

Programa Universitario de Investigación Interdisciplinario en Salud
(nombre del programa universitario de investigación de la Digi)

Metodologías novedosas para estudiar el comportamiento del virus SARS-COV 2
nombre del proyecto de investigación

AP13-2021
código del proyecto de investigación

Facultad de Ciencias Médicas
unidad académica o centro no adscrito a unidad académica avaladora

Dr. Erwin Humberto Calgua Guerra
nombre del coordinador del proyecto y equipo de investigación contratado por Digi

Ciudad de Guatemala, 25/02/2022
lugar y fecha de presentación del informe final dd/mm/año

Autoridades

Dr. Hugo René Pérez Noriega
Director General de Investigación

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

Dra. Hilda Valencia de Abril
Coordinadora del Programa de Investigación Interdisciplinaria en Salud –PUIIS-

Autores

Dr. Erwin Humberto Calgua Guerra
Coordinador del proyecto

Dra Mayra Lissette Motta Padilla
Investigadora

Licda Leticia Del Carmen Castillo Signor
Investigadora

Licda. Maria de los Angeles Lima Ibarra
Investigadora

Diana Gisella Velásquez Ramírez
Auxiliar de investigación II

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación (Digi), 2021. El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores.

Esta investigación fue cofinanciada con recursos del Fondo de Investigación de la Digi de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través del código AP13 en el Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud.

Los autores son responsables del contenido, de las condiciones éticas y legales de la investigación desarrollada.



INFORME FINAL

1 Índice general (incluir índice de tablas y figuras)

1	Índice general.....	3
2	Resumen y palabras clave	5
	Abstract and keywords.....	6
3	Introducción	7
4	Planteamiento del problema	9
5	Delimitación en tiempo y espacio.....	10
	5.1 Delimitación en tiempo.....	10
	5.2 Delimitación espacial.....	10
6	Marco teórico.....	10
	6.1 Descripción general del coronavirus.....	11
	6.2 Respuesta inmune contra SARS-CoV-2.....	14
	6.3 Inmunidad.....	16
	6.4 Probabilidad de infección dada una prueba negativa en diferentes niveles de probabilidades previas.....	18
7	Estado del arte.....	19
	7.1 Pruebas serológicas para detección de SARS-CoV-2.....	19
	7.2 Seroprevalencia para SARS-CoV-2.....	21
8	Objetivos (generales y específicos aprobados en la propuesta).....	22
9	Hipótesis.....	22
10	Materiales y métodos.....	22
	10.1 Enfoque de la investigación	22
	10.2 Método.....	23
	10.3 Recolección de información.....	23

10.4	Técnicas e instrumentos.....	24
10.5	Procesamiento y análisis de la información	24
11	Resultados y discusión.....	25
11.1	Resultados.....	25
11.2	Discusión de resultados.....	29
12	Referencias.....	32
13	Apéndice.....	42
14	Aspectos éticos y legales.....	60
15	Vinculación.....	61
16	Estrategia de difusión, divulgación y protección intelectual.....	61
17	Aporte de la propuesta de investigación a los ODS.....	61
18	Orden de pago final.....	61
19	Declaración del coordinador(a) del proyecto de investigación.....	62
20	Aval del director(a) del instituto, centro o departamento de investigación o Coordinador de investigación	62
21	Visado de la Dirección General de Investigación.....	63

Índice de Tablas

1	Características generales de los estudiantes por Facultad de la Universidad de San Carlos de Guatemala.....	25
2	Factores de riesgo de los estudiantes por Facultad de la Universidad de San Carlos de Guatemala	26
3	Síntomas experimentados en los meses previos a la prueba realizada en los estudiantes por Facultad de la Universidad de San Carlos de Guatemala.....	27
4	Resultados de prueba PCR y anticuerpos SARS-CoV-2 en los estudiantes por Facultad de la Universidad de San Carlos de Guatemala	27
5	Odds Ratio (OR) de prueba de anticuerpos SARS-CoV-2 con factores de riesgo identificados en los estudiantes por Facultad de la Universidad de San Carlos de Guatemala.....	28

2 Resumen y palabras clave

Propósito: Se planteo como objetivos desarrollar metodologías novedosas para estudiar el comportamiento del virus SARS-CoV-2 y determinar la seroprevalencia de SARS-CoV-2 en estudiantes de grado de una universidad.

Metodología: Es un estudio cuantitativo transversal, en una muestra de 185 estudiantes que no habían recibido la vacuna contra Covid-19, de dos facultades de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Se respondió una encuesta electrónica y se les tomó una muestra sanguínea, la cual fue analizada con un método autóctono de ELISA. El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética en Investigación.

Resultados: Se halló que la seroprevalencia para anticuerpos SARS-CoV-2 en el grupo de estudiantes de grado de la Facultad de Ciencias Médicas fue de 47% y en los de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia fue de 86%. La media de edad de los estudiantes de medicina que participaron fue 20 años, en comparación con los 24 de la otra facultad. El sexo predominante fue femenino. El 48% a 54% de los estudiantes en este estudio reportaron contacto con un caso sospechoso. La proporción de estudiantes que se realizó una PCR previo a su participación en esta investigación fue de entre 15% a 24%. Ser estudiante de la Facultad de Ciencias Médicas pareció ser un factor protector (OR: 0.19 (CI 95%: 0.07,0.48)). Para ambos grupos de estudiantes, el único factor de riesgo que se encontró fue el ser estudiante de primer año (OR: 8.56 (CI 95%: 3.27,24.75)).

Conclusión: La seroprevalencia de SARS-CoV-2 encontrada en estudiantes de 2 carreras de la Universidad de San Carlos de Guatemala es una de las más elevadas en el ámbito global. Además, se demuestra que es posible desarrollar métodos innovadores para estudiar el comportamiento del virus SARS-CoV-2 en la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Palabras clave: estudiantes medicina veterinaria zootecnia seroprevalencia anticuerpos SARS-CoV-2

Abstract and keywords

Purpose: The objectives were to develop novel methodologies to study the behavior of the SARS-CoV-2 virus and determine the seroprevalence of SARS-CoV-2 in undergraduate students at a university.

Methodology: It is a cross-sectional quantitative study, in a sample of 185 students who had not received the Covid-19 vaccine, from two faculties of the University of San Carlos de Guatemala. An electronic survey was answered and a blood sample was taken, which was analyzed with an indigenous ELISA method. The study was approved by the Research Bioethics Committee.

Results: It was found that the seroprevalence for SARS-CoV-2 antibodies in the group of undergraduate students from the Faculty of Medical Sciences was 47% and in those from the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics it was 86%. The average age of the participating medical students was 20 years, compared to 24 at the other school. The predominant sex was female. 48% to 54% of students in this study reported contact with a suspected case. The proportion of students who underwent a PCR prior to their participation in this research was between 15% and 24%. Being a student at the Faculty of Medical Sciences seemed to be a protective factor (OR: 0.19 (95% CI: 0.07, 0.48)). For both groups of students, the only risk factor found was being a freshman (OR: 8.56 (95% CI: 3.27, 24.75)).

Conclusion: The seroprevalence of SARS-CoV-2 found in students of 2 careers at the University of San Carlos de Guatemala is one of the highest in the global environment. In addition, it is shown that it is possible to develop innovative methods to study the behavior of the SARS-CoV-2 virus at the University of San Carlos de Guatemala.

Keywords: veterinary medicine students zootechnics seroprevalence antibodies SARS-CoV-2

3 Introducción

La pandemia causada por COVID-19 planteó nuevos retos globales para los sistemas de salud pública (Assefa et al, 2021), entre ellos, la detección oportuna y confiable de los casos, y ar determinar la seroprevalencia de la infección causada por el virus SARS-CoV-2 en las poblaciones una vez expuestos al mismo (McConnell et al, 2021). Se han realizado rápidos avances técnicos que permitieron que la técnica de Cadena de Reacción de la Polimerasa en tiempo real (rt-PCR por sus siglas en inglés), se convirtiera en la prueba de estándar de oro, sin embargo, en cuanto al segundo, no sólo existen numerosas pruebas comerciales costosas, sino que aún no se ha identificado una prueba que sea un estándar de oro, esto debido a la variabilidad de la respuesta inmunitaria entre poblaciones y la variabilidad de los resultados de las pruebas con las técnicas disponibles (Scheiblauer et al, 2022).

Los anticuerpos circulan en el cuerpo humano en respuesta al COVID-19 como una reacción de defensa a la infección y por ello, aumentan en cantidad conforme la carga viral de SARS-Cov2-19 disminuye. A pesar de las limitantes que se han encontrado con las pruebas de anticuerpos, se han realizado varias encuestas de seroprevalencia en el ámbito global y se ha estimado que, para abril del 2021, el 26.1% de la población ya presentaba anticuerpos para el coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2 por sus siglas en inglés), que la seroprevalencia difiere de acuerdo con la región, la población más afectada está entre los 20 a 29 años de edad y finalmente, los sistemas de vigilancia, que dependen principalmente de los resultados de las pruebas rt-PCR, subestiman el verdadero impacto que ha tenido la infección natural (Bergeri et al, 2021). En poblaciones más específicas, como estudiantes universitarios no vacunados, en Inglaterra, se estimó que 17.8% tenían anticuerpos contra SARS-CoV-2 (Vusirikala et al., 2021) y en estudiantes de medicina, se reportó que la positividad para anticuerpos IgG a SARS-CoV-2 fue de 18% (Pérez-Tanoira et al, 2021).

Este estudio, de diseño transversal, planteó como objetivos desarrollar metodologías novedosas para estudiar el comportamiento del virus SARS-CoV-2 y determinar la seroprevalencia de SARS-CoV-2, validando una metodología innovadora para detectar anticuerpos para SARS-

CoV-2 en estudiantes de grado de la Facultad de Ciencias Médicas y la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala que no hubieran recibido ninguna dosis de vacuna contra Covid-19. Debido a que la mayoría de estudios se realizan con pruebas comerciales caras, la metodología se considera novedosa por ser una prueba cuantitativa-cualitativa ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés), desarrollada en un estudio colaborativo entre la Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC), el Dr. Jacob Glanville (Centivax) y la MSc Sarah Ives (Distributed-Bio), en San Francisco, California, Estados Unidos de América, de bajo costo y que puede adaptarse a nuevas variantes, haciendo cambios en los reactivos. La seroprevalencia en 185 estudiantes estudiados fue de 69%, muy superior a lo reportado en el ámbito global, y es de notar que todos los estudiantes se encontraban en docencia remota sin haber tenido ninguna actividad académica presencial al momento de la toma de la muestra sanguínea, por lo que el contagio ocurrió fuera de los ambientes de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Esta información que se ha obtenido de la seroprevalencia en estudiantes de la USAC será particularmente importante en la modelación de un retorno a actividades presenciales o a una modalidad híbrida. Debe considerarse que el comportamiento definitivo de la infección por el virus SARS-CoV-2 todavía es variable, que la cobertura de la vacunación en la población del país es inferior al 40% y que aún falta conocimiento sobre el tratamiento de la enfermedad por lo que estos datos, de un grupo muy limitado de estudiantes, sirven como un antecedente importante pero no definitivo ni extrapolable para todos los estudiantes de la USAC.

A continuación, procedemos a presentar la implementación de la metodología novedosa de ELISA para medir IgG anti SARS-CoV-2.

4 Planteamiento del problema

La pandemia provocada por SARS-CoV-2 es un problema de salud a nivel global (Chen, 2019), y aunque existen sistemas de vigilancia epidemiológica basados en rt-PCR o pruebas de antígeno, la información que se obtiene de estos, no necesariamente refleja cuán extenso ha sido el impacto de la infección natural en poblaciones (Bergeri et al, 2021), algo que puede ser medido a través de encuestas de seroprevalencia en las cuales se aplican pruebas de anticuerpos con las cuales es posible estimar de forma más precisa la exposición real que ha tenido la población en general y las poblaciones específicas, como este caso universitarias, al SARS-CoV-2.

Para el año 2020, cuando este estudio fue diseñado, eran pocos los países que habían reportado encuestas de seroprevalencias de SARS-CoV-2, tales como China 4%, Suecia 7% y España con 5%. Esto cambió con el tiempo y, el estudio más reciente, reportó que existen más de 736 encuestas de las cuales 41% se han realizado en países de bajos y medianos ingresos (LMIC por sus siglas en inglés), ninguno que mencione a Guatemala. (Bergeri et al, 2021). La limitante más importante para realizar estas encuestas ha sido la carencia de un estándar de oro en cuanto a pruebas de anticuerpos anti SARS-CoV-2, pues en su gran mayoría son comerciales y poco confiables. Además, de que la validación de las mismas ha sido realizada en poblaciones heterogéneas y cuya respuesta inmunitaria puede variar (Scheiblaue et al, 2022). Guatemala presenta de por sí una población étnicamente heterogénea, cuya respuesta a la vacunación presenta una marcada diferencia entre el área urbana y rural, lo cual es sumamente importante entender pues en los lugares donde la cobertura de la vacunación es baja, la inmunidad natural adquiere una importante relevancia (Gazit S, 2021) y esta información puede servir para determinar las actividades y aforos que se pueden permitir con la finalidad de realizar actividades virtuales/presenciales, especialmente académicas, con un nivel elevado de seguridad (Arnold C et al, 2021).

Es por lo anterior que se planteó el estudio, con la finalidad de determinar la seroprevalencia en estudiantes de dos facultades de la Universidad de San Carlos de Guatemala, con el cual se pretendió responder a la pregunta ¿es posible incorporar un método innovador para estudiar el comportamiento del SARS-CoV-2 en estudiantes de la USAC?

5 Delimitación en tiempo y espacio

5.1 Delimitación en tiempo

El estudio se inició el 1ero de febrero de 2021 y finalizó el 20 de febrero de 2022.

5.2 Delimitación espacial

El estudio se realizó en la Facultad de Ciencias Médicas y Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala ubicadas en el Centro Universitario Metropolitano zona 11 y en la Ciudad Universitaria zona 12, respectivamente.

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 a la fecha ha afectado a 233 países, con 421 millones de casos confirmados en el mundo y 750 mil casos confirmados en Guatemala, de los cuales 49,578 están activos, 682 mil están recuperados y 16,709 han fallecido para 18 de febrero de 2022 (COVID-19 Dashboard de Centro de Ciencias en Sistemas e Ingeniería, Universidad Johns Hopkins, 2022)

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 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) y posteriormente un informe indicó que el período de incubación podría ser de hasta 24 días (Guan, 2020), lo cual se ha mantenido hasta la fecha de este informe.

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 sólo se ha comprobado para el tiempo de estancia hospitalaria y están bajo evaluación clínica si realmente es eficaz para prevenir las formas más severas. 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), han sido usados para tratar SARS-CoV-2 (Alam & Raham, 2021).

6.1 Descripción general del coronavirus

Los coronavirus son un grupo muy diverso de virus, de Ácido Ribonucleico (ARN) monocatenario, de sentido positivo con envoltura que pertenecen a dos subfamilias, Coronavirinae y Torovirinae, en la familia de Coronaviridae. Estos virus se descubrieron por primera vez en la década 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-CoV 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 Síndrome de Distress Respiratorio Agudo (SDRA), lesión cardíaca aguda, infecciones secundarias o una combinación de las mismas (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, 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 transmisión de gotas o que el paciente fue infectado por una fuente actualmente desconocida. La evidencia de grupos de familiares infectados y trabajadores médicos confirmó 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 pro inflamatorios 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 granulicina 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 (Perlman & Dandekar, 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 β e IFN γ) 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 γ (IP-10), proteína quimio atrayente de macrófagos -1, proteína inflamatoria de macrófagos 1 α 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 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).

6.3 Inmunidad

Los anticuerpos contra el virus se inducen en las personas infectadas. La evidencia preliminar sugiere que algunos de estos anticuerpos son protectores, sin embargo, también puede producir autoanticuerpos que causan daños (Macela A & Kubelkova K, 2021), 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 espiga 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); en estudios más recientes establecen que el riesgo de reinfección disminuye significativamente (Hazard Ratio:

0.18 (95% CI: 0.15 a 0.20)) en aquellos pacientes que previamente estuvieron infectados y luego se vacunaron, contra aquellos que se infectaron pero no estaban vacunados (Gazit S et al, 2022).

En el año 2005, la Agencia Federal de Medicamentos de los Estados Unidos de América (FDA por sus siglas en inglés) aprobó una prueba que identifica cualitativamente los anticuerpos inmunoglobulina IgM e IgG contra el SARS en suero o plasma (Dandekar, & Perlman, 2005). Esa evidencia ha sido el punto de partida de que la presencia de estos anticuerpos refleja una respuesta inmunitaria protectora, y es la base sobre la cual se asume que la detección serológica podría ser herramienta importante para comprender la inmunidad de la población y distinguir a las personas con menor riesgo de reinfección. Algo que a la fecha no ha sido comprobado, pues no siempre la presencia de anticuerpos se correlaciona con protección, y existe también la inmunidad celular, cuyo papel aún no ha sido completamente estudiado dada las limitaciones técnicas para hacerlo (Ni et al, 2022).

Existe un amplio consenso de que las pruebas generalizadas de SARS-CoV-2 son esenciales para reabrir de manera segura los países y la economía. Una gran preocupación ha sido confiabilidad y precisión de la prueba puede ser un problema mayor a largo plazo pues incluso no ha sido aprobada para licencia para su aplicación clínica tanto en el extranjero (Guimarães, 2021) como en Guatemala. Por lo anterior, es necesario saber qué tan bien las pruebas de diagnóstico descartan la infección, y es importante revisar la evaluación de la precisión de las pruebas por parte de la 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 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 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).

6.4 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, los parientes de 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 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 han desarrollado 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 a 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 de la pandemia, se estableció que la seroprevalencia de IgG fue de 3.33% y en mujeres la seroprevalencia fue significativamente superior (3.66%) que en hombres (3.01%). Como es posible observar, al inicio de la pandemia la seroprevalencia fue 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 y educativa 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 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. En un estudio realizado en el Hospital Clinic en España se evidenció

que de 578 participantes que eran trabajadores de esa institución, 11.2% tenían evidencia de haber sufrido la infección (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 poblaciones más específicas, como estudiantes universitarios en Inglaterra, se estimó que 17.8% fueron positivos a anticuerpos para SARS-CoV-2 (Vusirikala et al., 2021) y en estudiantes de medicina, se reportó que la positividad para anticuerpos IgG a SARS-CoV-2 fue de 18% (Pérez-Tanoira et al, 2021). En la revisión de la literatura científica no se encontraron estudios en Latino América o Guatemala donde se reportara la seroprevalencia de SARS-CoV-2 en estudiantes de medicina.

8. Objetivos (generales y específicos aprobados en la propuesta)

1. Desarrollar metodologías novedosas para estudiar el comportamiento del virus SARS-CoV-2.
2. Determinar la seroprevalencia de SARS-CoV-2, en estudiantes de grado de la Facultad de Ciencias Médicas y la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala

9. Hipótesis

No aplica.

10 Materiales y métodos

10.1 Enfoque de la investigación

Cuantitativo de diseño transversal

10.2 Método

Seroprevalencia de anticuerpos SARS-COV-2.

Población objetivo: estudiantes de las Facultades de Ciencias Médicas y Medicina Veterinaria y Zootecnia de San Carlos de Guatemala, de ambos sexos, igual o mayores de 18 años de edad, no vacunados para COVID-19 y que residen en la región metropolitana del Departamento de Guatemala durante el período del estudio

Marco muestral: Las unidades primarias de muestreo fueron la Facultad de Ciencias Médicas y Medicina Veterinaria de la Universidad de San Carlos de Guatemala, ubicada en el área urbana del departamento de Guatemala.

Tamaño de la muestra: La muestra consistió en 185 estudiantes de los cuales 82 fueron de la Facultad de Ciencias Médicas y 103 de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Originalmente se había estimado una muestra de 400 estudiantes, sin embargo, no fue posible dada las limitantes que ocasionó: 1. El brote con la variante Delta durante el momento del trabajo de campo, 2. El inicio súbito de la vacunación en estudiantes de medicina (que impediría conocer la inmunidad obtenida de forma natural) 3. El tiempo que tardó la realización de las compras.

Selección de la muestra. La selección de la muestra fue independiente y no aleatoria para cada unidad académica, y se consideró a los estudiantes que dieron su consentimiento para participar en el estudio.

10.3 Recolección de información

Los estudiantes participantes de las Facultades de Ciencias Médicas y de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala llenaron electrónicamente una encuesta con datos generales y preguntas sobre factores de riesgo para enfermar de Covid-19.

Los datos de los resultados de las pruebas ELISA para SARS-CoV-2 fueron colocados en una hoja Excel. Luego, se creó una hoja Excel para unir tanto que consolidaba tanto la información de la encuesta de datos generales como como los resultados de la prueba de anticuerpos para SARS-CoV-2.

10.4 Técnicas e instrumentos

En el apéndice se detallan tanto el protocolo para la obtención de la sangre del participante, para la preparación de las muestras sanguíneas y por último, el protocolo de la prueba de anticuerpos para SARS-CoV-2 que se implementó, con los materiales e instrumentos requeridos.

Las pruebas séricas se transportaron, procesaron y analizaron en el Laboratorio Regional de Referencia en Salud Animal (LARRSA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

10.5 Procesamiento y análisis de la información (se debe redactar esto en función de los resultados)

Una vez creada la base de datos en Excel, se procedió a importar la misma al paquete estadístico STATA 13/SE® y se generaron análisis de las tablas con distribuciones de frecuencia, valores mínimos y máximos y medidas de tendencia central para identificación de valores extremos. Con respecto a las estadísticas simples, se realizaron pruebas de Chi² y se estimaron Odds Ratio con sus respectivos intervalos de confianza al 95% para identificar posibles diferencias entre los grupos y asociaciones entre variables. Se considerará estadísticamente significativo un valor $p < 0.05$ en una prueba de dos colas.

11. Resultados y discusión

11.1 Resultados.

Tabla 1

Características generales de los estudiantes por Facultad de la Universidad de San Carlos de Guatemala

Característica	Facultad de Ciencias Médicas	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Número de participantes (%)	82 (44.3)	103 (55.7)
Número de participantes de sexo femenino	45 (54.9)	60 (58.3)
Media de edad (de)* en años	20.3 (2.4)	24.2 (3.8)
Municipio de residencia No. (%)	Guatemala 46 (56.1) Mixco 9 (11.0) Villa Nueva 8 (9.8)	Guatemala 39 (37.9) Mixco 26 (25.2) Villa Nueva 19 (18.5)
Ser soltero No. (%)	76 (92.7)	102 (99.0)
Año de estudio en carrera No. (%)	Primero 54 (65.9) Segundo 24 (29.1) Tercero 4 (5.0)	Primero 18 (17.5) Segundo 13 (12.6) Tercero 35 (34.0) Cuarto 11 (11.0) Quinto 26 (24.9)
Realiza prácticas en hospital No. (%)	Si 3 (3.7)	Si 18 (17.5)
Religión	Católica 45 (54.9) Evangélica 17 (20.7) Ninguna 7 (8.5)	Católica 53 (52.0) Ninguna 16 (15.5) Evangélica 13 (12.6)

*de: desviación estándar

Tabla 2

Factores de riesgo de los estudiantes por Facultad de la Universidad de San Carlos de Guatemala

Factor de riesgo presente	Facultad de Ciencias Médicas No. (%)	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. (%)
Contacto con caso:		
Sospechoso	40 (48.8)	56 (54.4)
Confirmado	6 (7.3)	12 (11.7)
Comorbilidad:		
Diabetes mellitus	0 (0)	1 (1.0)
Hipertensión arterial	1 (1.2)	2 (2.0)
Asma	4 (4.9)	6 (5.8)
Sobrepeso	14 (17.1)	19 (18.5)
Enfermedad Renal	2 (2.4)	1(1.0)
Viajó a:		
Extranjero	7 (8.5)	1 (1.0)
Comunidad con casos	9 (11.0)	23 (22.3)

Tabla 3

**Síntomas experimentados por los estudiantes en los meses previos a la prueba realizada por
Facultad de la Universidad de San Carlos de Guatemala**

Síntoma que estuvo presente	Facultad de Ciencias Médicas No. (%)	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. (%)
Fiebre	11 (13.4)	9 (8.7)
Tos	8 (9.8)	20 (19.4)
Cefalea	31 (37.8)	23 (22.3)
Disnea	3 (3.7)	2 (1.9)
Artralgia	1 (1.2)	6 (5.8)
Mialgia	3 (3.7)	3 (2.9)
Odinofagia	2 (2.4)	3 (2.9)
Rinorrea	7 (8.5)	12 (11.7)
Conjuntivitis	2 (2.4)	6 (5.8)
Dolor torácico	6 (7.3)	7 (7.8)
Anosmia	5 (6.1)	6 (5.8)
Ageusia	2 (2.4)	4 (3.9)
Gastrointestinal	18 (22.0)	29 (28.2)

Tabla 4

Resultados de prueba PCR y anticuerpos SARS-CoV-2 en los estudiantes por Facultad de la
Universidad de San Carlos de Guatemala**

Prueba	Facultad de Ciencias Médicas	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Se realizó PCR No. (%)	13 (15.9)	25 (24.3)
PCR positiva	5 (6.1)	3 (2.9)
Prueba de anticuerpos SARS-CoV-2 positiva No. (%)	39 (47.6)	89 (86.4)
Valor p < 0.05		

** PCR: Prueba de reacción en cadena de la polimerasa

Tabla 5

Odds Ratio (OR) de las características epidemiológicas asociadas a prueba de anticuerpos SARS-CoV-2 en los estudiantes de facultades de la Universidad de San Carlos de Guatemala

Característica	Exposición	Odds Ratio (95% CI)
De tipo demográfico	Pertenecer a la Facultad de Ciencias Médicas	0.19 (0.07,0.48)
	Ser del sexo masculino	0.96 (0.41,2.19)
	Vivir en municipio de Guatemala	0.88 (0.38,2.02)
	Ser soltero	0.27 (0.04,1.95)
	Profesar una religión	1.33 (0.35,4.13)
	Ser estudiante de 1er año	8.56 (3.27,24.75)
De exposición a un caso sospechoso o confirmado	Realizar prácticas hospitalarias	4.85 (0.71,207.11)
	Contacto con caso confirmado	0.52 (0.15,2.03)
	Contacto con caso sospechoso	1.36 (0.60,3.14)
	Realizó viaje	0.63 (0.11,6.76)
	Realizó viaje a comunidad	0.41 (0.17,0.94)
De antecedente de comorbilidad	Asma	0.48 (0.10,3.07)
	Sobrepeso	0.50 (0.19,1.38)
	Enfermedad renal	0.23 (0.08,0.67)
De haber experimentado algún síntoma asociado a Covid-19 antes de la prueba de anticuerpos	Fiebre	1.25 (0.33,7.11)
	Tos	1.35 (0.42,5.79)
	Cefalea	1.36 (0.54,3.74)
	Disnea	0.86 (0.08,43.90)
	Mialgia	1.08 (0.11,53.06)
	Odinofagia	0.86 (0.08,43.9)
	Rinorrea	1.95 (0.43,18.24)
	Conjuntivitis	0.63 (0.11,6.76)
	Dolor en el tórax	0.70 (0.16,4.22)
	Anosmia	0.38 (0.15, 1.05)
	Ageusia	0.29 (0.10,0.80)
	Gastrointestinales	1.07 (0.42,3.00)

11.2 Discusión de resultados:

Este estudio tomó como punto de partida las características de los 185 estudiantes participantes, de los cuales 82 (44.3%) fueron de ciencias médicas y 103 (55.7%) de la medicina veterinaria y zootecnistas (ver Tabla 1). La media de edad de los estudiantes de medicina fue de 20 y 24 años para los estudiantes de medicina y los estudiantes de medicina veterinaria y zootecnia respectivamente. El sexo predominante fue el femenino y los tres municipios donde reportaron vivir la mayoría de los estudiantes fueron: Guatemala, Mixco y Villanueva. Un dato interesante es que ambos grupos provinieron de distintas zonas de la ciudad capital. El 92.7 al 99% de los estudiantes era soltero. En cuanto a los años de estudio, medicina tuvo más participación de estudiantes de primer año en comparación con la veterinarios y zootecnistas, donde la mayoría fue de tercer año y que, además, por estar en años más avanzados, reportaron estar realizando prácticas en hospitales. La religión católica y evangélica fueron las que con mayor frecuencia se reportaron por los estudiantes (ver Tabla 1).

A pesar de la limitante que plantea la inexistencia de una prueba de anticuerpos para detectar exposición a covid 19, que sea considerada como prueba de oro, éstas pueden ayudar al diagnóstico y manejo de esta entidad y proporcionar información sobre la cinética de la respuesta inmune, (Guo, 2017). Un aspecto muy importante es que una prueba de laboratorio es un dato es un estudio complementario, por consiguiente, no debe desplazar la importancia del interrogatorio durante un examen clínico. Una pregunta importante está relacionada con el antecedente de contacto con casos sospechosos con Covid-19, y sobre este aspecto, de 48% a 54% de los estudiantes en este estudio reportaron haber tenido un contacto cercano previo a la toma de la muestra sanguínea. Para el caso de contacto con confirmados el porcentaje fue menor (7% a 11%). Este aspecto es particularmente relevante por la seroprevalencia que se encontró en este grupo de estudio y que describiremos más adelante (ver Tabla 2). Es importante notar que los principales contactos sospechosos no fueron en la universidad, sino ocurrieron en sus hogares, pues los estudiantes en los dos últimos años han estado recibiendo clases remotas.

Dentro de las características epidemiológicas más importantes y que tienen un mal pronóstico en la enfermedad de COVID-19 se encuentran el sobrepeso y la obesidad (Gao et al, 2021). En el estudio, uno de los factores de riesgo que se presentó con mayor frecuencia fue sobrepeso, con un estimado de 18% en la población de estudiantes jóvenes, lo cual es preocupante por las implicaciones que tienen no sólo en la actual pandemia, sino también en otras pandemias de enfermedades crónicas como lo es la diabetes y la enfermedad renal, que por cierto se encontró en una frecuencia baja en el grupo estudiado (1% a 2%).

Dentro de los síntomas que más se presentaron en la población de estudiantes de medicina se encuentran (37%), malestar gastrointestinal (22%) y fiebre (13.4%), lo cual difiere de los síntomas que refirieron con más frecuencia los estudiantes de medicina veterinaria y zootecnia, siendo estos: malestar gastrointestinal (28%), cefalea (22%), tos (19%) y rinorrea (11%). Sin duda alguna, lo más relevante es que una buena proporción de estudiantes experimentaron en algún momento síntomas de Covid-19 antes de la toma de muestra sanguínea, y fue lo suficientemente relevante como para recordar y reportar los mismos. Es interesante que la frecuencia de anosmia (no oler: 5% a 6%) y ageusia (no degustar: 2% a 4%) fue relativamente baja para la cantidad de estudiantes positivos para anticuerpos contra el virus que se encontró en el estudio. (ver Tabla 3)

La proporción de estudiantes que, en algún momento, antes de la toma de la muestra sanguínea, se realizaron una PCR fue de 15% a 24%. Quienes más lo realizaron fueron los estudiantes médicos veterinarios, sin embargo, en ellos fue baja la proporción de positivos reportados (3%), comparativamente con los estudiantes de medicina (6%). Aún así, la seroprevalencia en estudiantes de medicina veterinaria fue extremadamente alta (86%), casi doblando la que se halló en estudiantes de medicina (47%) (ver Tabla 4). Estudios en Asia han reportado que la población ha tenido una elevada exposición al Covid-19, encontrándose 2.7% de prevalencia en sangre (To, et al., 2020) y 4% entre asintomáticos que retornaron de ciertas provincias. Durante la fase más importante de la pandemia, se estableció que la presencia de anticuerpos en sangre fue de 3.33% y en mujeres fue significativamente superior (3.66%) que en hombres (3.01%). Como es posible observar, al inicio de la pandemia la

seroprevalencia fue mucho más baja de lo que se habría esperado. En un estudio realizado en personal de hospitales europeos, 11.2% tenían evidencia de haber sufrido la infección (Garcia-Basteiro et al., 2020), y en Alemania (Schmidt et al., 2020) se halló que de aproximadamente 400 el 2.7% estuvieron infectados. Personal médico y paramédico de Bélgica (Martin et al., 2020) presentó 11% de casos positivos para los anticuerpos contra Covid-19. En poblaciones más específicas, como estudiantes universitarios europeos, se estimó que 17.8% fueron positivos a anticuerpos para SARS-CoV-2 (Vusirikala et al., 2021) y en estudiantes de medicina, se reportó que la positividad para anticuerpos fue de 18% (Pérez-Tanoira et al, 2021).

Al ser un estudio descriptivo exploratorio, es difícil explicar la diferencia estadísticamente significativa (valor $p < 0.05$) en de la prevalencia en sangre entre ambos grupos de estudiantes, sin embargo, fue posible identificar que, el ser estudiante de medicina fue un factor protector (OR: 0.19 (CI 95%: 0.07,0.48)), así como también tener el antecedente de una enfermedad renal (OR: 0.23 (CI 95%: 0.08,0.67)). No se investigó sobre las posibles explicaciones para la diferencia de estos datos. En el caso de la enfermedad renal, se sabe que los pacientes tienen más cuidado con los contactos y entorno, debido a su vulnerabilidad permanente de contraer la infección (ver Tabla 5).

El único factor de riesgo que se encontró fue el ser estudiante de primer año (OR: 8.56 (CI 95%: 3.27,24.75)). Esto tiene sentido pues cuando un estudiante comienza, independientemente de la carrera, suele no tener un entrenamiento previo en las medidas de bioseguridad ni de salud pública básicas para mitigar la transmisión del Covid-19, por otro lado, ser estudiante de primer año de la carrera también está relacionado con la edad, estos estudiantes son más jóvenes, lo que los expone a una mayor probabilidad de contagiarse (ver Tabla 5).

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 prevalencia en suero 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), en caso de que ésta exista, lo cual es muy importante para alcanzar la reactivación económica y educativa de los países en el mundo, y en especial, de Guatemala, donde es necesario contar con planes que incluyan modelos que ayuden a predecir lo que ocurriría ante una salida del confinamiento. En este sentido, este estudio provee información de la seroprevalencia de SARS-CoV-2 en estudiantes de dos facultades del área de salud de la Universidad de San Carlos de Guatemala y demuestra que es posible desarrollar métodos innovadores para estudiar el comportamiento del virus SARS-CoV-2, lo cual a futuro, es información clave para incluir en los modelos de predicción, como fue el caso de Francia (Dimeglio et al., 2020).

12. 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>
- Alam W., & Rahman A.(2021) Efficacy of tocilizumab in COVID-19: A review of the current evidence. United States of America, California: Science Progress 2021. <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/00368504211030372>
- Arnold C., Srinivasan S., Rodriguez S., Rydzak N., Herzog C., Gontu A., Bharti N., Small M., Rogers C., Schade M., Kuchipudi S., Kapur V., Read A, & Ferrari M. (2021). SARS-CoV-2 Seroprevalence in a University Community: A Longitudinal study of the impact of student return to campus on infection risk among community members. United States of America: medRxiv. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7899462/>

- Assefa Y., Gilks C., Van De Pas R., Reid S., & Damme W. (2021). Reimagining global health systems for the 21st century: lessons from the COVID-19 pandemic. Commentary Handling editor Seye Abimbola. England: *BMJ Global Health*. <https://gh.bmj.com/content/6/4/e004882>
- Bergeri I., Whelan M., Ware H., Subissi L., Nardone A., Lewis H.C., Li Z., Ma X., Valenciano M., Cheng B., Al Ariqi L., Rashidian A., Okeibunor J., Azim T., Wijesinghe P., Le L-V., Vaughan A., Pebody R., Vicari A., Yan T., Yanes-Lane M., Cao Ch., Cheng M., Papenburg J., Buckeridge D., Bobrovitz N., Arora R., van Kerkhove M.D., the Unity Collaborator Group. (2021) Global epidemiology of SARS-CoV-2 infection: a systematic review and meta-analysis of standardized population-based seroprevalence studies, Jan 2020-Oct 2021. United States of America: medRxiv. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.12.14.21267791v1>
- Bi Q., Lessler J., Eckerle I., Lauer S.A., Kaiser L., Vuilleumier N., Cummings D., Flahault A., Petrovic D., Guessous I., Stringhini S., Azman A., & SEROCov-POP Study Group. (2021) United States of America: Nature Communications. <https://www.nature.com/articles/s41467-021-23733-5>
- 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>
- Domingo, E., Sheldon, J., & Perales, C. (2012). Viral Quasispecies Evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), 159-216. <https://doi.org/10.1128/mnbr.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>
- Gao M., Piernas C., Astbury N., Hippisley-Cox J, O'Rahilly S., Aveyard P., & Jebb S. (2021) Associations between body-mass index and COVID-19 severity in 6.9 million people in England: a prospective, community-based, cohort study. *England; The Lancet Diabetes & Endocrinology*. [https://www.thelancet.com/journals/landia/article/PIIS2213-8587\(21\)00089-9/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/landia/article/PIIS2213-8587(21)00089-9/fulltext)
- Gazit S., Shlezinger R., Perez G., Lotan R., Peretz A., Ben-Tov A., Cohen D., Muhsen K., Chodick G., & Patalon T.(2021) Comparing SARS-CoV-2 natural immunity to vaccine-induced immunity:reinfections versus breakthrough infections. (2021) United States of America: medRxiv <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.08.24.21262415v1>
- Gazit S., Shlezinger R., Perez G., Lotan R., Peretz A., Ben-Tov A., Herzal E., Alapi H., Cohen D., Muhsen K., Chodick G., & Patalon T.(2022) United States of America: *Annals of Internal Medicine*. The incidence of SARS-CoV-2 Reinfection in persons with naturally acquired immunity with and without subsequent receipt of a single dose of BNT162b2 vaccine. A retrospective cohort study. <https://www.acpjournals.org/doi/10.7326/M21-4130>
- 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>
- Guimarães L., (2021) Antibody Tests: They are more important than we thought. United States of America: medRxiv. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.02.06.21251251v1.full>
- 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>
- 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., Prestigiaco, 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)
- Macela A., & Kubelkova K. (2021) Why does SARS-CoV-2 infection induce autoantibody production? MDPI: Pathogens. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8004127/>
- Mahallawi, W. H., Khabour, O. F., Zhang, Q., Makhdoum, 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>

- McConnell D., Hickey C, Bargary N., Trela-Larsen L., Walsh C., Barry M., & Adams R., (2021) Understanding the challenges and uncertainties of seroprevalence studies for SARS-CoV-2. Switzerland: International Journal of Environmental Research and Public Health. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8123865/pdf/ijerph-18-04640.pdf>
- 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>
- Ni L., Cheng M-L., Feng Y., Zhao H., Liu J., Ye F., Ye Q., Zhu G., Li X., Wang P., Shao J., Deng Y-Q., Wei P., Chen F., Qin C-F., Wang G., Li F., Zeng H., & Dong Ch.(2022) Impaired cellular immunity to SARS-CoV-2 in severe COVID-19 patients. England: *Frontiers in immunology*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.603563/full>
- 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>
- Pérez-Tanoira R., Lledó L., González M.T., Rodríguez M., Arroyo T., Giménez C., Rodríguez M.I., Romero M.N., Pérez-García F., González P., Villaescusa C., & Cuadros J., High seroprevalence against SARS-CoV-2 among faculty of medicine and health sciences personnel and students of the University of Alcalá, Spain. Contributing Factors. England: *International Journal of General Medicine*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8544125/>
- 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>

- Scheiblauer H., Nübling C.M., Wolf T., Khodamoradi Y., Bellinghause C., Sonntagbauer M., Esser-Nobis K., Filomena A., Mahler V., Mahler V., Maier T.J., & Stephan C. (2022). Antibody response to SARS-CoV-2 for more than one year – kinetics and persistence of detection are predominantly determined by avidity progression and test design. Netherlands: Elsevier. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138665322100319X>
- 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)
- Vusirikala A., Whitaker H., Jones S., Tessier E., Borrow R., Linley E., Hoschler K., Baawuah F., Ahmad S., Andrews N., Ramsay M., Ladhani S., Brown K., & Amirthalingam G. (2021) Seroprevalence of SARS-CoV-2 antibodies in university students: Cross-sectional study, December 2020, England. Netherlands: Elsevier. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8081745/>
- 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). Preprint MedRxiv, 0. <https://doi.org/10.1101/2020.02.10.20021832>

- Wang¹, 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>
- Wang², 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>
- 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^a, 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^b, 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>

13. Apéndice

Agregue aquí mapas, fotografías, esquemas, códigos de computadoras, encuestas, permisos de programas, documentos legales que considere necesarios para respaldar las diferentes actividades y resultados de su investigación.

Protocolo: Centivax-USAC SARS-CoV-2 Antibody Assay (CUSAA)

Nota: Este protocolo es producto de un estudio previo que recibió financiamiento de la Digi USAC y tiene la posibilidad de ser patentado, procedimiento que aún está en discusión por los investigadores del proyecto original.

Sarah Ives, P.S.M.

Director of Contract Research, Distributed Bio Inc.

Co-Founder, Centivax Inc.

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 plates, any vendor
- 20x PBS Solution, 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 single channel pipette
- P1000 100-1000uL single channel pipette
- P20 2-20uL 12-channel multichannel pipette
- 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. Do not re-use.
- 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 snap-cap tubes
- 5 mL Eppendorf snap-cap tubes
- 500-mL sterile filtration units
- 2L plastic bottles for 1xPBS and 1xPBS-T non-sterile wash solutions.
- 1N (1M) HCl or 1N (0.5M) H₂SO₄
 - We make this in-house by diluting it from concentrated HCl (Sigma, 258148-500ML) in a chemical fume hood. See Appenix IV.
- Bleach
- Shallow, wide plastic bucket for making a 10% bleach solution
- BSL-2 Biohazardous waste disposal bags/containers

EN REFRIGERACION (4°C):

- TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) Liquid Substrate System for ELISA, Sigma-Aldrich, T0440-100ML. Do not purchase larger bottles because they get contaminated.
- 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

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 centrifuga 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.

(# de mL de PBS) x (1 ug / mL)

de uL de proteína RBD = _____

(Solución madre de 1,34 ug / ul)

Ejemplo: (21,12 mL de PBS) x (1 ug / mL)

_____ = 15,8 uL de proteína RBD

(Solución madre de 1,34 ug / ul)

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 haga 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 haga 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.

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

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

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

Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI-

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			

Figura 2. Disposición de la placa de dilución 1. 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.
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 centrifuga 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.
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.
 - 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.
 - 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.

Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI-

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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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	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.

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

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:

$$\# \text{ de ml de BSA al 5\%} = \# \text{ de placas} \times 96 \text{ pocillos} / \text{placa} \times 0,055 \text{ ml} / \text{pocillo}$$

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.

$$\# \text{ de mL de BSA al 5\%}$$

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

(21,12 ml de BSA al 5%)

Ejemplo: $1000 \times \frac{21,12}{10,000} = 2,1 \text{ uL secundario}$
10,000 anticuerpos

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:

de mL de TMB = # 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 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 H₂SO₄ 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_{450nm} 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)
 - 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.

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 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. Recomiendo la marca BioTek.

Protocolo General de toma de muestras sanguíneas por venopunción

I. OBJETIVO:

Contar con un procedimiento estandarizado para realizar de forma correcta la toma de muestra de sangre periférica/médula ósea en el laboratorio de “”

II. ALCANCE:

Este procedimiento es aplicable en el laboratorio de “”, y por tanto puede ejecutarse por todo el personal que labore de forma permanente o las personas que se encuentren temporalmente en proyectos de investigación en los que se requiera de muestras de sangre periférica.

III. RESPONSABILIDADES:

Todo el personal que labora como técnico de investigación o las personas responsables de proyectos son los encargados de la correcta realización de este procedimiento.

El profesional, jefe o encargado de Laboratorio debe monitorear y asegurar que el procedimiento se lleve a cabo bajo todas las condiciones establecidas.

IV. MATERIALES Y EQUIPO:

1. SANGRE COMPLETA

- Ficha del Paciente
- Bata
- Tubos de extracción al vacío nuevos y estériles CON anticoagulante K3 EDTA (Tapón morado), volumen mínimo de 5cc (adultos) o 2.5 (pediátricos)
- Agujas para sistema de extracción al vacío de 21 X 1 1/2 con adaptador de tubos al vacío o Jeringa desechable de 10 ml con aguja desechable de 21 X 1 1/2

- Ligadura
- Algodón
- Alcohol etílico 70%
- Contenedor de punzocortantes (guardián)
- Guantes descartables
- Marcador indeleble punto fino para rotular
- Gradilla
- Refrigeradora
- Palillos

2. PLASMA

- Ficha del paciente
- Bata
- Tubos de extracción al vacío nuevos y estériles CON anticoagulante K3 EDTA (Tapón morado), volumen mínimo de 5cc (adultos) o 2.5 (pediátricos)
- Agujas para sistema de extracción al vacío de 21 X 1 1/2 con adaptador de tubos al vacío o Jeringa desechable de 10 ml con aguja desechable de 21 X 1 1/2.
- Ligadura
- Algodón
- Alcohol etílico 70%
- Contenedor de punzocortantes (guardián)
- Guantes descartables
- Marcador indeleble punto fino para rotular
- Gradilla
- Pipetas de transferencia desechables
- Viales estériles de 2 ml de capacidad, con tapadera de rosca
- Mascarilla (opcional)
- Refrigeradora
- Centrífuga
- Congelador

3. SUERO

- Ficha del paciente
- Bata
- Tubos de extracción al vacío nuevos y estériles sin anticoagulante (Tapón anaranjado), volumen mínimo de 5cc (adultos) o 2.5 (pediátricos)

- Agujas para sistema de extracción al vacío de 21 X 1 1/2 con adaptador de tubos al vacío o Jeringa desechable de 10 ml con aguja desechable de 21 X 1 1/2.
- Ligadura
- Algodón
- Alcohol etílico 70%
- Contenedor de punzocortantes (guardián)
- Guantes descartables
- Marcador indeleble punto fino para rotular
- Gradilla
- Pipetas de transferencia desechables
- Viales estériles de 2 ml de capacidad, con tapadera de rosca
- Mascarilla (opcional)
- Refrigeradora
- Centrífuga
- Congelador

V. PROCEDIMIENTO DE VENOPUNCIÓN

GENERALIDADES

1. Colocar sobre la mesa de trabajo todo el material que se necesitará para ejecutar la obtención de muestra.
2. Llenar la ficha epidemiológica del paciente con los datos que se solicitan y explicar al paciente el propósito de los exámenes a practicársele. Rotular el/los tubo(s) con nombres, apellidos y edad del paciente o código según protocolo
3. Lavarse las manos previamente a la extracción de sangre y colocarse los guantes.
4. Sentar al paciente en un lugar cómodo de manera que el brazo donde se extraerá la muestra quede colocado, paralelamente, a la mesa de trabajo donde se hará la extracción de sangre.
5. Observar las venas del antebrazo a nivel del pliegue del codo o cualquier vena sobresaliente.
6. Limpiar la zona de punción con algodón embebido en alcohol, haciendo movimiento de adentro hacia afuera en forma circular sobre la zona de punción.
7. Colocar la ligadura de 4 a 5dedos sobre el pliegue del codo.
8. Según el sistema de extracción, seguir instrucciones precisas: 2.2 Venopunción con jeringa o 2.3 Venopunción con sistema de extracción al vacío.
9. Aplicar una pieza seca de algodón sobre la parte donde se encuentra oculta la punta de la aguja

10. Retirar la ligadura del brazo del paciente.
11. Sacar la aguja con movimiento rápido por debajo de la pieza de algodón.
12. Indicar al paciente que flexione su brazo de modo que haga presión sobre la herida hasta que cicatrice
13. Los tubos con aditivo se deben de agitar suavemente, invirtiéndolos 4 veces con movimientos de “ocho acostado” (∞).
14. Descartar material contaminado según Sección 4 de este manual.

VENOPUNCIÓN CON JERINGA

1. Introducir la aguja de la jeringa con el bisel hacia arriba y un ángulo aproximado de 15 a 30 grados, sobre la vena seleccionada.
2. Extraer 5 a 10 mililitros de sangre. En caso de pacientes pediátricos, extraer de 3 a 5 cc.
3. Retirar la aguja de la jeringa **NO REENFUNDE LA AGUJA CON LA MANO**, (Ver Sección 4 de este manual, Página 6) y colóquela en un recipiente de descarte.
4. Abrir el tubo estéril sin/con anticoagulante y deslice suavemente el émbolo de la jeringa para dejar caer la muestra de sangre.
5. Tapar el tubo con su respectivo tapón.

VENOPUNCIÓN CON SISTEMA DE EXTRACCIÓN AL VACÍO

1. Girar la sección blanca de la aguja.
2. Colocar la cubierta de protección gris en el extremo de rosca del adaptador y ajustarlo bien. **NOTA:** no se debe remover la cubierta gris.
3. Quitar el tapón de la aguja.
4. Con el bisel de la aguja hacia arriba, alinear la aguja con la vena, penetrar la piel y entrar en la vena a un ángulo de aproximadamente 15 a 30 grados.
5. El orden para tomar muestras múltiples en una sola venopunción es: Tubo sin aditivo y luego el tubo con aditivo.
6. Sostener el adaptador para evitar el movimiento de la aguja en el brazo del paciente y empujar el tubo hacia delante hasta que la parte posterior de la aguja puncione el tapón.
7. Mantener el tubo más bajo que el sitio de punción mientras la aguja este en la vena.

8. Libere el torniquete y solicitar al paciente que abra el puño cuando la sangre empiece a fluir por el tubo
9. Mantener presión constante sobre el tubo en dirección de la aguja para evitar que se interrumpa el flujo de sangre.
10. Esperar que el tubo se llene de sangre con un volumen hasta agotar el vacío del tubo. **NOTA** El tubo no se llenará en su totalidad.
11. Mientras se llena el tubo coloque el adaptador entre su dedo pulgar e índice para evitar que se movilice.

PROCEDIMIENTO PARA PREPARACIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS

SANGRE COMPLETA

1. Refrigerar entre 2 a 8 °C. **NOTA:** Nunca congele la muestra de sangre completa ya que produce hemólisis.
2. Verificar que todos los datos estén completos en la ficha epidemiológica y que los datos coincidan con la rotulación de la muestra.
3. Transportar al LNS durante 24 a 48 horas como máximo y entre 2 a 8 °C.

PLASMA O SUERO

NOTA: El suero o plasma debe separarse dentro de las 2 a 3 horas después de extraída la muestra. Si no fuera posible, conservar la muestra entre 2 a 8°C durante 24 a 48 horas como máximo antes de su separación. NUNCA congele la sangre completa ya que esto produce hemólisis

1. Centrifugar la muestra entre 1500 rpm a 2500 rpm durante 10 minutos, manteniendo el tubo tapado.
2. No detener bruscamente la centrífuga (produce ruptura y aerosoles).
3. Una vez centrifugada, manipular lentamente los tubos para no alterar la separación.
4. En caso de no contar con centrífuga, aprovechar la acción de la separación natural del plasma y paquete globular.
5. Rotular el (los) vial (es) con nombres, apellidos y edad del paciente o código según protocolo De manera aséptica, destapar cuidadosamente el tubo empleado.
6. Con ayuda de una pipeta de transferencia desechable estéril, transferir el suero a viales estériles de 2ml.
7. Llenar los viales con 1.5 ml de suero como máximo, si hay cantidad extra de suero utilizar otro vial para una misma muestra.

8. Tapar herméticamente.
9. Verificar que todos los datos estén completos en la ficha epidemiológica y que los datos coincidan con la rotulación de la muestra.

Mantener en cadena de frío, NO CONGELAR, desde el momento de extracción-retracción del coagulo, hasta la entrega de la muestra al Laboratorio.

14. Aspectos éticos y legales (si aplica)

El estudio se realizó en sujetos humanos, estudiantes de la Universidad de San Carlos de Guatemala, mayores a 18 años de edad. Para el mismo se cumplió con respetar los principios de autonomía, beneficencia y justicia. Se obtuvo el consentimiento informado de cada uno de los sujetos a investigar. Ninguna información sobre datos personales fue de acceso público. La información personal que se obtuvo fue guardada y conocida sólo por el investigador principal en una oficina con seguro y la misma fue guardada en archivador cuya llave solo tiene acceso el investigador principal. Durante el manejo de datos se omitió lo relacionado a la información personal y se creó una base de datos sin identificadores personales a la que sólo tuvo acceso el investigador principal y los co-investigadores.

La investigación conllevó riesgos mínimos para las personas encuestadas, la cual consistió en la extracción de sangre venosa por extracción con sistema a vacío. El estudio tuvo un beneficio directo para la persona pues. Los casos identificados como positivos para la prueba de anticuerpos para SARC-CoV-2 fueron manejados por el Dr. Erwin Calgua, médico y cirujano, con entrenamiento en epidemiología clínica, y educó a los participantes sobre las conductas a seguir.

Cada sujeto tuvo la oportunidad de participar voluntariamente, y pudo solicitar su retiro en cualquier momento del estudio, sin embargo, ninguno de los participantes lo hizo. Para dejar registrada su aceptación voluntaria cada participante firmó la forma de consentimiento informado de este estudio. El estudio contó con el aval del Comité de Bioética en Investigación de la Facultad de Ciencias Médicas de la USAC.

15. Vinculación

Se trabajó en vinculación con el Laboratorio de Referencia Regional de Sanidad Animal - LARRSA-, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

16. Estrategia de difusión, divulgación y protección intelectual

La divulgación de este estudio se hizo a través del informe final, así como se realizaron dos presentaciones vía google meet a los estudiantes de ambas facultades, por separado, de los resultados obtenidos con la investigación. Se ha preparado un manuscrito el cual se presentará en la revista Ciencia, Tecnología y salud de la Digi Usac.

Los resultados serán compartidos con las autoridades de las unidades académicas participantes para que se incluyan en las sesiones académicas de diversos cursos.

17. Aporte de la propuesta de investigación a los ODS:

El estudio contribuye con el Objetivo de Desarrollo Sostenible (ODS) 3: Salud y bienestar, pues logra un gran avance en la lucha contra una de las causas principales de muerte y enfermedad como lo es COVID-19, a través de que desarrolló una metodología novedosa para estudiar el comportamiento del virus SARS-CoV-2 lo que permitió determinar la seroprevalencia de SARS-CoV-2 en población guatemalteca de alto riesgo, y por consiguiente será posible impactar en la toma de decisiones para un retorno a actividades virtuales/presenciales en la universidad y de educación en general.

18. Orden de pago final


Nombres y apellidos	Categoría (investigador /auxiliar)	Registro de personal	Procede pago de mes (Sí / No)	Firma
No aplica				

Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI-



19. Declaración del coordinador(a) del proyecto de investigación

El coordinador de proyecto de investigación con base en el *Reglamento para el desarrollo de los proyectos de investigación financiados por medio del Fondo de Investigación*, artículos 13 y 20, deja constancia que el personal contratado para el proyecto de investigación que coordina ha cumplido a satisfacción con la entrega de informes individuales por lo que es procedente hacer efectivo el pago correspondiente.

Dr. Erwin Humberto Calgua Guerra	
Nombre del coordinador del proyecto de investigación	Firma
Fecha: 25/02/2022	

20. Aval del director(a) del instituto, centro o departamento de investigación o Coordinador de investigación del centro regional universitario

De conformidad con el artículo 13 y 19 del *Reglamento para el desarrollo de los proyectos de investigación financiados por medio del Fondo de Investigación* otorgo el aval al presente informe final de las actividades realizadas en el proyecto DIGI AP-13 2021 titulado “*Metodologías novedosas para estudiar el comportamiento del virus SARS-COV 2*” en mi calidad de Directora de Investigación de la Facultad de Ciencias Médicas de la USAC, mismo que ha sido revisado y cumple su ejecución de acuerdo a lo planificado.

Dra. Magda Francisca Velásquez Tohom Directora de Investigación Facultad de Ciencias Médicas USAC	Firma  
Fecha: 25/02/2022	

21. Visado de la Dirección General de Investigación

Vo.Bo. Hilda Valencia de Abril del Programa Universitario de Investigación Interdisciplinaria en Salud -PUIIS-	Firma
Fecha: 25/02/2022	

Vo.Bo. Ing. Agr. Rufino Salazar Coordinador General de Programas Universitarios de Investigación	Firma
Fecha: 25/02/2022	