M., Gómez Lahoz, A. M., & Martín, R. O. (2021). Papel del sistema inmune en la infección por el SARS-CoV-2: inmunopatología de la COVID-19. *Medicine*, 13(33), 1917. <https://doi.org/10.1016/J.MED.2021.05.005>

Sarkar, M., & Saha, S. (2020). Structural insight into the role of novel SARS-CoV-2 E protein: A potential target for vaccine development and other therapeutic strategies. *PloS One*, 15(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0237300>

Sauré, D., O’Ryan, M., Torres, J. P., Zuniga, M., Santelices, E., & Basso, L. J. (2022). Dynamic IgG seropositivity after rollout of CoronaVac and BNT162b2 COVID-19 vaccines in Chile: a sentinel surveillance study. *The Lancet. Infectious Diseases*, 22(1), 56. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00479-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00479-5)

Singh, A., Shaikh, A., Singh, R., & Singh, A. K. (2020). COVID-19: From bench to bed side. *Diabetes & Metabolic Syndrome*, 14(4), 277. <https://doi.org/10.1016/J.DSX.2020.04.011>

Sule, W. F., & Oluwayelu, D. O. (2020). Real-time RT-PCR for COVID-19 diagnosis: challenges and prospects. *The Pan African Medical Journal*, 35(Suppl 2), 121. <https://doi.org/10.11604/PAMJ.SUPP.2020.35.24258>

Sun, B., Feng, Y., Mo, X., Zheng, P., Wang, Q., Li, P., Peng, P., Liu, X., Chen, Z., Huang, H., Zhang, F., Luo, W., Niu, X., Hu, P., Wang, L., Peng, H., Huang, Z., Feng, L., Li, F., ... Chen, L. (2020). Kinetics of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG responses in COVID-19 patients. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 940. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1762515>

Tay, M. Z., Poh, C. M., Rénia, L., MacAry, P. A., & Ng, L. F. P. (2020). The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nature Reviews. Immunology*, 20(6), 363–374. <https://doi.org/10.1038/S41577-020-0311-8>

Testing | CDC. (2021, September 15). <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/testing/index.html>

Ujike, M., & Taguchi, F. (2015). Incorporation of spike and membrane glycoproteins into coronavirus virions. *Viruses*, 7(4), 1700–1725. <https://doi.org/10.3390/V7041700>

Voysey, M., Costa Clemens, S. A., Madhi, S. A., Weckx, L. Y., Folegatti, P. M., Aley, P. K., Angus, B., Baillie, V. L., Barnabas, S. L., Bhorat, Q. E., Bibi, S., Briner, C., Cicconi, P., Clutterbuck, E.

A., Collins, A. M., Cutland, C. L., Darton, T. C., Dheda, K., Dold, C., ... Zuidewind, P. (2021). Single-dose administration and the influence of the timing of the booster dose on immunogenicity and efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine: a pooled analysis of four randomised trials. *Lancet (London, England)*, 397(10277), 881. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00432-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00432-3)

Walsh, E. E., Frenck, R. W., Falsey, A. R., Kitchin, N., Absalon, J., Gurtman, A., Lockhart, S., Neuzil, K., Mulligan, M. J., Bailey, R., Swanson, K. A., Li, P., Koury, K., Kalina, W., Cooper, D., Fontes-Garfias, C., Shi, P.-Y., Türeci, Ö., Tompkins, K. R., ... Gruber, W. C. (2020). Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based Covid-19 Vaccine Candidates. *New England Journal of Medicine*, 383(25), 2439–2450. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA2027906>

Wang, Q., Zhang, Y., Wu, L., Niu, S., Song, C., Zhang, Z., Lu, G., Qiao, C., Hu, Y., Yuen, K. Y., Wang, Q., Zhou, H., Yan, J., & Qi, J. (2020). Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. *Cell*, 181(4), 894-904.e9. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.03.045>

Woo, P. C. Y., Huang, Y., Lau, S. K. P., & Yuen, K. Y. (2010). Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses*, 2(8), 1805–1820. <https://doi.org/10.3390/V2081803>

Wu, A., Peng, Y., Huang, B., Ding, X., Wang, X., Niu, P., Meng, J., Zhu, Z., Zhang, Z., Wang, J., Sheng, J., Quan, L., Xia, Z., Tan, W., Cheng, G., & Jiang, T. (2020). Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host & Microbe*, 27(3), 325–328. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2020.02.001>

Xu, G., Hao, C., Zhang, L., & Sun, R. (2018). The interaction between BSA and DOTAP at the air-buffer interface. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-017-18689-W>

Ye, Q., West, A. M. V., Silletti, S., & Corbett, K. D. (2020). Architecture and self-assembly of the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 29(9), 1890–1901. <https://doi.org/10.1002/PRO.3909>