

Guatemala, 13 de diciembre, 2020

Señor Director  
Dr. Félix Alan Douglas Aguilar Carrera  
Director General de Investigación  
Universidad de San Carlos de Guatemala

Señor Director:

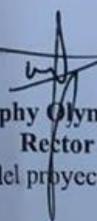
Adjunto a la presente el informe final **"DESARROLLO DE PRUEBA DE DETECCIÓN RÁPIDA SANGUÍNEA PARA CORONAVIRUS-19 –COVID-19-Sars-CoV-2"** con ACUERDO DE RECTORÍA N° 0314-2020 de fecha 20 de mayo de 2020, coordinado por el MSC Ing. Murphy Olympto Paiz Recinos, Rector de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Este informe final fue elaborado con base en la guía de presentación de la Dirección General de Investigación, el cual fue revisado su contenido en función del protocolo aprobado.

Así mismo, el coordinador(a) del proyecto, se compromete a dar seguimiento y cumplir con el proceso de revisión y edición establecido por Digi del **informe final y del manuscrito científico.**

Sin otro particular, suscribo atentamente

"Id y enseñad a todos"



**MSC Ing. Murphy Olympto Paiz Recinos**  
Rector  
Coordinador(a) del proyecto de investigación

Universidad de San Carlos de Guatemala  
Dirección General de Investigación

Informe final

**DESARROLLO DE PRUEBA DE DETECCIÓN RÁPIDA SANGUÍNEA PARA  
CORONAVIRUS-19 –COVID-19-Sars-CoV-2**

Equipo de Investigación integrado a través de  
Acuerdo de Rectoría N° 0314-2020 de fecha 20 de mayo de 2020.

**MSC Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos**  
**Rector**  
**Coordinador(a) del proyecto de investigación**

Guatemala, 13 de diciembre de 2020

Dr. Félix Alan Douglas Aguilar Carrera

Director General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar  
Coordinador General de Programas

NOMBRE	PROFESIÓN	FUNCIÓN ESPECÍFICA
<b>MSc Murphy Olympo Paíz Recinos</b>	Rector Universidad de San Carlos de Guatemala	Coordinador General del Proyecto
<b>Jacob Glanville PhD</b>	Chief Executive Officer. Distributed Bio	Investigador cuya colaboración consistirá en la transferencia de tecnología y desarrollo de la prueba de anticuerpos
<b>Dr. Luis Fernando Torres Arreaga</b>	Médico y Cirujano Docente Director del Centro Universitario del Progreso USAC	Sub-coordinador General del Proyecto
<b>Dr. Enjebell Alejandro Ramos González</b>	Médico y Cirujano Jefe Unidad de Salud USAC	Investigador quien tiene bajo su responsabilidad organizativa la operación del equipo del grupo técnico científico.
<b>Sarah Ives MSc</b>	Director of Contract Research. Distributed Bio	Investigador cuya colaboración consistirá en la transferencia de tecnología y desarrollo de la prueba de anticuerpos
<b>Dr. Erwin Humberto Calgua Guerra</b>	Médico y Cirujano Docente Facultad de Ciencias Médicas USAC	Investigador. Será el especialista que estará a cargo del diseño metodológico general del proyecto, así como de incorporar al proyecto todos los aspectos bioéticos requeridos para este tipo de estudios. Será el administrador de Transferencia de Tecnología y Desarrollo Biotecnológico, quien hará las veces de enlace Jacob Glanville PhD y Sarah Ives MSc de Distributed Bio.
<b>Dra. Mayra Lisette Motta Padilla</b>	Médica Veterinaria Coordinadora de Laboratorio de Referencia Regional de Sanidad Animal (LARRSA) USAC	Investigadora que, en cooperación con el equipo de Química/os Biólogos/os, elaborará el diseño metodológico relacionado a los procedimientos de laboratorio que permitirán el desarrollo de la prueba diagnóstica.
<b>Dra. Ana Liss Perdomo Mendizabal</b>	Médica y Cirujana Coordinadora General del Sistema de Estudios de Postgrado USAC	Investigadora que incorporará al diseño del proyecto los aspectos de salud pública y epidemiología para el desarrollo del proyecto. Estará también a cargo de asesorar y ejecutar, con el aval del Coordinador y Sub-coordinador, así como del Dr. Erwin Calgua, de los aspectos de administración y gestión del proyecto.
<b>Licda. Leticia Castillo Signor</b>	Química Bióloga Unidad de Monitoreo, Supervisión y Evaluación Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social	Investigadora que, en cooperación con los(as) químicos(as) biólogos(as), la Directora de LARRSA, estará a cargo del diseño de la prueba de diagnóstico, así como de los procedimientos de validación de la prueba de la prueba diagnóstico. Asesorará al Coordinador, Sub-Coordinador y Dr. Erwin Calgua, en relación a los procedimientos que permitan que la prueba pueda recibir los avales de las autoridades correspondientes

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, 2020. El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores.

Esta investigación fue financiada por la Dirección General de Investigación de la Universidad de San Carlos de Guatemala según consta en el Punto SÉPTIMO, Inciso 7.1, Subinciso 7.1.2, Numeral 7.1.2.7 el Acta No. 24-2020 de sesión ordinaria celebrada por el Consejo Superior Universitario y el Acuerdo de Rectoría N° 0314-2020 de fecha 20 de mayo de 2020.

• Índice Contenido General

1. Título .....	6
2. Resumen .....	6
3. Abstract and keyword .....	6
4. Introducción .....	7
5. Planteamiento del problema .....	8
6. Marco teórico.....	10
7. Estado del arte.....	19
8. Objetivo general.....	23
9. Materiales y métodos .....	23
10. Vinculación, difusión y divulgación.....	43
11. Productos, hallazgos, conocimientos o resultados:.....	43
12. Análisis y discusión de resultados:.....	45
13. Conclusiones .....	45
14. Impacto esperado .....	46
15. Referencias.....	47
16. Apéndice.....	52

## Índice figuras

	<i>Pág.</i>
Figura 1.	
PBS solo y RBD diluidos en PBS a 1ug / mL en columnas alternas de cada placa de ensayo.....	29
Figura 2.	
Disposición de la placa de dilución.....	30
Figura 3.	
Las muestras de plasma preparadas en las placas de dilución se transfieren a las placas de ensayo utilizando este diseño.	35
Imagen 1.	
Reproducibilidad del ensayo de muestras entre Centivax y USAC.....	43
Imagen 2.	
Comparación de valores entre RBD y PBS en muestras de suero entre Centivax y USAC.....	44
Imagen 3.	
Unión de plasma a RBD.....	44

## 1. Título

### DESARROLLO DE PRUEBA DE DETECCIÓN RÁPIDA SANGUÍNEA PARA CORONAVIRUS-19 –COVID-19-Sars-CoV-2

## 2. Resumen

**OBJETIVO:** Desarrollar una prueba de detección rápida sanguínea para Coronavirus-19 (COVID-19). **METODOLOGÍA:** Estudio analítico de pruebas diagnósticas, en el que se desarrolló la implementación de la prueba serológica “Ensayo Inmunoenzimático para detección de IgG”, con esta se podrán titular los anticuerpos IgG de manera cuantitativa contra COVID 19. **RESULTADOS:** Se desarrolló e implementó una prueba para medir anticuerpos tipo IgG ELISA para COVID-19 y poder titular sueros de pacientes positivos con PCR para COVID 19, para que puedan donar plasma para salvar la vida de pacientes con coronavirus. Así mismo se diseñó un proceso sistematizado para desarrollar pruebas de tamizaje para futuras pandemias. **CONCLUSIONES:** Se desarrollo una prueba de detección rápida sanguínea para Coronavirus-19 (COVID-19).

**Palabras Clave:** pruebas diagnósticas, SARS-CoV-2, Anticuerpos IgG.

## 3. Abstract and keyword

**OBJECTIVE:** To develop a rapid blood test for Coronavirus-19 (COVID-19). **METHODOLOGY:** Analytical study of diagnostic tests, in which the implementation of the serological test "Enzyme Immunoassay for IgG detection" was developed, with which IgG antibodies can be titrated quantitatively against COVID 19. **RESULTS:** A test to measure IgG ELISA antibodies for COVID-19 and be able to titrate sera from patients with PCR positive for COVID 19, so that they can donate plasma to save the lives of patients with coronavirus.

Likewise, a systematized process was designed to develop screening tests for future pandemics.

**CONCLUSIONS:** A rapid blood test for Coronavirus-19 (COVID-19) was developed.

**Key Words:** diagnostic tests, SARS-CoV-2, IgG antibodies.

#### **4. Introducción**

La Pandemia causada por COVID-19 ha planteado nuevos retos para los sistemas de salud pública, siendo una de las principales, el lograr la detección oportuna y confiable de los casos. En el ámbito global, se ha propuesto que la identificación de un caso sospechoso sea principalmente sobre la base clínica, esto es, síntomas y signos que pueden ser detectados rápidamente. Una vez identificados los casos sospechosos, el procedimiento a seguir establece que se debe realizar una prueba confirmatoria del caso, que según los protocolos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS) de Guatemala, es la realización de una prueba, cuya muestra se toma de la nasofaringe y la orofaringe del caso sospechoso y luego se puede proceder a procesar la muestra y analizar su Ácido Ribonucleico (ARN) usando los equipos de Reacción de la Cadena de Polimerasa en tiempo real o a través de la detección de proteínas de superficie, antígenos, que son pruebas que no buscan amplificar el ARN.

La PCR en tiempo real es el método más confiable en este momento para el diagnóstico, aún con una sensibilidad que varía del 67% al 99%, según el método que se utilice. En el caso del antígeno, estudios han establecido que la sensibilidad llega incluso a ser del 65%, según metodología verificada en Guatemala. En la etapa actual de la Pandemia, la atención se ha centrado en estas pruebas, sin embargo, con estas pruebas se han tenido algunas limitaciones que son importantes considerar cuando se tiene la meta de tamizar a poblaciones, qué es la etapa siguiente al confinamiento general de la población, y cuando se ha retornado a la nueva normalidad. La primera limitante es que las pruebas de RT-PCR y antígeno son dependiente de la presencia de ARN viral, lo cual va disminuyendo significativamente a partir de la segunda semana de la infección. Otro aspecto es que se requiere de un excelente entrenamiento por parte de quien toma la muestra y quienes la procesan, además de contar

### **Informe final**

con Equipos de Protección Personal (EPP) para su realización, pues exponen a un alto riesgo de contaminación por SARS-Cov2. Otro de los aspectos importantes es que requiere un equipo humano altamente capacitado y es una prueba costosa, al tener que comprar los reactivos en general y los kits de extracción de ARN, que han escaseado a nivel mundial, así como tener la infraestructura adecuada para procesamiento de pruebas de Biología Molecular. Lo anterior lleva a que dichas pruebas sean centralizadas y pocos laboratorios en el país las puedan realizar y lo anterior impida llegar a los puntos donde es necesario realizar las pruebas a población más vulnerable para COVID-19.

La evidencia científica y los principios de epidemiología básica establecen en teoría que es posible mejorar la sensibilidad y especificidad de las pruebas de RT-PCR con otra prueba complementaria. Incluso, esa prueba se puede usar por sí sola para la fase en que es necesario realizar una encuesta para saber el estado inmunológico de las personas con respecto a COVID-19. Nuestro equipo desarrolló esta prueba a base de anticuerpos, estos circulan en el cuerpo como respuesta al COVID-19, como una reacción de defensa de la infección y por ello, aumentan en cantidad conforme la carga viral de SARS-Cov2 disminuye. Además, se mantiene por más tiempo la detección de dichos anticuerpos. Similares pruebas existen para otras infecciones como Dengue y otras enfermedades de origen viral y con base en los anticuerpos, definir si se tiene una infección aguda o crónica.

Por lo anterior, como equipo de investigación, implementamos una primera fase que permitió desarrollar una prueba basada en el principio de Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para medir anticuerpos de tipo IgG, de forma cuantitativa, para SARS-CoV-2.

## **5. Planteamiento del problema**

### **5.1 Planteamiento del problema**

La escasez de pruebas confirmatorias basadas en RT-PCR a nivel global, así como los kits de extracción de ARN y poco personal capacitado en esta metodología crea un problema para el cual es necesario plantear una solución en Guatemala. El hecho es que,

### **Informe final**

existen varios grupos científicos a nivel mundial que han visualizado resolver este problema con diferentes enfoques, en la gama de disminuir la complejidad de la técnica y los equipos. Sin embargo, estas soluciones siempre requieren de personal altamente entrenado, el costo de los equipos, reactivos y consumibles, lo cual requiere una mayor inversión en salud, pero es importante para tener todas las opciones diagnósticas para dar una mejor respuesta a la pandemia en Guatemala.

Es importante resaltar que estas pandemias se repetirán con más frecuencia en el futuro, y la experiencia que esta pandemia de COVID-19 nos deja como una gran lección aprendida lo siguiente: los países con mayor inversión en salud y desarrollados inmediatamente acceden a las pruebas diagnósticas comercialmente disponibles, que ellos mismos desarrollan. Esta desventaja se debe en gran parte a la enorme brecha tecnológica que tenemos en el país en cuanto al desarrollo de nuestras propias pruebas diagnósticas. En este proyecto, donde contamos con la colaboración de expertos nacionales e internacionales (como Jacob Glanville PhD y Sarah Ives MSc de la empresa Distributed Bio-Centivax, líderes en investigación de anticuerpos con fines de desarrollos de vacunas), abordamos este problema a través de crear un método de diagnóstico que pudo ser replicado y disminuyó la necesidad de depender de la tecnología de otros países y aprovechó la capacidad de la Universidad de San Carlos de Guatemala y expertos del Ministerio de Salud y Asistencia Social en virología, para poder desarrollar las propias pruebas diagnósticas.

La idea principal fue crear una prueba de bajo costo la cual podrá ser ampliamente aplicado para complementar la prueba de RT-PCR que actualmente se usa. Al plantear una solución serológica basada en anticuerpos, se mejorará la sensibilidad y especificidad de las pruebas, con un bajo costo y equipos que se pueden encontrar en todo el país. Adicionalmente, esta prueba podrá ser aplicada para la fase de la nueva normalidad, con la finalidad de establecer la seroprevalencia de IgG en contextos específicos institucionales (como el de la USAC) o en otros contextos como otras instituciones del país.

## **5.2 Preguntas de investigación**

¿Se puede desarrollar la prueba de detección rápida sanguínea para Coronavirus-19 – COVID-19-Sars-CoV-2 en USAC?

## **5.3 Delimitación en tiempo y espacio**

La prueba fue desarrollada en los Laboratorios de Distributed Bio-Centivax en San Francisco, CA, EUA y en el Laboratorio de Referencia Regional de Sanidad Animal - LARRSA- de la Facultad de Medicina y Veterinaria de la Universidad de San Carlos de Guatemala del mes de 20 mayo al 15 de diciembre de 2020.

## **6. Marco teórico**

En diciembre de 2019, los hospitales en Wuhan, China, comenzaron a informar casos de neumonía de causa desconocida. La mayoría de los pacientes inicialmente identificados estaban vinculados geográficamente a un mercado mayorista local de mariscos húmedos, donde se venden animales salvajes vivos o sacrificados. El virus actualmente está en 218 países y territorios de todo el mundo, con 61,988,054 casos y 1,449,114 muertes en el mundo en Guatemala, de los cuales 23,920 están activos, 4,214 están recuperados y 1,219 han fallecido para 12 Julio de 2020 (COVID-19 Dashboard de Centro de Ciencias en Sistemas e Ingeniería, Universidad Johns Hopkins, 2020) Los casos totales detectados, desde el 13 de marzo último, ascienden a 125 mil 352 personas.

Se estima que 113 mil 870 pacientes se han recuperado de la enfermedad y que siete mil 243 la padecen actualmente.

La secuenciación posterior de muestras del tracto respiratorio inferior identificó un nuevo coronavirus distinto de las otras cepas de coronavirus que se sabe que infectan a los humanos, posteriormente llamado coronavirus (Holshue, 2020), del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2), un virus altamente contagioso que puede transmitirse de

### **Informe final**

persona a persona (Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2020). La OMS designó la enfermedad causada por la infección por SARS-CoV-2 como COVID-19. Al igual que otras enfermedades causadas por coronavirus, la principal ruta de transmisión del SARS-CoV-2 es a través de gotas en aerosol. Se han propuesto otras posibles rutas de transmisión, como el contacto directo, la ruta oral-fecal y la transmisión de madre a hijo, pero se necesitan pruebas y estudios adicionales para confirmar lo anterior. Un estudio retrospectivo realizado al comienzo de la pandemia informó un período de incubación del SARS-CoV-2 de aproximadamente 5–14 días (Lu, et al., 2020) sin embargo, un informe más reciente indica que el período de incubación podría ser de hasta 24 días (Guan, 2020).

No existe una cura efectiva para la infección por SARS-CoV-2 y el tratamiento más común para los pacientes con COVID-19 es la atención a los síntomas. Aunque se han utilizado múltiples medicamentos antivirales, incluidos Remdesivir y Lopinavir más Ritonavir, en la práctica clínica (Chen, et al., 2020) (Pillaiyar, Meenakshisundaram & Manickam, 2020), la seguridad y la eficacia de estos aún no están claras y están bajo evaluación clínica. La lesión pulmonar inmunomediada y el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) se asocian con resultados adversos en pacientes con COVID-19 (Xu, et al., 2020). El examen histológico del tejido de biopsia pulmonar de un paciente que murió de COVID-19 mostró daño alveolar difuso bilateral y proliferación fibroblástica en espacios aéreos, y las pruebas de laboratorio indicaron un estado hiperactivado de linfocitos CD4 y CD8 circulantes (Xu, Shi, Y Wang, et al., 2020). Debido a la naturaleza hiperactiva del sistema inmune en algunos pacientes con COVID-19 grave, varios fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME), como Tocilizumab (inhibidor del receptor de interleucina [IL] -6), Baricitinib (Janus quinasa [JAK] inhibidor), Anakinra (antagonista del receptor de IL-1), se han propuesto como posibles tratamientos para COVID-19.

#### **6.1 Descripción general del coronavirus**

Los coronavirus son un grupo de virus de ARN monocatenario de sentido positivo con envoltura muy diversos que pertenecen a dos subfamilias, Coronavirinae y Torovirinae, en la familia de Coronaviridae. Estos virus se descubrieron por primera vez en la década

### **Informe final**

de 1960 y se pueden clasificar en cuatro géneros principales: alfacoronavirus, betacoronavirus, gammacoronavirus y deltacoronavirus, en función de sus relaciones filogenéticas y estructuras genómicas (Woo, et al., 2020). Entre estos cuatro géneros, los alfacoronavirus y los betacoronavirus causan principalmente infecciones respiratorias e intestinales en mamíferos, mientras que los gammacoronavirus y deltacoronavirus infectan principalmente a las aves. Actualmente, hay siete cepas de coronavirus que se sabe que infectan a los humanos, incluido el SARS-CoV-2 recientemente identificado, el coronavirus humano 229E (HCoV-229E), OC43 (HCoV-OC43), NL63 (HCoV-NL63), HKU1 (HCoV-HKU1), coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) y coronavirus del síndrome respiratorio del Medio Oriente (MERS-CoV) (Chan, et al, 2020; Cui, Li & Shi, et al., 2018; Ng & Hiscox, 2020). Los animales domésticos o salvajes podrían tener papeles importantes como reservorios zoonóticos que permiten la transmisión del virus a los humanos. Sobre la base de las bases de datos de secuencias actuales, se cree que los orígenes de SARS-CoV, MERS-CoV, HCoV-NL63, HCoV-229E y SARS-CoV-2, son murciélagos, mientras que HCoV-OC43 y HKU1 probablemente se originaron en roedores (Forni, Cagliani, Clerici & Siron, 2020; Zhou, et al., 2020). Aunque la mayoría de las infecciones por coronavirus causan solo síntomas respiratorios leves, la infección por SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2 puede ser letal.

El SARS-CoV apareció por primera vez en el sur de China y se extendió rápidamente por todo el mundo entre 2002 y 2003. Este virus fue identificado como el agente causante del SARS pandémico global, hace 18 años, lo que condujo a una importante morbilidad y mortalidad. Una década después del SARS, surgió un brote de MERS-CoV en 2012 (Zaki, van Boheemen, Bestebroer, Osterhaus, & Fouchier, 2012). La mayoría de las personas con MERS no tuvieron contacto previo con los murciélagos, lo que condujo a la identificación de los camellos como anfitriones intermedios (Mohd, Al-Tawfiq & Memish, 2016). Los pacientes con SARS o MERS presentan una variedad de características clínicas, que van desde enfermedad respiratoria asintomática o leve hasta SDRA grave fulminante con complicaciones extrapulmonares (Chan, Lau, To, Cheng, Woo & Yuen, 2015; Cheng, Lau, Woo & Yuen, 2007).

El SARS-CoV-2 pertenece al género del Betacoronavirus, según el análisis evolutivo, es más similar al coronavirus SARS del murciélago chino de herradura, con una homología de ácido nucleico del 84%. (Lu, et al., 2020). El SARS-CoV-2 también tiene un 78% de similitud con el SARS-CoV y un 50% con el MERS-CoV, a nivel de ácido nucleico (Chan, et al., 2020; Lu, et al., 2020). Solo 10 días después de la liberación del genoma del SARS-CoV-2, los investigadores encontraron un coronavirus similar al de los murciélagos de la fruta, BatCoVHKU9-1, en función de las características evolutivas (Xu X, et al., 2020). Varios informes posteriores sugirieron que las serpientes, el bisón y los pangolines podrían ser hospedadores intermedios, según la preferencia del codón y los patrones de infección viral (Guo, et al., 2020; Ji, Wang, Zhao, Zai & Li, 2020). Al inicio de la pandemia de COVID-19, los síntomas principales fueron fiebre (98%), tos (76%) y mialgia o fatiga (44%) (Huang, et al., 2020). Aproximadamente la mitad de los pacientes desarrollaron dificultad para respirar en una semana y los pacientes gravemente enfermos pronto desarrollaron SDRA, lesión cardíaca aguda, infecciones secundarias o una combinación de estas (Huang, et al., 2020). El diagnóstico de la enfermedad depende principalmente de la detección de ARN del SARS-CoV-2 a través de una muestra de hisopado nasofaríngeo, con la técnica reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, antecedentes epidemiológicos, manifestaciones clínicas e imágenes pulmonares.

A partir de la vigilancia genómica de muestras clínicas de pacientes con neumonía viral en Wuhan, China, se identificó un nuevo coronavirus (denominado 2019-nCoV) (Chan, et al., 2020; Cui, Li & Shi, 2020). El análisis filogenético de 2019-nCoV, secuenciado a partir de muestras de nueve pacientes, mostró que el virus pertenece al subgénero Sarbecovirus. 2019-nCoV fue más similar a dos cepas de coronavirus derivadas de murciélagos, bat-SL-CoVZC45 y bat-SL-CoVZXC21, que, a los conocidos coronavirus infectados por humanos, incluido el virus que causó el brote de SARS de 2003.

Epidemiológicamente, ocho de los nueve pacientes en dicho estudio tenían antecedentes de exposición al mercado de mariscos de Huanan en Wuhan, lo que sugiere que podrían haber estado en contacto cercano con la fuente de infección en el mercado. Sin embargo, un paciente nunca había visitado el mercado, aunque se había alojado en un hotel cerca del mercado antes del inicio de su enfermedad. Este hallazgo sugiere una posible

### Informe final

transmisión de gotas o que el paciente fue infectado por una fuente actualmente desconocida. La evidencia de grupos de familiares infectados y trabajadores médicos ahora ha confirmado la presencia de transmisión de persona a persona (Ng & Hiscox, 2020).

Como un virus ARN típico, la tasa de evolución media de los coronavirus es de aproximadamente  $10^{-4}$  sustituciones de nucleótidos por sitio por año, 1 con mutaciones que surgen durante cada ciclo de replicación. Por lo tanto, es sorprendente que las secuencias de 2019-nCoV de los diferentes pacientes descritos en este artículo fueran casi idénticas, con una identidad de secuencia superior al 99,9%. Este hallazgo sugiere que 2019-nCoV se originó en una fuente en un período muy corto y se detectó con relativa rapidez. Sin embargo, a medida que el virus se transmite a más individuos, se necesita una vigilancia constante de las mutaciones que surgen.

## 6.2 Respuesta inmune contra SARS-CoV-2

La invasión y la patogénesis del SARS-CoV-2 están asociadas con la respuesta inmune del huésped. La glucoproteína espiga (proteína S) en la envoltura viral se une a su receptor, la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2), en la superficie de las células humanas (Zhou, et al., 2020; Xu, et al., 2020). Un análisis de la estructura de la proteína SARS-CoV-2 S y su afinidad de unión por ACE2 mediante microscopía electrónica criogénica y resonancia de superficie mostró que la estructura de la proteína SARS-CoV-2 S es muy similar a la del SARS, aunque con diferencias menores (Wrapp, et al., 2020). La afinidad de la unión de la proteína SARS-CoV-2 S a ACE2 es de 10 a 20 veces mayor que la de la proteína SARS S, lo que sugiere que el SARS-CoV-2 podría transmitirse más fácilmente de persona a persona (Wrapp, et al., 2020).

La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra la invasión de virus. La infección viral de los mamíferos activa los receptores de reconocimiento de patrones intracelulares que perciben los patrones moleculares asociados a los patógenos, como el ARN bicatenario o el ARNm sin tapa. El reconocimiento de patrones moleculares

asociados a patógenos da como resultado respuestas inmunitarias citolíticas posteriores, principalmente a través de los interferones tipo I (IFN) y las células asesinas naturales. La inmunidad adaptativa también juega un papel importante en la eliminación viral a través de las células T citotóxicas activadas que destruyen las células infectadas por virus y las células B productoras de anticuerpos que se dirigen a los antígenos específicos de virus de pacientes con COVID-19, especialmente aquellos con neumonía severa (Huang, et al., 2020; Wan, et al., 2020; Wang, 2020). Otro estudio informó que las células T CD4 +, las células T CD8 + y las células asesinas naturales se redujeron en pacientes gravemente enfermos en comparación con aquellos con síntomas leves de la enfermedad. Además, también se observó una reducción sustancial de los recuentos de células T CD4 + y células T CD8 + en la sangre periférica en un paciente que falleció. Cabe destacar que los subconjuntos proinflamatorios de las células T, incluidas las células CCR4 + CCR6 + CD4 + (T-helper 17 o Th17) productoras de IL-17, y las células T citotóxicas que expresan granulosisina y perforina aumentaron, lo que podría ser en parte responsable de la lesión inmune grave en los pulmones de este paciente (Xu, et al., 2020).

La respuesta inmune antiviral es crucial para eliminar el virus invasor, pero una respuesta inmune antiviral robusta y persistente también podría causar una producción masiva de citoquinas inflamatorias y daños en los tejidos del huésped (Dandekar & Perlman)

2005). La sobreproducción de citoquinas causada por la activación inmune aberrante se conoce como tormenta de citoquinas. De hecho, en las últimas etapas de la enfermedad por coronavirus, incluidos el SARS, MERS y COVID-19, las tormentas de citoquinas son una causa importante de progresión de la enfermedad y eventual muerte, (Mahallawi, Khabour, Zhang, Makhdoum, & Suliman, 2018; Wong, 2004). Huang y colegas (2020) encontraron concentraciones plasmáticas aumentadas de citoquinas Th1 (p. ej., IL-1 $\beta$  e IFN $\gamma$ ) y Th2 (p. ej., IL-10). En particular, los pacientes ingresados en la unidad de cuidados intensivos (UCI) tenían concentraciones plasmáticas más altas de IL-2, IL-7, IL-10, factor estimulante de colonias de granulocitos, proteína 10 inducida por IFN $\gamma$  (IP-10), proteína quimio atrayente de macrófagos -1, proteína inflamatoria de macrófagos 1 $\alpha$  y TNF en comparación con los no admitidos en la UCI. Otros dos estudios (Wuan, et al., 2020; Fang, Zhang, Xu, Xie, Pang, & Ji, W. (2020)). También mostró que las

### **Informe final**

concentraciones plasmáticas de IL-6 estaban por encima del rango normal en pacientes con síntomas graves de COVID-19 en comparación con individuos sanos y aquellos con síntomas más leves. Mehta y colegas (2020) sugieren que la linfocitosis hemofagocítica secundaria (SHLH) podría estar asociada con casos graves de COVID-19. La SHLH es una entidad de la enfermedad caracterizada por una tormenta de citoquinas no controlada y la expansión de macrófagos o histiocitos de tejidos que exhiben actividad hemofagocítica (Hutchinson, Tattersall, & Manson, 2019). La HLH puede ser el resultado de defectos genéticos en las vías citolíticas (HLH familiar o primaria) u otras enfermedades como infección, malignidad y enfermedad reumática (Halyabar, et al. 2019,). En 1952, Farquhar y Claireaux describieron por primera vez la tormenta de citoquinas en pacientes con HLH (Farquhar, & Claireaux, 1952). Las características de la HLH, incluida la hipercitoquinemia, fiebre constante, citopenias, hiperferritinemia y daño multiorgánico, se observan comúnmente en pacientes gravemente enfermos con COVID-19 (Huang, et al., 2020; Mehta, McAuley, Brown, Sanchez, Tattersall, & Manson, 2020). Se sugiere que los macrófagos alveolares que expresan ACE2 son las células objetivo-primarias para la infección por SARS-CoV-2. Estos macrófagos activados pueden desempeñar un papel importante en la tormenta de citoquinas tipo HLH durante COVID-19 (Wuang, et al., 2020). Por lo tanto, la identificación temprana y el tratamiento adecuado de este estado hiperinflamatorio es importante para reducir la mortalidad de los pacientes con COVID-19 (Mehta, McAuley, Brown, Sanchez, Tattersall, & Manson, 2020).

- **Inmunidad:** los anticuerpos contra el virus se inducen en las personas infectadas. La evidencia preliminar sugiere que algunos de estos anticuerpos son protectores, pero esto aún no se ha establecido definitivamente. Además, se desconoce si todos los pacientes infectados tienen una respuesta inmune protectora y cuánto durará cualquier efecto protector.

Los datos sobre la inmunidad protectora después de COVID-19 están surgiendo (Zaki, van Boheemen, Bestebroer, Osterhaus, & Fouchier, 2012; Mohd, Al-Tawfiq & Memish, 2016; Wang, et al., 2020). Una serie de casos que evaluaba plasma convaleciente para el tratamiento de COVID-19 identificó actividad neutralizante en plasma de pacientes

recuperados que parecían transferirse a receptores después de la infusión de plasma (Wang, et al., 2020). De manera similar, en otro estudio de 23 pacientes que se recuperaron de COVID-19, los anticuerpos contra el dominio de unión al receptor de la proteína espigán y la proteína nucleocápside se detectaron mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) en la mayoría de los pacientes 14 días después del inicio de síntomas; Los títulos de anticuerpos ELISA se correlacionan con la actividad neutralizante (Zaki, van Boheemen, Bestebroer, Osterhaus, & Fouchier, 2012). Un estudio preliminar informó que los macacos *Rhesus* infectados con SARS-CoV-2 no desarrollaron reinfección después de la recuperación (Choi, 2018); sin embargo, este estudio no ha sido publicado en una revista revisada por pares, y se necesita más confirmación de estos hallazgos.

Como se indicó anteriormente, la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) aprobó una prueba que identifica cualitativamente los anticuerpos inmunoglobulina IgM e IgG contra el SARS-CoV-2 en suero o plasma (Dandekar, & Perlman, 2005). En caso de que la evidencia confirme que la presencia de estos anticuerpos refleja una respuesta inmunitaria protectora, la detección serológica será una herramienta importante para comprender la inmunidad de la población y distinguir a las personas con menor riesgo de reinfección.

Existe un amplio consenso de que las pruebas generalizadas de SARS-CoV-2 son esenciales para reabrir de manera segura los países. Una gran preocupación ha sido la disponibilidad de la prueba, pero la precisión de la prueba puede ser un problema mayor a largo plazo.

Si bien el debate se ha centrado en la precisión de las pruebas de anticuerpos, que identifican infecciones previas, las pruebas de diagnóstico, que identifican la infección actual, han recibido menos atención. Pero las pruebas de diagnóstico inexactas socavan los esfuerzos para contener la pandemia. Las pruebas de diagnóstico (que generalmente involucran un hisopado nasofaríngeo) pueden ser inexactas de dos maneras. Un resultado falso positivo etiqueta erróneamente a una persona infectada, con consecuencias que incluyen cuarentena innecesaria y rastreo de contactos. Los resultados falsos negativos

son más importantes porque las personas infectadas, que pueden ser asintomáticas, pueden no estar aisladas y pueden infectar a otras.

Dada la necesidad de saber qué tan bien las pruebas de diagnóstico descartan la infección, es importante revisar la evaluación de la precisión de las pruebas por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) e investigadores clínicos, así como la interpretación de los resultados de las pruebas en una pandemia.

La FDA ha otorgado autorizaciones de uso de emergencia (EUA) a fabricantes de pruebas comerciales y ha emitido una guía sobre validación de pruebas. La agencia requiere la medición del rendimiento de las pruebas analíticas y clínicas. La sensibilidad analítica indica la probabilidad de que la prueba sea positiva para material que contenga cepas de virus y la concentración mínima que la prueba puede detectar. La especificidad analítica indica la probabilidad de que la prueba sea negativa para material que contiene patógenos distintos del virus objetivo.

En una revisión sistemática previa a la impresión de cinco estudios (sin incluir los estudios Yang y Zhao), que incluyó a 957 pacientes ("bajo sospecha de COVID-19" o con "casos confirmados"), los falsos negativos oscilaron entre el 2 y el 29% (Guan, et al., 2020). Sin embargo, la certeza de la evidencia se consideró muy baja debido a la heterogeneidad de las estimaciones de sensibilidad entre los estudios, la falta de cegamiento a los resultados de las pruebas índice en el establecimiento de diagnósticos y la falta de informe de las características clave de RT-PCR (Guan, et al., 2020). En conjunto, la evidencia, aunque limitada, genera preocupación sobre los resultados frecuentes falsos negativos de RT-PCR.

Si las pruebas de diagnóstico de SARS-CoV-2 fueran perfectas, una prueba positiva significaría que alguien porta el virus y una prueba negativa que no. Con pruebas imperfectas, un resultado negativo solo significa que una persona tiene menos probabilidades de estar infectada. Para calcular la probabilidad, se puede usar el teorema de Bayes, que incorpora información sobre la persona y la precisión de la prueba (Chen, et al., 2020). Para una prueba negativa, hay dos entradas clave: la probabilidad previa a la prueba (una estimación, antes de la prueba, de la probabilidad de que la persona se

### **Informe final**

infecte) y la sensibilidad de la prueba. La probabilidad previa a la prueba puede depender de la prevalencia local de Covid-19, el historial de exposición al SARS-CoV-2 y los síntomas. Idealmente, la sensibilidad clínica y la especificidad de cada prueba se medirían en diversas situaciones de la vida real clínicamente relevantes (por ejemplo, fuentes de muestras variadas, tiempo y gravedad de la enfermedad).

### **6.3 Probabilidad de infección dada una prueba negativa en diferentes niveles de probabilidades previas**

Suponga que una prueba de RT-PCR fue perfectamente específica (siempre negativa en personas no infectadas con SARS-CoV-2) y que la probabilidad previa a la prueba para alguien que, por ejemplo, se sintió enfermo después del contacto cercano con alguien con Covid-19 fue del 20%. Si la sensibilidad de la prueba fuera del 95% (el 95% de las personas infectadas dan positivo), la probabilidad de infección posterior a la prueba con una prueba negativa sería del 1%, lo que podría ser lo suficientemente bajo como para considerar a alguien no infectado y puede brindarles seguridad en las visitas, las personas de alto riesgo. La probabilidad posterior a la prueba se mantendría por debajo del 5% incluso si la probabilidad previa a la prueba fuera tan alta como 50%, una estimación más razonable para alguien con exposición reciente y síntomas tempranos en un área de "punto caliente".

Pero la sensibilidad para muchas pruebas disponibles parece ser sustancialmente menor: los estudios citados anteriormente sugieren que el 70% es probablemente una estimación razonable. En este nivel de sensibilidad, con una probabilidad previa del 50%, la probabilidad posterior a la prueba con una prueba negativa sería del 23%, demasiado alta para asumir con seguridad que alguien no está infectado.

## **7. Estado del arte**

Los virus de ARN tienen una alta tasa de mutación debido a la falta de actividad de corrección de pruebas de las polimerasas. En consecuencia, los virus de ARN son propensos a desarrollar resistencia a las drogas y escapar de la vigilancia inmune. La tasa de mutación

### **Informe final**

del SARS-CoV-2 aún no está clara. Sin embargo, teniendo en cuenta que la mediana del número de diferencias de secuencia por pares fue de 4 (rango intercuartil, 3-6) para 110 secuencias recolectadas entre el 24 de diciembre de 2019 y el 9 de febrero de 2020, la tasa de mutación debe ser del mismo orden de magnitud en SARS-CoV ( $0,80-2,38 \times 10^{-3}$  sustitución de nucleótidos por sitio por año (Zhao, et al., 2004). La alta tasa de mutación también resulta en un alto nivel de variantes “intrahost” en los virus de ARN. La mediana del número de variantes “intrahost” en pacientes con COVID-19 fue de 4 para variantes con frecuencia  $\geq 5\%$ , y esta incidencia no difirió significativamente de la informada en un estudio sobre Ébola (655 variantes con frecuencia  $\geq 5\%$  en 134 muestras;  $P > .05$ ) (Ni et al., 2014). Vale la pena señalar que el genoma SARS-CoV-2 en pacientes podría ser muy diverso, lo que también se observó en otros virus. La alta diversidad podría aumentar potencialmente la aptitud de la población viral, lo que dificultaría su eliminación. Se necesitan más estudios para explorar cómo esto puede influir en la respuesta inmune hacia el virus y si existe una selección que actúa sobre diferentes cepas en el cuerpo humano o durante la transmisión (Ni et al., 2014).

#### **7.1 Pruebas serológicas para detección de SARS-CoV-2:**

Las pruebas serológicas que se están desarrollando pueden ayudar al diagnóstico y manejo de COVID-19 y proporcionar información sobre la cinética de la respuesta inmune, Guo, 2017 y sus colegas analizaron la cinética de la respuesta de anticuerpos de inmunoglobulina M, (IgM), IgA e IgG en pacientes infectados utilizando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) basado en la proteína de nucleocápside viral SARS-CoV-2. Los investigadores evaluaron 208 muestras de plasma de 82 casos confirmados y 58 probables de COVID-19.

Los anticuerpos se encontraron tan pronto como 1 día después del inicio de los síntomas. IgM ELISA detectó más casos que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el día 5.5 de la enfermedad. La combinación de IgM ELISA más PCR detectó el 98,6% de los casos frente al 51,9% con una sola PCR. Durante los primeros 5,5 días, la PCR tuvo una tasa de positividad más alta que la IgM; lo contrario fue cierto después del día 5.5. No se

encontró reactividad cruzada con los coronavirus comunes que causan infecciones respiratorias superiores. En un grupo familiar, los contactos familiares negativos a PCR de los casos de COVID-19 tuvieron un análisis serológico positivo, confirmando la presencia de anticuerpos en la infección asintomática.

Zhao y sus colegas evaluaron el anticuerpo total, el anticuerpo IgM y el anticuerpo IgG contra el SARS-CoV-2 en muestras de sangre en serie recolectadas de 173 pacientes (edad media, 48 años) con COVID-19 confirmado por PCR en Shenzhen, China. Las muestras de plasma se analizaron usando kits ELISA suministrados por Beijing Wantai Biological Pharmacy Enterprise Co., Ltd., Beijing, China. En las muestras recolectadas durante los primeros 7 días después del inicio de la enfermedad, las tasas positivas fueron 66.7% para PCR y 38.3% para ensayos de anticuerpos. Durante la segunda semana después del inicio de la enfermedad, las tasas positivas fueron 54.0% para PCR y 89.6% para ensayos de anticuerpos. El uso combinado de PCR y pruebas de anticuerpos mejoró la identificación de positividad a través de varias fases de la enfermedad. Los aumentos en los niveles de anticuerpos no se asociaron con la eliminación del ARN, incluso en tres pacientes con enfermedad crítica. Se encontró una fuerte correlación entre la gravedad clínica y el título de anticuerpos más de 2 semanas después del inicio de la enfermedad. El anticuerpo total fue más sensible que el anticuerpo IgM o IgG.

Li y sus colegas desarrollaron un inmunoensayo de flujo lateral que detecta los anticuerpos IgM e IgG simultáneamente y puede analizar sangre, suero y plasma con punción digital. La prueba de punto de atención proporciona resultados en 15 minutos y no requiere equipo especial. El ensayo se probó en seis provincias de China en muestras de sangre de 397 pacientes con COVID-19 confirmados por PCR y en 128 pacientes negativos. La sensibilidad general fue del 88,7% y la especificidad del 90,6%. Varios autores estaban afiliados a la compañía que desarrolló la prueba (Jiangsu Medomics Medical Technology Co., Ltd., Nanjing, China).

## 7.2 Seroprevalencia para (SARS-CoV-2).

En una Pandemia, una de las acciones principales es determinar a través de encuestas la proporción de la población que ya ha desarrollado anticuerpos contra el agente infeccioso que está causando la emergencia epidemiológica. De esa cuenta, las encuestas de seroprevalencia permiten determinar la cantidad de casos subclínicos que pueden existir y la proporción de protección que se ha alcanzado con la inmunidad de rebaño (To, et al., 2020).

China fue uno de los primeros lugares en donde se reportó la seroprevalencia de SARS-CoV-2. En Hong Kong la seroprevalencia se reportó (To, et al., 2020) en 2.7% y entre asintomáticos que retornaron de la provincia de Hubei se reportó el doble (4%). En relación con lo hallado en China, el porcentaje de asintomáticos contrasta con lo hallado en otros países donde se llega a establecer que cerca de 40% a 45% de las infecciones por SARS-CoV-2 son en pacientes asintomáticos (Oran D., 2020). En Wuhan, China, (Ling et al., 2020) el epicentro inicial de la pandemia se estableció que la seroprevalencia de IgG fue de 3.33% y en mujeres la seroprevalencia fue significativamente superior en mujeres (3.66%) que en hombres (3.01%). Como es posible observar, la seroprevalencia es mucho más baja de lo que se habría esperado. De hecho, en un estudio realizado en 193 individuos que fueron evacuados de Wuhan, China a Estados Unidos se halló que sólo 1 tenía anticuerpos para SARS-CoV-2, lo que llevó a determinar la baja posibilidad de que los evacuados de China fueran un factor de riesgo importante para importar la infección (Hallowell et al., 2020)

En la actualidad, con el interés para poder lograr la reactivación económica de los países en el mundo, y en especial, de Guatemala, es necesario contar con planes que incluyan modelos que ayuden a predecir lo que ocurriría ante una salida del confinamiento. En este sentido, contar con información de la seroprevalencia de SARS-CoV-2 es un dato clave

### **Informe final**

para incluir en los modelos de predicción, como fue el caso de Francia (Dimeglio et al., 2020).

Hasta ahora ha sido posible establecer los aspectos de seroprevalencia en una población tan afectada como lo fue China, sin embargo, este estudio pretende establecer la prevalencia en un grupo de estudiantes que realiza estudios en ambientes universitarios y hospitalarios. Estudiantes que se desenvuelven en este tipo de ambientes son equiparables a los trabajadores de salud. En un estudio realizado en el Hospital Clínico en España se evidenció que de 578 participantes que eran trabajadores de esa institución, 11.2% tenían evidencia de haber sufrido la infección (Gemma Moncunill, Alfredo Mayor, Garcia-Basteiro et al., 2020). En otro estudio realizado en una importante clínica del Norte de Alemania (Schmidt et al., 2020) se halló que la seroprevalencia en 406 individuos del personal fue de 2.7%. En otro estudio realizado en hospitales COVID-19 de Bruselas, Bélgica (Martin et al., 2020) se determinó que 11% fueron seropositivos para IgG. Es importante mencionar que en estudios en Italia (Lahner et al., 2020), se estableció que la serología IgG tiene una sensibilidad de 50% y especificidad de 99.1% (Valor Predictivo Positivo 28.6%, Valor Predictivo Negativo 99.6%). Estos hallazgos contrastan con el hecho de que estudios en países como Holanda (Kluytmans-van den Bergh et al., 2020), la detección de SARS-CoV-2 se ha reportado en no más de 1% de los trabajadores en salud.

En la literatura científica no se han encontrado estudios en Latino América o Guatemala.

## **8. Objetivo general**

- Desarrollar una prueba de detección rápida sanguínea para Coronavirus-19 (COVID-19)

## **9. Materiales y métodos**

### **9.1 Enfoque y tipo de investigación:**

Tipo de investigación y enfoque cuantitativos de desarrollo de pruebas diagnósticos.

## 9.2 Recolección de información:

- Población objetivo: No se estudiará una población
- Marco muestral: Muestras serológicas de pacientes con COVID-19 y muestras de pacientes sin COVID-19 sin identificadores personales
- Muestra: 10 muestras serológicas de pacientes con COVID-19 confirmados por RT-PCR y 10 muestras de pacientes sin COVID-19 sin identificadores personales con valores validados por Distributed Bio-Centivax, San Francisco California. La anterior muestra fue por conveniencia debido a la cantidad escasa de sueros positivos y negativos para validación.

Se realizaron 4 repeticiones (replicas) del protocolo desarrollado. Las repeticiones fueron a conveniencia debido a las limitaciones planteadas por los reactivos.

- Selección de la muestra: No aplica

## 9.3 Recolección de información:

Se desarrolló este protocolo:

**Centivax-USAC SARS-CoV-2 Antibody Assay (CUSAA)**, Sarah Ives, P.S.M. Director of Contract Research, Distributed Bio Inc. Co-Founder, Centivax Inc. Profesora Afiliada, Unidad de Salud, Universidad de San Carlos de Guatemala, September 18, 2020

Propósito: Detectar y cuantificar los niveles de anticuerpos IgG de donantes candidatos que se dirigen al dominio de unión al receptor de la proteína de pico en el virus SARS-CoV-2, para comparar con sus respectivas capacidades de neutralización y permitir la

selección de donantes de primer nivel para pacientes convalecientes. Terapia con plasma para aumentar la eficacia clínica del tratamiento.

**Materiales:**

*A temperatura ambiente:*

- Assay Plates = 96 Well Clear Flat Bottom Polystyrene High Bind Microplate polystyrene high-binding plates, Corning #9018.
- Dilution Plates = 1mL or 2mL 96-well deep-well Polypropylene
- 20x PBS Solución, Teknova P0191.
- 20X PBS Solution with 1% Tween-20, Teknova P1192.
- P2 1-2uL single channel pipette (do not pipette volumes <1 uL).
- P20 2-20uL pipeta.
- P1000 100-1000uL pipeta.
- P20 2-20uL 12-channel pipeta multi canal.
- P1000 or P1200 12-channel multichannel pipette capable of pipetting 200-600 uL ranges.
- 96-well plate reader capable of detecting absorbance at 450nm.
- 25mL and 100mL reagent reservoirs.

- Plastic sealing film plate covers, Qiagen
- Orbital microplate shaker with >600rpm, ideally capable of fitting 4 Assay Plates
- Rubber bands to stack and secure additional Assay Plates on top, when needed
- 50mL sterile conical tubes for diluting 5% BSA, RBD coating, or secondary antibody, if necessary
- 1.8 mL Eppendorf tubos
- 5 mL Eppendorf tubos
- 500-mL sterile filtration
- 2L plastic bottles for 1xPBS and 1xPBS-T non-sterile wash solutions.
- 1N (1M) HCl or 1N (0.5M) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Cloro
- Shallow, wide plastic bucket for making a 10% bleach solution
- Bolsa derechos biodegradable

*En refrigeración (4°C):*

- TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) Liquid Substrate System for ELISA, Sigma-Aldrich, T0440-100ML.

- BSA (Bovine Serum Albumin - Fraction V), Rockland BSA-50 : -80 ° C, para almacenar a 4 ° C una vez descongelada y abierta cada alícuota.
- SARS-CoV-2 Spike RBD HIS, Sino Biological, cat #40592-V08H, lot #MA14AP1602
- Goat anti-huFc HRP (Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fcγ fragment specific (min X Bov, Hrs, Ms Sr Prot)), Jackson ImmunoResearch, cat# 109-035-098, lot# 147160
- Centivax-E2 anti-RBD positive control antibody, 1 mg/mL stock

#### **9.4 Pasos**

##### El Primer día de la prueba

1. Recubra cada pocillo de las placas de ensayo con proteína RBD diluida a 1 ug / mL en 1xPBS estéril, o solo 1xPBS estéril, 50 uL / pocillo usando una pipeta P200 de 12 canales, durante la noche 4C, sin agitar. Consulte la Figura 1 a continuación para ver el diseño del revestimiento de todas las placas de ensayo.
2. Descongele completamente una alícuota de proteína Spike RBD dejándola que alcance la temperatura ambiente en la mesa. Una vez descongelado, antes de abrir la tapa, hágalo girar en una centrífuga brevemente a 1000xG durante unos 10 segundos.
3. Para diluir la proteína RBD, use las siguientes fórmulas para tener en cuenta el 10% del volumen de pipeteo adicional: # de mL de PBS = # de placas x 96 pocillos / placa x 0.055mL / pocillo

Ejemplo: (4 placas) x (96 pocillos / placa) x (0,055 ml / pocillo) = 21,12 ml de PBS

Agregue este volumen de PBS anterior al depósito de reactivo con una pipeta serológica.

**Informe final**

$$\# \text{ de uL de proteína RBD} = \frac{(\# \text{ de mL de PBS}) \times (1 \text{ ug / mL})}{(\text{Solución madre de } 1,34 \text{ ug / ul})}$$

Ejemplo:  $\frac{(21,12 \text{ mL de PBS}) \times (1 \text{ ug / mL})}{(\text{Solución madre de } 1,34 \text{ ug / ul})} = 15,8 \text{ uL de proteína RBD}$

Antes de agregar la proteína RBD stock al PBS, use una pipeta P20 para eliminar 15,8 uL de PBS del depósito (o la cantidad apropiada como se calculó directamente arriba). A continuación, agregue la proteína RBD de stock al depósito en la misma cantidad.

1. Mézclelo bien en el depósito pipeteando hacia arriba y hacia abajo con una pipeta P1000 o una pipeta serológica.
2. Agregue el mismo volumen de solo PBS a un nuevo depósito de reactivo, para los pocillos de solo PBS.
3. Para dispensar solo PBS, use una pipeta multicanal con 8 puntas a la vez y toque las puntas con los lados de los pocillos en la placa de ensayo para asegurarse de que todo el líquido se transfiera con precisión. No hagas burbujas. Se pueden utilizar las mismas 8 puntas para todas las columnas de las placas de ensayo que solo contendrán PBS.
4. Para dispensar el RBD diluido, use una pipeta multicanal con 8 puntas a la vez y toque las puntas con los lados de los pocillos en la placa de ensayo para asegurarse de que todo el líquido se transfiera con precisión. No hagas burbujas. Se pueden usar las mismas 8 puntas para todas las columnas de las placas de ensayo que contendrán RBD.
5. Después de cada ensayo, la placa se recubre con RBD y PBS. Golpee suavemente los lados de la placa para que la tensión superficial se libere y el líquido cubra completamente el fondo de cada pocillo.

6. Coloque una película de sellado de plástico en cada placa y almacene a 4C durante la noche.
7. Una vez que se descongela y se abre una alícuota de stock de RBD, se puede almacenar a 4 ° C durante 5-6 semanas para su uso continuado (etiquete con la fecha y sus iniciales). Después de 6 semanas, deséchelo y descongele una nueva alícuota la próxima vez que lo necesite.

**Figura 1.** PBS solo y RBD diluidos en PBS a 1ug / mL en columnas alternas de cada placa de ensayo.

Assay Plates - RBD coating												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	RBD										
B	PBS	RBD										
C	PBS	RBD										
D	PBS	RBD										
E	PBS	RBD										
F	PBS	RBD										
G	PBS	RBD										
H	PBS	RBD										

A la mañana siguiente:

1. Prepare un volumen adecuado de BSA al 5% en PBS para el día a partir de la solución madre al 10% de BSA en PBS (consulte el Apéndice I)
2. Lavar las placas 3 veces con PBS-T, 300 uL / pocillo. Seque con palmaditas boca abajo sobre toallas de papel.
3. Deseche la película de sellado de plástico del paso de recubrimiento.
4. Para bloquear las placas, agregue 250 uL de BSA al 5% a cada pocillo con una pipeta P1000 de 12 canales. Cubra y deje reposar en la mesa de trabajo durante 2 horas, sin agitar.

5. Puede dejar las placas descubiertas en este paso o usar una nueva película de sellado de plástico para cubrirlas.
  
6. Inicie los siguientes pasos del protocolo de inmediato porque puede llevar las 2 horas completas, especialmente si no está muy familiarizado con el proceso. Si la preparación de la dilución de plasma tarda más de 2 horas, está bien. El bloqueo del 5% de BSA es el único paso del protocolo que puede durar más del tiempo especificado. Tenga cuidado de no dejar que ninguna incubación que no sea esta dure más tiempo.
  
7. Mientras las placas se bloquean en BSA:
  - a. Descongele las muestras de plasma, si están congeladas, dejándolas reposar sobre la mesa, a temperatura ambiente.
  
  - b. Configure las placas de dilución de acuerdo con la Figura 2 a continuación agregando 5% de BSA a los pocillos correspondientes.
  
  - c. Añada 556,5 uL a cada pocillo de las filas A y E con una pipeta de 12 canales P1000
  
  - d. Agregue 250 uL a cada pocillo en las filas B-D y R-H con una pipeta de 12 canales P1000

**Figura 2.** Disposición de la placa de dilución

Dilution Plate 1 - Plasma Sample Preparation														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	ul. of 5% BSA	
1:160	A	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 11	Sample 12	Sample 13	Sample 16	Sample 17	Sample 18	556.5
1:320	B													250
1:640	C													250
1:1280	D													250
1:160	E	Sample 4	Centi-E2	Sample 5	Sample 9	Centi-E2	Sample 10	Sample 14	Centi-E2	Sample 15	Sample 19	Centi-E2	Sample 20	556.5
1:320	F													250
1:640	G													250
1:1280	H													250
		These samples for Assay Plate 1			These samples for Assay Plate 2			These samples for Assay Plate 3			These samples for Assay Plate 4			

**Informe final**

Primero agregue 5% de BSA a cada pocillo, utilizando los volúmenes especificados a la derecha. La placa de dilución 2, 3, etc. será la misma, excepto que contendrá las siguientes muestras de plasma consecutivas.

8. Cada muestra de plasma se prepara con una dilución inicial de 1: 160 y luego se diluye en serie 2 veces hasta 1: 1280.
9. Todas las puntas de pipeta utilizadas en la dilución y la placa de las muestras de plasma (Pasos 5c, 5e, 7b-e) deben desecharse en una bolsa / contenedor de residuos biológicos peligrosos BLS-2.
10. Para la dilución inicial en la Fila A, agregue 3.5 uL de Muestra de plasma 1 al pocillo A01, usando una pipeta de un solo canal. Añada 3,5 uL de muestra de plasma 2 al pocillo A02, etc. Asegúrese de que las muestras de plasma estén completamente descongeladas primero y asegúrese de mezclarlas bien pipeteando arriba y abajo en el tubo de plasma antes de añadir la muestra a la placa de dilución.
11. Salte el pocillo E2, ya que se reservará para el anticuerpo de control positivo Centivax-E2.
12. Salte también los pocillos E5, E8, E11, para reservarlos para el anticuerpo de control positivo Centivax-E2.
13. Una vez que se hayan agregado todas las muestras de plasma a las filas A y E, use una pipeta de 12 canales P1000 ajustada a 250 uL para mezclar bien el plasma con el 5% de BSA en todas las muestras de las filas A y E.
14. Prepare el anticuerpo de control positivo.
15. El anticuerpo de control positivo Centivax-E2 debe analizarse en cada placa de ensayo.

**Informe final**

16. Descongele completamente una alícuota del anticuerpo de control positivo Centivax-E2 dejándolo a temperatura ambiente en la mesa. Una vez descongelado, antes de abrir la tapa, hágalo girar en una centrífuga brevemente a 1000xG durante unos 10 segundos. Esto se puede hacer con anticipación, tan pronto como se haya enchapado el paso de bloqueo.
  
17. La solución madre es de 1 mg / mL. Diluya a 0.1 mg / mL pipeteando 45 uL de PBS en un tubo de PCR de 200 uL o tubo Eppendorf de 1.8mL, luego agregue 5 uL de solución madre de anticuerpo. Mezclar bien pipeteando.
  
18. Agregue 0.1 mg / mL de anticuerpo E2 al pocillo E2 de la Placa de dilución 1 para que la concentración de trabajo sea de 0.5 ug / mL en el pocillo: agregue 3 uL de 0.1 ug / mL stock a los 556.5uL de BSA en E2. Mezclar bien pipeteando hacia arriba y hacia abajo con una pipeta P1000.
  - a. También agregue 3 uL de 0.1 mg / mL de anticuerpo E2 al pocillo E5 de la placa de dilución 1,
  
  - b. y a la placa de dilución 1 pocillo E8,
  
  - c. y a la placa de dilución 1 pocillo E11,
  
  - d. y a la placa de dilución 2, pocillo E2, y así sucesivamente, de modo que Centivax-E2 se agregará a cada placa de ensayo más adelante en el paso 6.
  
19. Si el laboratorio está analizando más de 60 donantes de plasma por día (que serán más de 3 placas de dilución), debe preparar más de 50 uL de 0.1 mg / mL de anticuerpo E2. En su lugar, prepare 100 uL agregando 10 uL de 1 mg / ml de stock a 90 uL de PBS.

**Informe final**

20. Si al final del día le sobraron 0,1 mg / ml de anticuerpo E2, NO lo reutilice. Siempre hágalo fresco el día de su uso, ya que el anticuerpo no es estable a concentraciones bajas durante más de 1 día, incluso si se almacena a 4°C.
  
21. El anticuerpo E2 de reserva de 1 mg / ml sobrante se puede almacenar en el refrigerador 4C durante 8-10 semanas para su uso continuo. Después de eso, deséchelo y descongele un tubo de stock nuevo.
  
22. Haga diluciones seriadas al doble de cada muestra de anticuerpo de control y plasma:
  - a. Todas las puntas de pipeta utilizadas en la dilución y la placa de las muestras de plasma (Pasos 5c, 5e, 7b-e) deben desecharse en una bolsa / contenedor de residuos biológicos peligrosos BLS-2.
  
  - b. Con una pipeta de 12 canales P1000 ajustada a 250 uL, pipetee 250 uL de cada pocillo en la Fila A y mézclelo en el pocillo de abajo en la Fila B pipeteando hacia arriba y hacia abajo 5-6 veces. No haga burbujas. Deseche las puntas después de mezclar.
  
  - c. Usando nuevas puntas en el multicanal, pipetee 250 uL de cada pocillo en la Fila B y mézclelo en la Fila C pipeteando hacia arriba y hacia abajo 5-6 veces. No haga burbujas. Deseche las puntas después de mezclar.
  
  - d. Utilizando nuevas puntas en el multicanal, pipetee 250 uL de cada pocillo de la Fila C y mézclelo en la Fila D pipeteando arriba y abajo 5-6 veces. No haga burbujas. Deseche las puntas después de mezclar. La fila D debe tener el doble de volumen de líquido que las filas A-C (500 uL).
  
  - e. NO diluya en serie la Fila D en la Fila E, o deberá volver a hacer todas las muestras en la Fila E.

**Informe final**

- f. Cubra las placas de dilución y déjelas a un lado en la mesa de trabajo si queda tiempo en la incubación de las placas de ensayo.
23. Después de bloquear las placas durante 2 horas, elimine el 5% de BSA de las placas de ensayo y seque con toallas de papel. No lavar.
24. Añada plasma diluido de la placa de dilución a la placa de ensayo como se indica a continuación, también ilustrado en las figuras 2 y 3:
- a. Todas las puntas de pipeta utilizadas en la dilución y la placa de las muestras de plasma (Pasos 5c, 5e, 7b-e) deben desecharse en una bolsa / contenedor de residuos biológicos peligrosos BLS-2.
- b. Utilizando un canal de 12 colocados arriba-abajo (en lugar de lado a lado), igual que en la posición para recubrir las placas, asegure 8 puntas y pipetee 50 uL de cada pocillo en la columna 1 (filas AH) de la placa de dilución 1. Agregue a la columna 1 de la placa de ensayo. Toque con las puntas los lados de los pocillos de la placa de ensayo para asegurarse de que todo el líquido se transfiera con precisión. No haga burbujas. No mezcle las muestras hacia arriba y hacia abajo con la pipeta una vez en la placa de ensayo.
- c. Sin descartar las puntas, vuelva a la columna 1 de la placa de dilución 1 y pipetee 50 uL, agréguelo a la columna 2 de la placa de ensayo 1.
- d. Añada 50 uL de la columna 1 de la placa de dilución 1 a la columna 3 de la placa de ensayo 1.
- e. Añada 50 uL de la columna 1 de la placa de dilución 1 a la columna 4 de la placa de ensayo 1. Deseche las puntas. La columna 1 de la placa de dilución 1 debería estar casi vacía ahora.

**Informe final**

- f. Con 8 puntas nuevas, agregue 50 uL de la columna 2 de la placa de dilución 1 en la columna 5 de la placa de ensayo 1. Repita para las columnas 6, 7, 8 de la placa de ensayo 1. Deseche las puntas.
- g. Con 8 puntas nuevas, agregue 50 uL de la columna 3 de la placa de dilución 1 en la columna 9 de la placa de ensayo 1. Repita para las columnas 10, 11, 12 de la placa de ensayo 1. Deseche las puntas.
- h. Continúe colocando las siguientes muestras de las columnas 4, 5, 6 de la placa de dilución 1 en la placa de ensayo 2 y así sucesivamente hasta que todas las muestras se hayan transferido por cuadruplicado de la placa de dilución a la placa de ensayo. Deseche las puntas.
- i. Cubra las placas de ensayo con una película selladora de plástico nueva, incube 1 hora en un agitador orbital, a temperatura ambiente.

**Figura 3.** Las muestras de plasma preparadas en las placas de dilución se transfieren a las placas de ensayo utilizando este diseño.

Assay Plate 1 - Plasma Samples												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1:160	A	Sample 1	Sample 1	Sample 1	Sample 1	Sample 2	Sample 2	Sample 2	Sample 2	Sample 3	Sample 3	Sample 3
1:320	B	Sample 1	Sample 1	Sample 1	Sample 1	Sample 2	Sample 2	Sample 2	Sample 2	Sample 3	Sample 3	Sample 3
1:640	C	Sample 1	Sample 1	Sample 1	Sample 1	Sample 2	Sample 2	Sample 2	Sample 2	Sample 3	Sample 3	Sample 3
1:1280	D	Sample 1	Sample 1	Sample 1	Sample 1	Sample 2	Sample 2	Sample 2	Sample 2	Sample 3	Sample 3	Sample 3
1:160	E	Sample 4	Sample 4	Sample 4	Sample 4	Centi-E2	Centi-E2	Centi-E2	Centi-E2	Sample 5	Sample 5	Sample 5
1:320	F	Sample 4	Sample 4	Sample 4	Sample 4	Centi-E2	Centi-E2	Centi-E2	Centi-E2	Sample 5	Sample 5	Sample 5
1:640	G	Sample 4	Sample 4	Sample 4	Sample 4	Centi-E2	Centi-E2	Centi-E2	Centi-E2	Sample 5	Sample 5	Sample 5
1:1280	H	Sample 4	Sample 4	Sample 4	Sample 4	Centi-E2	Centi-E2	Centi-E2	Centi-E2	Sample 5	Sample 5	Sample 5
Assay Plate 2 - Plasma Samples												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1:160	A	Sample 6	Sample 6	Sample 6	Sample 6	Sample 7	Sample 7	Sample 7	Sample 7	Sample 8	Sample 8	Sample 8
1:320	B	Sample 6	Sample 6	Sample 6	Sample 6	Sample 7	Sample 7	Sample 7	Sample 7	Sample 8	Sample 8	Sample 8
1:640	C	Sample 6	Sample 6	Sample 6	Sample 6	Sample 7	Sample 7	Sample 7	Sample 7	Sample 8	Sample 8	Sample 8
1:1280	D	Sample 6	Sample 6	Sample 6	Sample 6	Sample 7	Sample 7	Sample 7	Sample 7	Sample 8	Sample 8	Sample 8
1:160	E	Sample 9	Sample 9	Sample 9	Sample 9	Centi-E2	Centi-E2	Centi-E2	Centi-E2	Sample 10	Sample 10	Sample 10
1:320	F	Sample 9	Sample 9	Sample 9	Sample 9	Centi-E2	Centi-E2	Centi-E2	Centi-E2	Sample 10	Sample 10	Sample 10
1:640	G	Sample 9	Sample 9	Sample 9	Sample 9	Centi-E2	Centi-E2	Centi-E2	Centi-E2	Sample 10	Sample 10	Sample 10
1:1280	H	Sample 9	Sample 9	Sample 9	Sample 9	Centi-E2	Centi-E2	Centi-E2	Centi-E2	Sample 10	Sample 10	Sample 10
Likewise for Assay Plate 3 with Samples 11-15, and Assay Plate 4 with Samples 16-20, and additional Assay Plates if needed.												

**Informe final**

25. Mientras las placas de ensayo se incuban con plasma, retire el reactivo de detección de TMB del refrigerador y deje que la botella alcance la temperatura ambiente en la mesa hasta que sea necesario. Es importante que el TMB esté a temperatura ambiente cuando se utilice.
26. Mientras las placas de ensayo se incuban con plasma, prepare el anticuerpo secundario (Fc HRP antihumano de cabra) diluido 1: 10.000 en BSA al 5%. Coloque en un nuevo depósito de reactivo. Esto se puede iniciar cuando quedan 10-15 minutos en la incubación con plasma de 1 hora, de modo que el anticuerpo secundario no se exponga a la luz durante demasiado tiempo.
- a. Descongele completamente una alícuota de anticuerpo secundario dejándola que alcance la temperatura ambiente en la mesa de trabajo (hágalo con anticipación, tan pronto como el plasma esté incubando en las placas de ensayo). Una vez descongelado, antes de abrir la tapa, hágalo girar en una centrífuga brevemente a 1000xG durante unos 10 segundos.

Para diluir el anticuerpo secundario unos 15 minutos antes de que finalice la incubación del plasma de 1 hora, utilice la siguiente fórmula para tener en cuenta el volumen de pipeteo adicional: # de ml de BSA al 5% = # de placas x 96 pocillos / placa x 0,055 ml / pocillo. Ejemplo: (4 placas) x (96 pocillos / placa) x (0,055 ml / pocillo) = 21,12 ml de BSA al 5%

Agregue este volumen de BSA al 5% anterior al depósito de reactivo con una pipeta serológica.

$$\# \text{ de uL de anticuerpo secundario} = 1000 \times \frac{(\# \text{ de mL de BSA al } 5\%)}{10,000}$$

$$\text{Ejemplo: } 1000 \times \frac{(21,12 \text{ ml de BSA al } 5\%)}{10,000 \text{ anticuerpos}} = 2,1 \text{ uL secundario}$$

Una vez agregado, pipetee hacia arriba y hacia abajo con P1000 o una pipeta serológica para mezclar bien. Si el volumen es <10 uL, no es necesario eliminar este volumen de BSA primero del depósito.

1. Escriba la fecha y sus iniciales en el tubo de anticuerpo secundario. Puede almacenarse a 4 ° C durante 6-8 semanas y ser utilizado por usted u otras personas. Después de 6 a 8 semanas, deséchelo y descongele un tubo nuevo. Manténgalo alejado de la luz tanto como sea posible.
2. Cuando se haya completado la incubación del plasma de 1 hora, vierta el plasma diluido en un balde grande y poco profundo que contenga lejía al 10% en agua. Tenga cuidado de volcar los platos directamente hacia abajo y lo suficientemente lejos de la playa; NO deje que el blanqueador salpique las placas o los resultados serán inutilizables.
3. Lavar las placas 3 veces con PBS-T, 300 uL / pocillo. Seque.
  - a. Cuando retire la cubierta de la película de sellado de plástico, sostenga y estabilice las placas de forma segura en la mesa de trabajo para que el líquido de los pocillos no salte / gotee a otros pocillos cuando retire la película de sellado. Guarde la película de sellado de plástico en este paso; se puede reutilizar para la incubación de anticuerpos secundarios. Si cae líquido en la parte inferior de la película de sellado, deséchelo y utilice una nueva película de sellado para la siguiente incubación.
4. Añada anticuerpo secundario de cabra anti-Fc HRP humana a las placas de ensayo utilizando una pipeta de 12 canales, 50 uL / pocillo. Se pueden usar las mismas 12 puntas para todas las filas en todas las placas de ensayo. No toque las puntas de los lados o el fondo de los pozos. Si alguna de las puntas se toca, deseche las puntas y obtenga nuevas puntas para los pocillos restantes.

- a. Cubrir con película plástica, incubar 30 min, temperatura ambiente en agitador orbital
  
5. Lavar las placas 3 veces con PBS-T, 300 uL / pocillo. Seque.
  
6. Lavar las placas 2 veces con PBS, 300 uL / pocillo. Seque.
  
7. Agregue el reactivo de detección de TMB a las placas de ensayo utilizando multicanal de 12 canales, 50 uL / pocillo. Se pueden usar las mismas 12 puntas para todas las filas en todas las placas de ensayo. No toque las puntas de los lados o el fondo de los pozos. Si alguna de las puntas se toca, deseche las puntas y obtenga nuevas puntas para los pocillos restantes.
  - a. Al preparar la TMB, utilice la siguiente fórmula para tener en cuenta el volumen de pipeteo adicional:  $\# \text{ de mL de TMB} = \# \text{ de placas} \times 96 \text{ pocillos / placa} \times 0.055 \text{ mL / pocillo}$ . Ejemplo:  $(4 \text{ placas}) \times (96 \text{ pocillos / placa}) \times (0.055 \text{ mL / pocillo}) = 21.12 \text{ mL TMB}$

Agregue este volumen de TMB anterior al depósito de reactivo con una pipeta serológica.

El TMB debe quedar claro al sacarlo del frasco con una pipeta serológica. Si es azul o tiene un tinte azul, tírelo por el desagüe y abra una botella nueva. Mida siempre la cantidad exacta que necesita; NO arroje directamente de la botella al depósito.

1. Si queda TMB en el depósito después de agregarlo a las placas, NO lo recicle agregándolo nuevamente a la botella. Vierta el resto del depósito por el desagüe.
  
2. Agregue TMB a las placas en orden: comience con la placa de ensayo 1, luego la placa de ensayo 2, 3, etc.

3. Desarrolle la reacción dejando que las placas se asienten sin tapar en la mesa de trabajo durante 8-10 minutos, sin agitar. Inicie el temporizador cuando termine de agregar TMB a la placa de ensayo 1.
4. En cada placa de ensayo, los pocillos de control negativo E5, F5, G5, H5, E7, F7, G7, H7 deben ser transparentes y los pocillos de control positivo E6, F6, G6, H6, E8, F8, G6, H8 deben ser de color azul oscuro después de 8-10 minutos.
5. Si los pocillos de los controles negativos comienzan a ponerse azules, vaya al paso 14 y detenga la reacción inmediatamente con HCl 1N, incluso si la TMB solo se ha desarrollado durante unos 5 minutos.
6. Si los pocillos de control positivo aún no son de color azul profundo a los 8-10 minutos y los pocillos de control negativo están claros, deje que la reacción se desarrolle de 1 a 2 minutos más o hasta que se observe un azul profundo, mientras se asegura de que los pocillos de control negativo no giren. azul. Si los pocillos de control negativo comienzan a ponerse azules pero los pozos de control positivo aún no han alcanzado un color azul profundo, detenga la reacción inmediatamente de todos modos.
7. Para detener la reacción, agregue HCl 1N a las placas de ensayo utilizando multicanal de 12 canales, 50 uL / pocillo. Se pueden usar las mismas 12 puntas para todas las filas en todas las placas de ensayo. No toque las puntas de los lados o el fondo de los pozos. Si alguna de las puntas se toca, deseche las puntas y obtenga nuevas puntas para los pocillos restantes.
8. Agregue HCl a las placas en orden: comience con la placa de ensayo 1, luego la placa de ensayo 2, 3, etc.
9. Al preparar el HCl, utilice la siguiente fórmula para tener en cuenta el volumen de pipeteo adicional: # de mL de HCl = # de placas x 96 pozos x 0.055mL / pocillo. Ejemplo: (4 placas) x (96 pocillos / placa) x (0.055 mL / pocillo) = 21.12 mL HCl 1N

Agregue este volumen de HCl 1N anterior a un depósito de reactivo con una pipeta serológica.

1. Verifique que las placas no goteen en la parte superior de los pocillos. Si es así, aplique suavemente KimWipe sin dejar que KimWipe toque el líquido del pozo. No use toallas de papel porque las fibras pueden caer dentro de los pocillos, lo que afectará la lectura de absorbancia.
2. Se puede usar H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N (0.5 M) en lugar de HCl 1N, si es necesario.
3. Lea las placas de ensayo inmediatamente en un lector de placas que mide la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm.
  - a. Lea las placas en orden: comience con la placa de ensayo 1, luego la placa de ensayo 2, 3, etc.
4. No deje que las placas se asienten durante más de 5 a 10 minutos antes de la lectura, o la medición de la absorbancia podría ser inexacta. Leer inmediatamente. Si alguno de los pozos ha cambiado de amarillo a marrón, ha pasado demasiado tiempo y la medición de OD<sub>450nm</sub> será inexacta
5. Limpieza
  - a. Deseche los siguientes líquidos tirando por el fregadero, BSL-1 OK:
    - a. Sobra 5% de BSA (a menos que pueda usarlo al día siguiente, entonces está bien usarlo)
    - b. Anticuerpo secundario sobrante diluido 1: 10,000 en BSA (NO reutilizar al día siguiente)

**Informe final**

- c. TMB sobrante (NO reutilizar al día siguiente si hay sobras en el depósito)
  
- d. HCl sobrante
  
6. Agregue agua al depósito antes de tirarlo por el desagüe para que el ácido no dañe las tuberías del fregadero.
  - a. Si el HCl que queda en el depósito es transparente y está libre de desechos como polvo y suciedad, se puede verter con cuidado en la botella de vidrio de HCl 1N y reutilizar.
  
7. Cualquier hielo usado en cubos de hielo
  
8. Restos de RBD y PBS diluidos de las placas de recubrimiento la noche anterior (NO reutilizar al día siguiente)
  
9. Deseche los siguientes plásticos en la basura normal, BSL-1 OK:
  
10. Depósitos de reactivo vacíos
  
11. Puntas de pipeta que se utilizaron para cualquier otra cosa que no sean diluciones y placas de muestras de plasma
  
12. Vacíe las placas de ensayo después de leer la absorbancia y verter el líquido en el fregadero (el HCl ha desactivado el plasma, por lo que ya no es BSL-2)
  
13. Vacíe las placas de dilución después de agregar 500 uL de lejía al 10% a cada pocillo, remojar durante 10 minutos y verter el líquido en el fregadero.
  
14. Botellas vacías de la unidad de filtración

15. Los siguientes plásticos deben desecharse en una bolsa / contenedor de residuos biopeligrosos BSL-2:

16. Puntas de pipeta utilizadas para diluir y platear muestras de plasma

17. Viales vacíos de muestras de plasma

Una vez que las botellas de lavado 1xPBS y 1xPBS-T están vacías, se pueden enjuagar y volver a llenar con nuevas 1xPBS y 1xPBS-T diluidas a partir de soluciones madre 20x. Se recomienda enjuagarlos con lejía al 10% y luego a fondo con agua al menos 3 veces, aproximadamente una vez al mes.

### 9.5 Operacionalización de la variable

Variable	Definición Conceptual	Definición operacional	Tipo de Variable	Escala de medición
PRUEBA DE DETECCIÓN RÁPIDA SANGUÍNEA PARA CORONAVIRUS-19 – COVID-19- Sars-cov-2	Prueba de tipo cuantitativa de detección rápida a través de metodología ELISA para CORONAVIRUS-19 –COVID-19- Sars-cov-2.	A través de la lectura de Densidades Ópticas (D.O.).	Cualitativa	Nominal

### 9.6 Procesamiento y análisis de la información:

A través de la lectura de Densidades Ópticas (D.O.), se analizó la variable a estudio, la cual se introdujo a un software (programa de la computadora donde se realizó la lectura de las densidades ópticas es Xcheck filtro 450, así mismo el lector de ELISA Biotek LX 800) proporcionado por el laboratorio que dará la transferencia de tecnología, para luego

### Informe final

obtener la interpretación. Esta salió en una forma de una matriz Excel que luego fue trasladada y realizada una comparación Inter laboratorios (ver Imágenes 1 al 10) entre San Francisco y la Universidad de San Carlos de Guatemala (ver anexo de Base de Datos de la validación).

## 10. Vinculación, difusión y divulgación

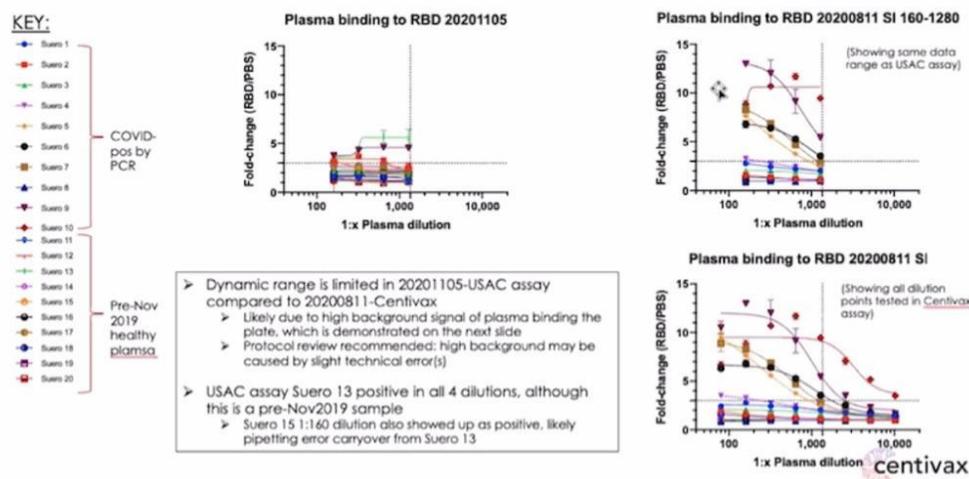
La divulgación de este estudio se realizó a través de una conferencia coordinada por la Universidad de San Carlos de Guatemala a autoridades, comunidad académica, científica y población general. Además, se realizaron entrevistas en los periódicos nacionales y radiales.

## 11. Productos, hallazgos, conocimientos o resultados:

- Se desarrolló e implementó una prueba para medir anticuerpos tipo IgG ELISA para COVID-19 y poder titular sueros de pacientes positivos con PCR para COVID 19, para que puedan donar plasma para salvar la vida de pacientes con coronavirus.
- Un proceso sistematizado para desarrollar pruebas de tamizaje para futuras pandemias

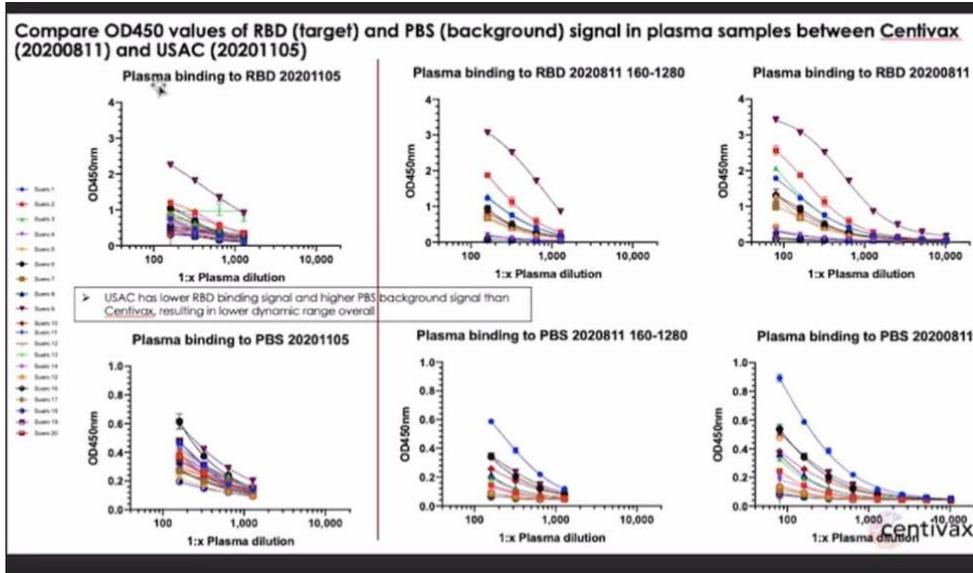
**Imagen 1.** Reproducibilidad del ensayo de muestras entre Centivax y USAC

Assay reproducibility of plasma samples between Centivax (20200811) and USAC (20201105)

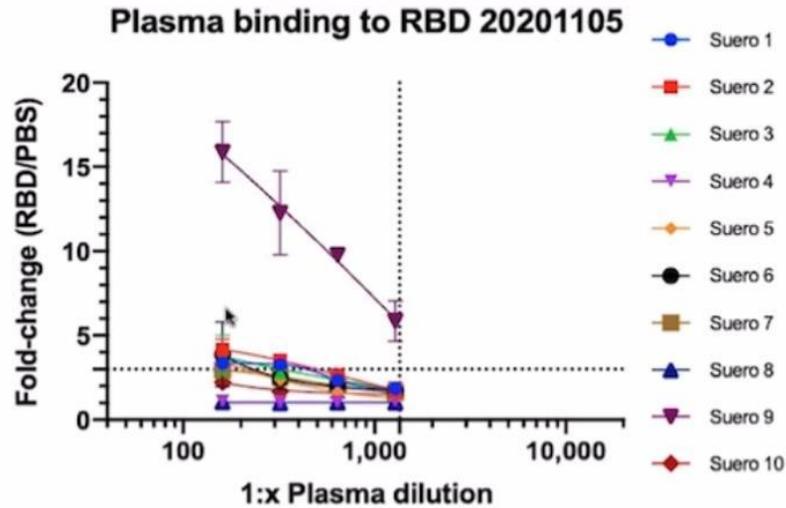


**Informe final**

**Imagen 2.** Comparación de valores entre RBD y PBS en muestras de suero entre Centivax y USAC



**Imagen 3.** Unión de plasma a RBD



## **12. Análisis y discusión de resultados:**

Para cumplir con el objetivo general de este estudio se implementaron los procedimientos más fundamentales de verificación y validación de ensayos de diagnóstico en virología clínica. Lo altamente complejo fue identificar las técnicas de detección de anticuerpos para el Nuevo Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo 2 (SARS-CoV-2 por sus siglas en inglés). El método desarrollado por la MSc Sarah Ives se basó específicamente en hacer más de 20 pruebas utilizando todas las posibles combinaciones de reactivos e insumos que lograran la mejor fijación del Dominio del Receptor de Unión (RBD por sus siglas de detección) en la prueba, tanto de las muestras como del control que fue desarrollado por el mismo equipo de Distributed Bio-Centivax. Estos aspectos técnicos fueron de suma importancia, pues la prueba tiene una de las características más importantes es que no sólo mejora la sensibilidad y la especificidad sobre una base cuantitativa, haciéndola idónea para detectar niveles de Inmunoglobulinas G (de memoria de largo plazo) que identifican a los pacientes que ya estuvieron expuestos, sino además, permite distinguirlos de quienes han obtenido los más elevados niveles para ser seleccionados como donantes de plasma para ser aplicado en medicina transfusional de emergencia. Y al hacerlo de forma consistente, se logra un nivel consistente de calidad que mejora la posibilidad de eficacia o efectividad que podría tener su aplicación en ensayos clínicos.

Luego la transferencia tecnológica no sólo requirió habilidades de importación de insumos, sino de gestión de estos para replicar exactamente el protocolo en cada corrida que se realizó para desarrollar la prueba. Esto último fue central pues con la verificación aplicada, se alcanzaron consistentemente las especificaciones predeterminadas que la Dra. Sarah Ives estableció como Ingeniera Inmunóloga, lo cual quedó registrado en las presentaciones que se realizaron después de cada corrida de la prueba.

## **13. Conclusiones**

- Se desarrollo una prueba de detección rápida sanguínea para coronavirus-19 –covid-19-sars-cov-2.

- Se logró un proceso sistematizado para desarrollar pruebas de tamizaje para futuras pandemias

#### **14. Impacto esperado**

Las pruebas de diagnóstico de detección de anticuerpos de tipo IgG, ayudarán a abrir la Universidad y el país de manera segura, lo cual es una prioridad urgente. También, existe el potencial de que este estudio permita desarrollar métodos (por ejemplo, reglas de predicción) para estimar la probabilidad de infección previa a la prueba (para personas asintomáticas y sintomáticas) y entonces permitir el cálculo de las probabilidades posteriores a la prueba después de resultados positivos o negativos. Además, será posible tamizar los mejores donantes para plasma convaleciente de COVID-19 y finalmente, poder monitorizar los niveles de IgG antes y posterior a la implementación de la vacunación.

## 15. Referencias

- A First Serological Study among Health Care Workers Reveals a Lower Prevalence of SARS-CoV-2 Infection than Expected.* (n.d.). Retrieved July 9, 2020, from <https://www.clinicbarcelona.org/en/news/a-first-serological-study-among-health-care-workers-reveals-a-lower-prevalence-of-sars-cov-2-infection-than-expected>
- Chan, J. F. W., Lau, S. K. P., To, K. K. W., Cheng, V. C. C., Woo, P. C. Y., & Yuen, K.-Y. (2015). Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus: Another Zoonotic Betacoronavirus Causing SARS-Like Disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), 465-522. <https://doi.org/10.1128/cmr.00102-14>
- Chan, J. F.-W., Yuan, S., Kok, K.-H., To, K. K.-W., Chu, H., Yang, J., Xing, F., Liu, J., Yip, C. C.-Y., Poon, R. W.-S., Tsoi, H.-W., Lo, S. K.-F., Chan, K.-H., Poon, V. K.-M., Chan, W.-M., Ip, J. D., Cai, J.-P., Cheng, V. C.-C., Chen, H., ... Yuen, K.-Y. (2020). A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *The Lancet*, 395(10223), 514-523. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30154-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30154-9)
- Chen, N., Zhou, M., Dong, X., Qu, J., Gong, F., Han, Y., Qiu, Y., Wang, J., Liu, Y., Wei, Y., Xia, J., Yu, T., Zhang, X., & Zhang, L. (2020). Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The Lancet*, 395(10223), 507-513. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30211-7)
- Cheng, V. C. C., Lau, S. K. P., Woo, P. C. Y., & Yuen, K. Y. (2007). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus as an Agent of Emerging and Reemerging Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(4), 660-694. <https://doi.org/10.1128/cmr.00023-07>
- Choi, I. A. (2018). Effects of Tocilizumab Therapy on Serum Interleukin-33 and Interleukin-6 Levels in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Archives of Rheumatology*, 33(4), 389-394. <https://doi.org/10.5606/archrheumatol.2018.6753>
- Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature microbiology*, 5(4), 536-544. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
- COVID-19 Dashboard de Centro de Ciencias en Sistemas e Ingeniería, Universidad Johns Hopkins, 2020, Disponible en: <https://www.arcgis.com/apps/opsdashboard/index.html#/bda7594740fd40299423467b48e9ecf6>
- Cui, J., Li, F., & Shi, Z.-L. (2018). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 181-192. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>
- Dandekar, A. A., & Perlman, S. (2005). Immunopathogenesis of coronavirus infections: implications for SARS. *Nature Reviews Immunology*, 5(12), 917-927. <https://doi.org/10.1038/nri1732>
- Dimeglio, C., Loubes, J. M., Deporte, B., Dubois, M., Latour, J., Mansuy, J. M., & Izopet, J. (2020). The SARS-CoV-2 seroprevalence is the key factor for deconfinement in France. In *Journal of Infection* (Vol. 0, Issue 0). W.B. Saunders Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.04.031>

**Informe final**

- Domingo, E., Sheldon, J., & Perales, C. (2012). Viral Quasispecies Evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), 159-216. <https://doi.org/10.1128/mmbr.05023-11>.
- Fang, Y., Zhang, H., Xu, Y., Xie, J., Pang, P., & Ji, W. (2020). CT Manifestations of Two Cases of 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) Pneumonia. *Radiology*, 295(1), 208-209. <https://doi.org/10.1148/radiol.2020200280>
- Farquhar, J. W., & Claireaux, A. E. (1952). Familial Haemophagocytic Reticulosis. *Archives of Disease in Childhood*, 27(136), 519-525. <https://doi.org/10.1136/adc.27.136.519>
- Forni, D., Cagliani, R., Clerici, M., & Sironi, M. (2017). Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes. *Trends in Microbiology*, 25(1), 35-48. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.09.001>.
- Gemma Moncunill1a, Alfredo Mayor Et al 2020SARS-CoV-2 infections and antibody responses among health care workers in a Spanish hospital after a month of follow-up
- Guan, W., Ni, Z., Hu, Y., Liang, W., Ou, C., He, J., Liu, L., Shan, H., Lei, C., Hui, D. S. C., Du, B., Li, L., Zeng, G., Yuen, K.-Y., Chen, R., Tang, C., Wang, T., Chen, P., Xiang, J., ... Zhong, N. (2020). Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *New England Journal of Medicine*, 382(18), 1708-1720. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2002032>
- Guo, Q., Li, M., Wang, C., Wang, P., Fang, Z., tan, J., Wu, S., Xiao, Y., & Zhu, H. (2020). Host and infectivity prediction of Wuhan 2019 novel coronavirus using deep learning algorithm. *Unknown*, 0. <https://doi.org/10.1101/2020.01.21.914044>
- Hallowell, B. D., Carlson, C. M., Jacobs, J. R., Pomeroy, M., Steinberg, J., Tenforde, M., McDonald, E., Foster, L., Feldstein, L. R., Rolfes, M. A., Haynes, A., Abedi, G. R., Odongo, G. S., Saruwatari, K., Rider, E. C., Douville, G., Bhakta, N., Maniatis, P., Lindstrom, S., ... Killerby, M. E. (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Prevalence, Seroprevalence, and Exposure Among Evacuees from Wuhan, China, 2020. *Emerging Infectious Diseases*, 26(9). <https://doi.org/10.3201/eid2609.201590>
- Halyabar, O., Chang, M. H., Schoettler, M. L., Schwartz, M. A., Benson, L. A., Biggs, C. M., Gorman, M., Lehmann, L., Lo, M. S., Nigrovic, P. A., Platt, C. D., Priebe, G. P., Rowe, J., Sundel, R. P., Surana, N. K., Weinacht, K. G., Mann, A., Yuen, J. C., Meleedy-Rey, P., ... Henderson, L. A. (2019). Calm in the midst of cytokine storm: a collaborative approach to the diagnosis and treatment of hemophagocytic lymphohistiocytosis and macrophage activation syndrome. *Pediatric Rheumatology*, 17(1), 0. <https://doi.org/10.1186/s12969-019-0309-6>
- Holshue, M. L., DeBolt, C., Lindquist, S., Lofy, K. H., Wiesman, J., Bruce, H., Spitters, C., Ericson, K., Wilkerson, S., Tural, A., Diaz, G., Cohn, A., Fox, L., Patel, A., Gerber, S. I., Kim, L., Tong, S., Lu, X., Lindstrom, S., ... Pillai, S. K. (2020). First Case of 2019 Novel Coronavirus in the United States. *New England Journal of Medicine*, 382(10), 929-936. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2001191>
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., ... Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 395(10223), 497-506. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30183-5)
- Hutchinson, M., Tattersall, R. S., & Manson, J. J. (2019). Haemophagocytic lymphohistiocytosis—an underrecognized hyperinflammatory syndrome. *Rheumatology*, 58(Supplement\_6), vi23-vi30. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kez379>

**Informe final**

- Ji, W., Wang, W., Zhao, X., Zai, J., & Li, X. (2020). Cross-species transmission of the newly identified coronavirus 2019-nCoV. *Journal of Medical Virology*, 92(4), 433-440. <https://doi.org/10.1002/jmv.25682>
- Kluytmans-van den Bergh, M. F. Q., Buiting, A. G. M., Pas, S. D., Bentvelsen, R. G., van den Bijllaardt, W., van Oudheusden, A. J. G., van Rijen, M. M. L., Verweij, J. J., Koopmans, M. P. G., & Kluytmans, J. A. J. W. (2020). Prevalence and Clinical Presentation of Health Care Workers With Symptoms of Coronavirus Disease 2019 in 2 Dutch Hospitals During an Early Phase of the Pandemic. *JAMA Network Open*, 3(5), e209673. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.9673>
- Lahner, E., Dilaghi, E., Prestigiacomo, C., Alessio, G., Marcellini, L., Simmaco, M., Santino, I., Orsi, G. B., Anibaldi, P., Marcolongo, A., Annibale, B., & Napoli, C. (2020). Prevalence of Sars-Cov-2 Infection in Health Workers (HWs) and Diagnostic Test Performance: The Experience of a Teaching Hospital in Central Italy. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(12), 4417. <https://doi.org/10.3390/ijerph17124417>
- Lee, N., Hui, D., Wu, A., Chan, P., Cameron, P., Joynt, G. M., Ahuja, A., Yung, M. Y., Leung, C. B., To, K. F., Lui, S. F., Szeto, C. C., Chung, S., & Sung, J. J. Y. (2003). A Major Outbreak of Severe Acute Respiratory Syndrome in Hong Kong. *New England Journal of Medicine*, 348(20), 1986-1994. <https://doi.org/10.1056/nejmoa030685>
- Li, W. (2005). Bats Are Natural Reservoirs of SARS-Like Coronaviruses. *Science*, 310(5748), 676-679. <https://doi.org/10.1126/science.1118391>
- Ling, R., Yu, Y., He, J., Zhang, J., Xu, S., Sun, R., Li, T., Ji, H., & Wang, H. (2020). Seroprevalence and epidemiological characteristics of immunoglobulin M and G antibodies against SARS-CoV-2 in asymptomatic people in Wuhan, China. *MedRxiv*, 2020.06.16.20132423. <https://doi.org/10.1101/2020.06.16.20132423>
- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., ... Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 395(10224), 565-574. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30251-8)
- Mahallawi, W. H., Khabour, O. F., Zhang, Q., Makhdom, H. M., & Suliman, B. A. (2018). MERS-CoV infection in humans is associated with a pro-inflammatory Th1 and Th17 cytokine profile. *Cytokine*, 104, 8-13. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.01.025>
- Martin, C., Montesinos, I., Dauby, N., Gilles, C., Dahma, H., Van Den Wijngaert, S., De Wit, S., Delforge, M., Clumeck, N., & Vandenberg, O. (2020). Dynamic of SARS-CoV-2 RT-PCR positivity and seroprevalence among high-risk health care workers and hospital staff. *Journal of Hospital Infection*, 0(0). <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.06.028>
- Mehta, P., McAuley, D. F., Brown, M., Sanchez, E., Tattersall, R. S., & Manson, J. J. (2020). COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *The Lancet*, 395(10229), 1033-1034. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30628-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30628-0)
- Mohd, H. A., Al-Tawfiq, J. A., & Memish, Z. A. (2016). Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) origin and animal reservoir. *Virology Journal*, 13(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0544-0>
- Ng, L. F. P., & Hiscox, J. A. (2020). Coronaviruses in animals and humans. *BMJ*, m634. <https://doi.org/10.1136/bmj.m634>
- Ni, M., Chen, C., Qian, J., Xiao, H.-X., Shi, W.-F., Luo, Y., Wang, H.-Y., Li, Z., Wu, J., Xu, P.-S., Chen, S.-H., Wong, G., Bi, Y., Xia, Z.-P., Li, W., Lu, H., Ma, J., Tong, Y.-G., Zeng, H.,

- ... Liu, D. (2016). Intra-host dynamics of Ebola virus during 2014. *Nature Microbiology*, 1(11), 0. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.151>
- Oran, D. P., & Topol, E. J. (2020). Prevalence of Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection. *Annals of Internal Medicine*. <https://doi.org/10.7326/m20-3012>
- Pillaiyar, T., Meenakshisundaram, S., & Manickam, M. (2020). Recent discovery and development of inhibitors targeting coronaviruses. *Drug Discovery Today*, 25(4), 668-688. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.01.015>
- Schmidt, S. B., Grüter, L., Boltzmann, M., & Rollnik, J. D. (2020). Prevalence of serum IgG antibodies against SARS-CoV-2 among clinic staff. *PLOS ONE*, 15(6), e0235417. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235417>
- Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A. C. K., Zhou, J., Liu, W., Bi, Y., & Gao, G. F. (2016). Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends in Microbiology*, 24(6), 490-502. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.003>
- Tian, S., Xiong, Y., Liu, H., Niu, L., Guo, J., Liao, M., & Xiao, S.-Y. (2020). Pathological study of the 2019 novel coronavirus disease (COVID-19) through postmortem core biopsies. *Modern Pathology*, 33(6), 1007-1014. <https://doi.org/10.1038/s41379-020-0536-x>
- To, K. K.-W., Cheng, V. C.-C., Cai, J.-P., Chan, K.-H., Chen, L.-L., Wong, L.-H., Choi, C. Y.-K., Fong, C. H.-Y., Ng, A. C.-K., Lu, L., Luo, C.-T., Situ, J., Chung, T. W.-H., Wong, S.-C., Kwan, G. S.-W., Sridhar, S., Chan, J. F.-W., Fan, C. Y.-M., Chuang, V. W. M., ... Yuen, K.-Y. (2020). Seroprevalence of SARS-CoV-2 in Hong Kong and in residents evacuated from Hubei province, China: a multicohort study. *The Lancet Microbe*, 1(3), e111–e118. [https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(20\)30053-7](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(20)30053-7)
- Wan, S., Yi, Q., Fan, S., Lv, J., Zhang, X., Guo, L., Lang, C., Xiao, Q., Xiao, K., Yi, Z., Qiang, M., Xiang, J., Zhang, B., & Chen, Y. (2020). Characteristics of lymphocyte subsets and cytokines in peripheral blood of 123 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus pneumonia (NCP). Preprinted MedRxiv, 0. <https://doi.org/10.1101/2020.02.10.20021832>
- Wang<sup>1</sup>, C., Xie, J., Zhao, L., Fei, X., Zhang, H., Tan, Y., Zhou, L., Liu, Z., Ren, Y., Yuan, L., Zhang, Y., Zhang, J., Liang, L., Chen, X., Liu, X., Wang, P., Han, X., Weng, X., Chen, Y., ... Bian, X. (2020). Alveolar Macrophage Activation and Cytokine Storm in the Pathogenesis of Severe COVID-19. *Nature Research*. 0. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-19346/v1>
- Wang<sup>2</sup>, D., Hu, B., Hu, C., Zhu, F., Liu, X., Zhang, J., Wang, B., Xiang, H., Cheng, Z., Xiong, Y., Zhao, Y., Li, Y., Wang, X., & Peng, Z. (2020). Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus–Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*, 323(11), 1061. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1585>
- Wang, L.-F., Shi, Z., Zhang, S., Field, H., Daszak, P., & Eaton, B. (2006). Review of Bats and SARS. *Emerging Infectious Diseases*, 12(12), 1834-1840. <https://doi.org/10.3201/eid1212.060401>
- Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C.-L., Abiona, O., Graham, B. S., & McLellan, J. S. (2020). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, 367(6483), 1260-1263. <https://doi.org/10.1126/science.abb2507>
- Wong, C. K., Lam, C. W. K., Wu, A. K. L., Ip, W. K., Lee, N. L. S., Chan, I. H. S., Lit, L. C. W., Hui, D. S. C., Chan, M. H. M., Chung, S. S. C., & Sung, J. J. Y. (2004). Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute respiratory syndrome. *Clinical & Experimental Immunology*, 136(1), 95-103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02415.x>

**Informe final**

- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Lam, C. S. F., Lau, C. C. Y., Tsang, A. K. L., Lau, J. H. N., Bai, R., Teng, J. L. L., Tsang, C. C. C., Wang, M., Zheng, B.-J., Chan, K.-H., & Yuen, K.-Y. (2012). Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus. *Journal of Virology*, 86(7), 3995-4008. <https://doi.org/10.1128/jvi.06540-11>
- Xu<sup>a</sup>, X., Chen, P., Wang, J., Feng, J., Zhou, H., Li, X., Zhong, W., & Hao, P. (2020). Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Science China Life Sciences*, 63(3), 457-460. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1637-5>
- Xu<sup>b</sup>, Z., Shi, L., Wang, Y., Zhang, J., Huang, L., Zhang, C., Liu, S., Zhao, P., Liu, H., Zhu, L., Tai, Y., Bai, C., Gao, T., Song, J., Xia, P., Dong, J., Zhao, J., & Wang, F.-S. (2020). Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *The Lancet Respiratory Medicine*, 8(4), 420-422. [https://doi.org/10.1016/s2213-2600\(20\)30076-x](https://doi.org/10.1016/s2213-2600(20)30076-x)
- Zaki, A. M., van Boheemen, S., Bestebroer, T. M., Osterhaus, A. D. M. E., & Fouchier, R. A. M. (2012). Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. *New England Journal of Medicine*, 367(19), 1814-1820. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1211721>
- Zhao, Z., Li, H., Wu, X., Zhong, Y., Zhang, K., Zhang, Y., Boerwinkle, E., Fu, Y. (2004). Moderate mutation rate in the SARS coronavirus genome and its implications. *BMC Evolutionary Biology* 4, 21. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-4-21>
- Zhou, P., Yang, X.-L., Wang, X.-G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H.-R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C.-L., Chen, H.-D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R.-D., Liu, M.-Q., Chen, Y., Shen, X.-R., Wang, X., ... Shi, Z.-L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), 270-273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>

## 16. Apéndice

Preparación de BSA al 10% en solución madre de PBS:

1. El día antes de que sea necesario, pese 50 g de polvo de BSA y agréguelo a un matraz de vidrio de 500 ml.
2. Con una pipeta serológica o una probeta, medir 400 ml de 1xPBS y añadirlo al matraz de vidrio. Gire suavemente para asegurarse de que todo el BSA pueda comenzar a disolverse. No use una barra de agitación, no agite, no gire con demasiada fuerza. Evite crear burbujas.
3. Cubra la parte superior del matraz con papel de aluminio, etiquete el matraz y colóquelo en el refrigerador a 4 ° C durante la noche.
4. A la mañana siguiente, agite suavemente para asegurarse de que todo el BSA se haya disuelto. Si no se ha disuelto, deje que el matraz repose sobre la mesa durante 1-2 horas hasta que BSA se haya disuelto por completo. No agite ni use una barra para revolver. Se puede transferir a una incubadora a 37 ° C durante 10 a 20 minutos para acelerar la disolución.
5. Con una pipeta serológica de 50 ml, mida la cantidad exacta de líquido en el matraz transfiriéndolo a la unidad de filtro superior de una unidad de filtro estéril preenvasada de 500 ml. Una vez transferido, agregue la cantidad restante de 1xPBS estéril calculando: (# de mL de PBS para agregar = (500 mL) - (# de mL de PBS para agregar a la unidad de filtrado)

Ejemplo: (500 mL) - (457 mL de BSA disuelto en PBS) = agregue 43 mL de 1x PBS estéril a la unidad de filtro superior antes de filtrar.

- No use las marcas de volumen en la unidad de filtro para medir la cantidad total. Son inexactos.
- Utilice una aspiradora de aire para filtrar la solución en la botella de recolección estéril de 500 ml. Retire la unidad de filtro superior y deséchela. Coloque la tapa de plástico estéril en la botella de 500 ml. Etiquete el frasco con "10% de BSA en PBS, filtrado estéril, FECHA, SUS INICIALES". Almacenar a 4C. Compruebe periódicamente si hay grumos o bolas difusas de crecimiento de moho. Si lo ve, deséchelo y haga una botella nueva.
- La concentración de trabajo de BSA en este protocolo es 5% de BSA en PBS. Siempre diluya la cantidad que necesitará ese día de la solución madre al 10%, para que esté fresca. Cualquier 5% de BSA restante se puede descartar al final del día. Si tiene un 5% de BSA sobrante y volverá a realizar el ensayo mañana, está bien usar las sobras al día siguiente.

Cantidad de ml de BSA al 5% necesarios = Cantidad de placas de ensayo x 50 ml / placa

Ejemplo: (4 placas) x (50 ml / placa) = 200 ml de BSA al 5% necesarios ese día

Para producir suficiente BSA al 5% para 4 placas de ensayo, necesitará 200 ml en total de BSA al 5% en PBS. Utilice una pipeta serológica o un cilindro graduado para medir 100 ml de 1xPBS estéril en una botella estéril y luego agregue 100 ml de solución madre al 10% de BSA. No use el 1xPBS que es para la solución de lavado, porque no es estéril.

Preparación de solución de lavado 1xPBS a partir de 20x stock:

La solución de lavado puede no ser estéril. Todos los demás usos de 1xPBS deben ser estériles y se recomienda usarlos directamente del frasco de Teknova estéril 1xPBS y no diluidos a mano.

Para preparar 2 litros de solución de lavado PBS:

Agregue 100 ml de 20x stock a 1900 ml de agua desionizada, mezcle bien agitando o girando.

Almacene a temperatura ambiente y compruebe periódicamente si hay grumos o bolas difusas de crecimiento de moho. Si se observa, deseche la solución y prepare una botella nueva.

Preparación de solución de lavado 1xPBS-T a partir de 20x stock:

La solución de lavado puede no ser estéril. Para preparar 2 litros de solución de lavado PBS-T:

Agregue 100 ml de 20x stock a 1900 ml de agua desionizada, mezcle bien agitando o girando.

Almacene a temperatura ambiente y compruebe periódicamente si hay grumos o bolas difusas de crecimiento de moho. Si se observa, deseche la solución y prepare una botella nueva.

Lavado de platos:

Hay 4 formas de lavar las placas de ensayo:

1. Utilice una pipeta P1000 de 12 canales para pipetear 300 ul de solución de lavado en cada fila. Agregue la solución de lavado a todos los pocillos de todas las placas, luego vacíe todas las placas, luego repita 2 veces más. Si lava un plato a la vez 3 veces, debe dejar el último lavado en el plato hasta que se hayan lavado todos los platos. No deje las placas secas sin líquido por más de varios minutos en CUALQUIER paso de este protocolo de CUSAA, incluido el lavado.
2. Igual que el anterior, pero utilice una pipeta electrónica de 12 canales de dispensación múltiple. Esto se recomienda en lugar de una pipeta manual de 12 canales.
3. Utilice botellas exprimibles de 500 ml para dispensar la solución de lavado en las placas de ensayo. Asegúrese de llenar cada pocillo completamente hasta arriba. Agregue la

**Informe final**

solución de lavado a todos los pocillos de todas las placas, luego vacíe todas las placas, luego repita 2 veces más. Si lava un plato a la vez 3 veces, deje el último lavado en el plato hasta que se hayan lavado todos los platos. No deje las placas secas sin líquido por más de varios minutos en CUALQUIER paso de este protocolo de CUSAA, incluido el lavado.

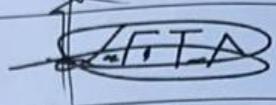
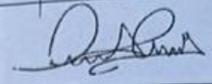
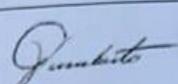
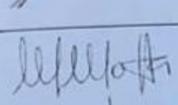
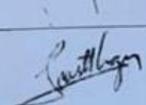
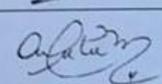
4. Método de lavado recomendado: Utilice una lavadora de platos automática. Un brazo apilador automático es la adición recomendada a la lavadora de placas. Debido a que ejecutará varias placas por día, se recomienda tener una cabeza de 96 clavijas en lugar de una de 12 u 8 clavijas, para reducir la cantidad de tiempo que cada placa está seca y abierta al aire. Recomendando la marca BioTek.
- **IMAGENES** Ver carpeta adjunta.

PRESUPUESTO					
Desarrollo de prueba de detección rápida sanguínea para Coronavirus-19 — Covid-19—					
REGLON	Descripción	Cant	Unitario	Total	DISPONIBLE
<b>EQUIPO E INSUMOS DE LABORATORIO</b>					
2.95	caja de 960 puntas estériles, 0.5-5 microlitros	9	Q950.00	Q8,550.00	
2.95	Caja de 960 puntas estériles, 10 microlitros	9	Q950.00	Q8,550.00	
2.95	Caja de 960 puntas estériles de 10-100 ul	9	Q950.00	Q8,550.00	
2.95	Caja de 960 puntas estériles de 100-200 ul	9	Q1,200.00	Q10,800.00	
2.95	Caja de 960 puntas estériles de 200 - 1000 ul	9	Q1,200.00	Q10,800.00	
2.61	Medio DMEM high glucosa 500 ml	10	Q1,107.31	Q11,073.10	
2.61	Suero Fetal bovino 500 ml	3	Q7,488.16	Q22,464.48	
2.61	Tripsina	1	Q1,003.52	Q1,003.52	
**	Paquete de 20 Filtros para líquidos de 500 ml 0.22 um	0	Q2,980.00	Q0.00	sin existencias
**	Paquete de 10 Frascos para cultivo celular de 50 cc con filtro	0	Q2,350.00	Q0.00	sin existencias
2.95	Paquete de 20 Frascos para cultivo celular de 25 cc con filtro	5	Q10,732.33	Q53,661.65	
2.95	Tubos de 1.5 ml para mini centrifuga (1,000 tubos)	2	Q535.00	Q1,070.00	
2.95	Sellos para placa de 96 pozos para placa de ELISA	2	Q3,001.50	Q6,003.00	
2.95	tubos cónicos 15 ml estériles (caja de 50 tubos)	10	Q120	Q1,200.00	
2.95	Placas de ELISA de fondo plano de poliestireno de alta adherencia Paquete de 50 unidades CORNING	5	Q2,935.00	Q14,675.00	
2.95	Placas de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina paquete de 15 unidades TERMO FISHER	3	Q10,676.00	Q32,028.00	
**	Anticuerpo monoclonal de pollo anti-HIS	0	Q4,624.43	Q0.00	sin existencias
2.61	(IlgG peroxidasa AffiniPure de cabra anti-humano, fragmento de Fcy específico	2	Q2,570.00	Q5,140.00	
2.61	TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) Liquid Substrate System for ELISA)	5	Q1,939.68	Q9,698.40	
**	1N (1M) HCl or 1N (0.5M) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 500 ml	0	Q900.00	Q0.00	sin existencias
2.61	20x PBS Solution 10X 500 ml	3	Q1,498.00	Q4,494.00	
2.61	20x PBS tabletas (10 tabletas de 500 ml)	3	Q3,295.84	Q9,887.52	
2.61	Tween	1	Q850.00	Q850.00	
2.61	20X PBS Solution with 1% Tween-20	3	Q1,214.24	Q3,642.72	
2.61	albumina bovina fracción V (gramos)	2	Q709.60	Q1,419.20	
2.95	Pipeta uni canal de 0.5 - 10 ul	2	Q2,200.00	Q4,400.00	
2.95	Pipeta Uni canal de 10 - 100 ul	2	Q2,200.00	Q4,400.00	
2.95	Pipeta uni canal de 200 a 1000 ul	2	Q2,200.00	Q4,400.00	
2.95	Pipeta multicanal de 10 - 200 ul 12 canales	2	Q10,500.00	Q21,000.00	
2.95	Paquete de 100 crioviales de 1 ml	10	Q4,652.00	Q46,520.00	
2.95	Paquete de 100 Crioviales de 2 ml	9	Q2,500.00	Q22,500.00	
2.95	Paquete de 100 Crioviales de 5 ml (caja de 50 unidades)	4	Q1,652.00	Q6,608.00	
2.95	Paquete de 10 Gradillas para crioviales	9	Q450.00	Q4,050.00	
2.95	Cajas Criobox (1 caja) NALGENE	8	Q1,839.36	Q14,714.88	
**	SARS-CoV-2-RBD HIS	0	Q6,725.00	Q0.00	no se cotizo
2.95	Filtros de jeringa de 0.22 um paquete	10	Q1,033.00	Q10,330.00	
1.63	Mantenimiento preventivo y calibración del equipo PCR TIEMPO REAL	1	Q4,010.80	Q4,010.80	
2.95	Applied Biosystems TaqMan Rnasa P Instrument Verification Plate, Fast 48-Well	1	Q6,661.12	Q6,661.12	
2.95	Applied Biosystems StepOne Real Time PCR System Spectral Calibration Kit 48 well	1	Q6,787.20	Q6,787.20	
2.61	Poly-D-Lysina 100 mL	1	Q1,299.44	Q1,299.44	
2.95	Gaussia Luciferasa Glow Assay Kit	1	Q1,349.92	Q1,349.92	
2.95	Filtros de jeringa de 0.45 um 500	10	Q1,033.20	Q10,332.00	
2.95	bolsas de descarte biologico (100 bolsas) medianas	10	Q203.60	Q2,036.00	
<b>Sub TOTAL</b>			<b>Q123,077.25</b>	<b>Q396,959.95</b>	
<b>EQUIPO DE PROTECCIÓN PERSONAL</b>					
2.95	Batas de protección	200	Q20.00	Q4,000.00	
2.95	Zapatones (par)	200	Q5.00	Q1,000.00	
2.95	Lentes protectores antiempañ	5	Q100.60	Q503.00	
2.95	Mascarillas n95	74	32.00	Q2,368.00	
2.95	Caretas	5	Q20.00	Q100.00	
2.33	Traje de protección (pantalón y filipina) 10 trajes	1	Q4,299.83	Q4,299.83	
**	Traje overol microgard blanco marca Ansell	20	Q0.00	Q0.00	sin existencias
2.95	Caja de guante de nitrilo M, 100	6	Q175.00	Q1,050.00	
**	Guante Flexuff Negro nitrilo DELGADO (par)	30	Q0.00	Q0.00	sin existencias
2.95	Caja de guante de nitrilo L, 100	3	Q175.00	Q525.00	
2.95	Gorros	50	Q16.00	Q800.00	
<b>OTROS</b>					
**	Manejo de cuenta	1	Q15.00	Q15.00	
**	Envío	1	Q9,352.90	Q9,352.90	
<b>Sub TOTAL</b>			<b>Q14,211.33</b>	<b>Q24,013.73</b>	
<b>TOTAL</b>				<b>Q420,973.68</b>	
<b>TOTAL AYUDA ECONÓMICA</b>				<b>Q420,816.86</b>	
				<b>Q156.82</b>	

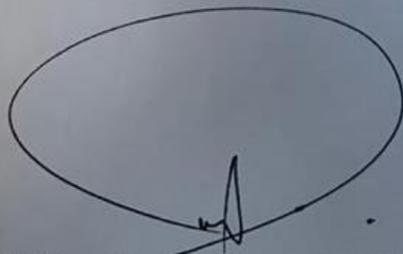
\*\* Estos materiales estan incluidos en el valor total "Envío" debido a que fue necesario su importación

En Carpeta adjunto a archivo se adjuntan copia de facturas.

Listado de los integrantes del equipo de investigación (en una sola hoja)

Nombre	Firma
MSc Murphy Olympo Paiz Recinos	
Dr. Luis Fernando Torres Arreaga	
Dr. Enjebell Alejandro Ramos González	
Dr. Erwin Humberto Calgua Guerra	
Dra Mayra Lissette Motta Padilla	
Licda. Leticia Castillo Signor	
Dra. Ana Liss Perdomo Mendizabal	

Guatemala \_\_\_ 13 \_\_\_ de diciembre \_\_\_ 2020 \_\_\_



MSC Ing. Murphy Olympo Paiz Recinos  
Rector

Coordinador(a) del proyecto de investigación

Proyecto de Investigación: DESARROLLO DE PRUEBA DE DETECCIÓN RÁPIDA  
SANGUÍNEA PARA CORONAVIRUS-19 -COVID-19-Sars-CoV-2.




Vo. Bo. DSc. Félix Aguilar Carrera  
Director General de Investigación