



Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Carrera de Ciencias Biológicas

Tesina de Grado para optar por el título de Bióloga

“Desarrollo de una técnica de diagnóstico de Inmunofluorescencia de SARS-CoV-2 a partir de muestras de pacientes con Covid19”

Alumna: Bravo, María Milagros

Firma:

Directora: Prof. Dra. Alicia Cámara

Firma:

2022

Instituto de Virología “Dr. José María Vanella” - INVIV

Alumna: Bravo, María Milagros

Directora: Prof. Dra. Alicia Cámara

Tribunal Examinador:

- **Dr. Arnaldo Mangeaud** **Firma**
- **Dr. Héctor Alejandro Guidobaldi** **Firma**
- **Dra. María Celia Frutos** **Firma**

Calificación:

Fecha:

Agradecimientos

Quiero agradecer inicialmente a la Dra. Alicia Cámara por instruirme en los primeros pasos en la investigación, guiarme, acompañarme y enseñarme brindando siempre todos sus conocimientos con afecto, generosidad, solidaridad, y paciencia.

A la Dra. Pilar Adamo por brindar el espacio de trabajo y su colaboración en la primera etapa de este proyecto y fundamental que se llevó a cabo en la incertidumbre de la Pandemia.

A la Dr. María Celia Frutos y Dra. Viviana Raskovsky por colaborar con este proyecto y enseñarme siempre con generosidad y solidaridad.

A Candela Herrera e Ismael Pérez , por ser excelentes compañeros de laboratorio. A Jorge Cámara, por colaborar y por sus explicaciones sobre la PCR Real Time.

También a todo el equipo de trabajo del Instituto de Virología “Dr JM Vanella”, la Dra Silvia Nates, directora del Instituto, que brindó la posibilidad y las diferentes autorizaciones necesarias para realizar el proyecto. A la Dra. Sandra Gallegos por brindarnos las improntas de cultivo celular. A Lula, Pedro, Ariana, Gisela y Manuel por invitarnos a trabajar en su laboratorio y expandir nuestros conocimientos así como también aportaron con su granito de arena en este recorrido.

A los centros de salud colaboradores Hospital Arturo Illia de Alta Gracia, Hospital Señor del Milagro de Salta, Hospital Italiano de Córdoba, Hospital Clínicas de Córdoba, y la Fundación para el progreso de la medicina por brindar las muestras sin las cuales el proyecto no se podría haber llevado a cabo.

A la Dra. Adriana Gruppi de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC, por brindar muestras y reactivos y al Dr. Pablo Lopez del Instituto Ferreyra por brindarnos reactivos.

Al Dr. Gonzalo Rodríguez del Laboratorio de Hemoderivados que nos facilitó la Gammaglobulina como un gran aporte al proyecto.

A los Dres. Martín Rumbo, Yanina Iriarte y Guillermo Docena del Laboratorio del IIFP de la UNLP por brindarnos gentilmente los Anticuerpos Monoclonales y aportar con su vasto conocimiento.

Por último pero sin duda no menos importante, a mis amigos que estuvieron desde diferentes lugares apoyando, haciendo el aguante y con los que compartí estos increíbles años en la facultad. Y a mi familia, en especial a mis padres Daniel y Carolina y mis hermanas Belén y Consuelo, que siempre priorizaron mis estudios y me acompañaron por este camino, siendo un gran sostén, apoyándome en cada dificultad presentada y compartiendo cada logro obtenido.

ÍNDICE

RESUMEN.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 Infecciones Respiratorias.....	7
1.2 Antecedentes de Coronavirus.....	8
1.3 Taxonomía.....	11
1.4 Estructura de SARS-CoV 2.....	12
1.5 Replicación de SARS-CoV 2.....	13
1.6 Manifestaciones Clínicas.....	15
1.7 Diagnóstico Clínico.....	15
2. PROBLEMA E HIPÓTESIS.....	18
3. OBJETIVOS.....	19
3.1 General.....	19
3.2 Específicos.....	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
4.1 Improntas celulares.....	21
4.2 Implementación de la Inmunofluorescencia Directa.....	23
4.2.1 Bloqueo.....	24
4.2.2 Anticuerpos primarios Policlonales.....	25
4.2.3 Gammaglobulina.....	26
4.2.4 Anticuerpos Monoclonales.....	27
4.2.5 Controles.....	27
4.3 Imágenes de la Inmunofluorescencia.....	28
4.4 Análisis estadísticos.....	29
5. RESULTADOS.....	29

5.1 Panorama epidemiológico descriptivo de los pacientes participantes de esta prueba metodológica.....	29
5.2 Improntas celulares.....	31
5.3 Implementación de la Inmunofluorescencia Directa.....	31
5.3.1 Anticuerpos primarios policlonales.....	31
5.3.2 Gammaglobulina.....	36
5.3.3 Anticuerpos Monoclonales.....	39
6. DISCUSIÓN.....	42
7. CONCLUSIÓN.....	47
8. BIBLIOGRAFÍA.....	48

Palabras claves: Inmunofluorescencia directa; SARS CoV-2; anticuerpos policlonales/monoclonales; diagnóstico diferencial

RESUMEN

El SARS-CoV-2 es el virus causante de la enfermedad llamada COVID-19, siendo el diagnóstico temprano particularmente importante, no solo para prolongar la supervivencia de los pacientes, sino también para garantizar la seguridad de la población. Este trabajo tiene como objetivo desarrollar una herramienta de diagnóstico rápido de SARS-CoV-2 basada en una técnica de detección de antígeno viral por inmunofluorescencia (IFD).

Las muestras remitidas por los centros asistenciales colaboradores se procesaron siguiendo todas las medidas de seguridad recomendadas, y a partir de ellas se realizaron un total de 165 improntas positivas y 59 improntas negativas.

Con dichas improntas se procedió a la optimización/estandarización de la IFD siguiendo el procedimiento habitual. Los anticuerpos primarios fueron policlonales como sueros de pacientes convalecientes y gammaglobulinas, y anticuerpos monoclonales. Los conjugados fueron anticuerpos secundarios policlonales de cabra contra IgG de ratón y de origen humano, y de ratón contra IgG humana marcados con FITC. Se utilizaron un total de 33 improntas para cada uno de los anticuerpos primarios puestos a prueba. Además se determinaron sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de la técnica utilizando el programa estadístico R-medic.

En los resultados se muestran imágenes obtenidas con cada anticuerpo primario junto a los controles correspondientes, en donde observamos buenos patrones de fluorescencia definidos. Por otro lado los valores de evaluación de la técnica se obtuvieron realizando los análisis en comparación con la técnica RT-PCR. Los resultados fueron para el Suero post-infección: sensibilidad de la IFD fue de 82% , la especificidad de 64% (Tabla 2) , el VPN fue de 64% , y el VPP fue de 82%; Suero post-vacunal: sensibilidad de la IFD fue de 83% , la especificidad de 60% (Tabla.3), el VPN fue de 60% , y el VPP fue de 83%; Suero post-infección con título: sensibilidad de la IFD fue de 84% , la especificidad de 57% (Tabla. 4) , el VPN fue de 73% , y el VPP fue de 73%; Gammaglobulina: sensibilidad

de la IFD fue de 85%, la especificidad de 67% (Tabla. 5), el VPN fue de 50% , y el VPP fue de 92%; Monoclonales Anti-N y Anti-RBD: sensibilidad de la IFD fue de 92% , la especificidad de 78% (Tabla. 6) , el VPN fue de 78% , y el VPP fue de 92%. Obteniendo buenos valores de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN.

Este trabajo de tesis comunica por primera vez el desarrollo e implementación de un método diagnóstico directo de SARS-CoV-2 por IFD completamente “in house”, para ser aplicado en el tamizaje inicial como diagnóstico diferencial cuando esta infección forme parte de las IRAs estacionales, yendo desde la pandemia a la endemia regional.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Infecciones Respiratorias

Las infecciones respiratorias constituyen un importante problema de salud pública, pues representan la mayor causa de morbi-mortalidad en el mundo. Son procesos infecciosos multicausales debido a agentes de diferente naturaleza en un mundo globalizado, con muchas desigualdades sociales y cambios climáticos evidentes. Los virus emergentes causantes de infecciones respiratorias como algunos de Influenza o Coronavirus son un riesgo permanente para la humanidad.

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) se conocen como infecciones del aparato respiratorio, las cuales se manifiestan con síntomas que afectan el sistema respiratorio, tales como dificultad al respirar, tos, rinorrea, odinofagia, disfonía en los casos leves. Bronquiolitis y neumonía en los más severos, llegando a ser en algunos casos fatales. Las IRAs pueden ser provocadas por factores físicos, químicos, biológicos y emocionales. Dentro de los biológicos pueden tener variada etiología; el origen puede ser viral, bacteriano, por micoplasmas, clamidias, rickettsias, hongos, entre otros. Sin embargo, las infecciones respiratorias son causadas principalmente por bacterias y virus (Carballal *et al.* 2015). Dentro de los virus causantes de IRAs encontramos diferentes agentes como Virus Respiratorio Sincicial (RSV), Adenovirus (Ad), Influenza (Flu) A y B, y Parainfluenza (PI) 1, 2 y 3, Metapneumovirus (MPVh), Rinovirus (RV), Enterovirus (EV), Coronavirus (CoV) y Bocavirus (BoV).

Los virus productores de IRAs penetran por la mucosa del tracto respiratorio, replican en él y producen numerosos cuadros respiratorios de diferente gravedad, dependiendo del estado inmune de la persona (Carballal *et al.* 2015). La infección habitualmente ocurre por inhalación de aerosoles con gotitas de Flugge o por gotas de mayor tamaño, contaminadas con secreciones infectadas. Es muy frecuente la auto-inoculación por manos contaminadas o fómites (máscaras de oxígeno, nebulizadores, pañuelos, etc.) (Carballal *et al.* 2015).

Las IRAs se clasifican en altas (IRAA) o bajas (IRAb) según afecten el tracto respiratorio superior o inferior, respectivamente. Las IRAs altas constituyen la mayor causa

de morbilidad en el ser humano en todo el mundo, mientras que las IRAs bajas son una de las principales causas de mortalidad en niños menores de 4 años en países en vías de desarrollo (Carballal *et al.* 2015).

1.2 Antecedentes de Coronavirus

El coronavirus humano (HCoV) se conoce desde el siglo XX, detectándose clínicamente el primer miembro de la familia que infectaba animales en el año 1930 (Cámara *et al.* 2018). Se consideraba un agente de baja patogenicidad que generaba infecciones respiratorias leves. En 1965 se describen los primeros coronavirus en humanos (HCoV) (Fig.1), HCoV-OC43 y HCoV-229E y agentes etiológicos frecuentes de infecciones respiratorias agudas estacionales que también incluyen a HCoV-NL63 y HCoV-HKU1 descritos en el 2005. Estos HCoV son endémicos, con amplia distribución geográfica, cosmopolitas, de circulación estacional y responsables del 2 al 18% de todas las infecciones respiratorias altas (Dabanch, 2021). Además también se los encuentra asociados a enfermedades del tracto respiratorio inferior, incluyendo bronquiolitis y neumonía. El 229E se asocia particularmente con asma, mientras que éste junto con OC43 se asocian al resfriado común, al catarro, a la exacerbación de asma y a la neumonía en adultos (Cámara *et al.* 2018).

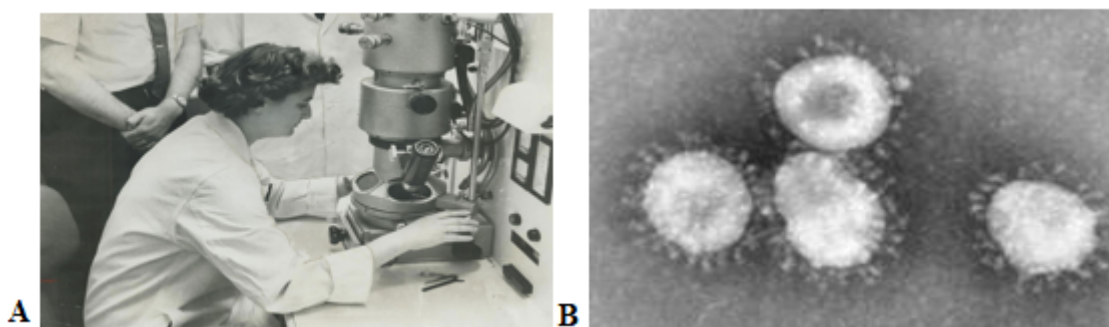


Fig.1. Coronavirus. A: June Hunt Almeida técnica que tomó la primera fotografía electrónica de Coronavirus en 1965. B: Microfotografía electrónica de Coronavirus.

En el siglo XXI surgieron tres grandes brotes de coronavirus humanos que han adquirido una patogenicidad mayor a la conocida. Estos son el SARS-CoV (*Severe Acute Respiratory Syndrome-CoronaVirus*) que se manifestó en Guangdong, China en el año 2002, causado por un HCoV de alta transmisibilidad, con elevado número de casos graves y alta tasa de mortalidad, alcanzando una letalidad de 10% (Su, S., *et al.* 2016). Otro fue, el MERS-CoV (*Middle East Respiratory Syndrome-CoronaVirus*) que se presentó en Medio Oriente el año 2012, con una letalidad del 35%. Su aparición es inusitada, en lugares donde hay alta interacción entre animales silvestres, domésticos y humanos. Los análisis genéticos demostraron que se encontraba relacionado a un linaje de coronavirus de murciélago y luego se identificaron a los camellos dromedarios como la fuente eslabón intermediario de algunos casos en humanos. Así, los coronavirus muestran una habilidad particular para traspasar la barrera de especie y adaptarse a nuevos hospedadores. Esta capacidad para la transmisión animal-humano y también a la inversa, de humano-animal, despierta el interés de los científicos y mantiene en alerta los sistemas de vigilancia del síndrome agudo respiratorio severo o grave (SARS ó SARG) en el mundo (Moreira-Soto, A. *et al.* 2013; Su, S., *et al.* 2016). Actualmente hay líneas de investigación que creen que el ancestro inmediato del HCoV-SARS en humanos ha desaparecido, otros estudios investigan el murciélago como eslabón primario y, como intermediarios a pangolines, camellos, civetas, etc. Sin embargo, no se descartaba la posibilidad de su reaparición o reemergencia (Cámara *et al.* 2018).

En el año 2020 la OMS declaró un nuevo brote de coronavirus humano, en este caso de SARS-CoV-2 (Rozas *et al.* 2020). Éste es un HCoV emergente causante de la enfermedad llamada COVID-19. La infección en humanos empezó a ser significativa en Wuhan, China, en diciembre de 2019, cuando comenzó a surgir en varios hospitales locales, y devino en pandemia a pocos meses de haber sido identificado el nuevo virus (Biscayart *et al.*, 2020; World Health Organization, 2020; Zhou *et al.*, 2020). El 11 de febrero el Comité Internacional de Taxonomía nombra al nuevo coronavirus como SARS-CoV-2 y la OMS como COVID-19 (Enfermedad Infecciosa por Coronavirus 2019) a la enfermedad infecciosa producida por el nuevo coronavirus. Ha demostrado ser fácilmente transmisible entre humanos con una rápida difusión mundial y es por esto que el día 11 de marzo de 2020 se declaró pandemia. Hasta la fecha ha causado millones de

casos, muertes, interrupciones en los servicios médicos y graves consecuencias sociales, políticas y económicas en todo el mundo (Dabanch, 2021).

En cuanto a su origen aún no se sabe con exactitud de donde proviene el nuevo SARS-CoV-2. De todas las teorías que se plantearon, la que más evidencia científica posee es la de un evento zoonótico. Es decir de un origen animal del virus con posibilidad de que haya saltado la barrera de especies, infectando a humanos (Banerjee *et al.* 2020). Esto se planteó debido al lugar donde se evidenciaron los primeros brotes de contagios en humanos, lo cual sucedió en Wuhan, en mercados vivos o húmedos, donde se comercializa todo tipo de animales vivos y muertos para consumirlos (Banerjee *et al.* 2020). Por otro lado, respecto a esto, es importante tener en cuenta que el origen de los otros coronavirus que infectan humanos es animal, en todos los casos fueron eventos zoonóticos. Apoyando a esta teoría, cuando aislaron y secuenciaron el genoma del virus, al compararlo con otras secuencias de CoV, encontraron dos coronavirus relacionados con el SARS de murciélago con los que presenta una alta identidad de secuencia a nivel de genoma completo (Zhou *et al.* 2020). Esto puede ser un indicio de que el reservorio original más probable de SARS CoV-2 sea el murciélago, sin embargo se desconoce la especie animal a través de la cual sucedió la transmisión zoonótica (Marín, 2020). Otros estudios independientes encontraron SARS de murciélago en Pangolines, con una menor identidad de secuencia a nivel de genoma completo, pero grandes similitudes con SARS-CoV- 2 en regiones cruciales para la interacciones con el receptor celular humano, lo que puede indicar al Pangolín como especie intermediaria (Banerjee *et al.* 2020; Lam *et al.* 2020, Marín, 2020). A pesar de estas similitudes encontradas, lo que se sabe hasta el momento son solo especulaciones y posibles orígenes, es necesario contar con más evidencia científica certera para poder realizar alguna afirmación al respecto. Nuevamente, despierta el interés de los científicos y mantiene en alerta los sistemas de vigilancia del síndrome respiratorio en el mundo, esta capacidad para la transmisión animal-humano y humano-animal. El potencial antrozo-zoonótico es bidireccional en la transmisión del SARS-CoV-2 y tiene implicancias en la reintroducción en poblaciones humanas (Banerjee *et al.* 2021). En consonancia, con otro agente viral de Influenza A, la cepa pdm porcina H1N1 de 2009 ya tuvo este comportamiento bidireccional de transmisión en algunos casos (Gutiérrez-Salinas *et al.* 2016).

1.3 Taxonomía

Los Coronavirus pertenecen a la Familia Coronaviridae, Subfamilia Coronavirinae del Orden Nidovirales, los cuales fueron clasificados en cuatro géneros con la primeras cuatro letras del alfabeto griego: Alfacoronavirus (Alfa-CoV), Betacoronavirus (Beta-CoV), Deltacoronavirus (Delta-CoV), y Gammacoronavirus (Gamma-CoV). (Cui *et al.* 2019).

Los Alfa-CoV y Beta-CoV infectan solo mamíferos, mientras que los Gamma-CoV y Delta-CoV infectan a las aves, pero algunos de ellos también pueden infectar mamíferos. Alfacoronavirus y Betacoronavirus generalmente causan enfermedades respiratorias en humanos y gastroenteritis en animales. (Cui *et al.* 2019).

Con la aparición del SARS-CoV-2, se conocen siete coronavirus que infectan humanos, todos distribuidos en los géneros Alfa-CoV y Beta-CoV. Por un lado, encontramos los cuatro HCoV de mayor circulación en la población humana que son HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63, y HCoV-HKU1, asociados a síntomas respiratorios leves pudiendo causar, en niños y ancianos, infecciones graves (Cui *et al.* 2019). Dentro del género Alfa-CoV encontramos a HCoV-229E, HCoV-NL63, mientras que HCoV-OC43 y HCoV-HKU1 pertenecen al género Beta-CoV. Por otro lado, pertenecientes a este último género, encontramos a SARS-CoV, MERS-CoV, y, el nuevo SARS-CoV-2, asociados a enfermedades respiratorias de mayor gravedad (Andersen *et al.* 2020; Cámara *et al.* 2018; Corman *et al.* 2018; Huang *et al.* 2020; Lauxmann *et al.* 2020; Pérez *et al.* 2019; Song *et al.* 2019).

La mayoría de los virus que emergen lo hacen desde su nicho enzoótico ó epizoótico. En el espectro de virus potencialmente zoonóticos y antropozoonótico, los CoV son un excelente ejemplo, de gran importancia debido a su fácil transmisión por la ruta respiratoria/fecal-oral; esto resulta en una gran capacidad para causar epidemias y una alta probabilidad que se produzca una transmisión al hospedero (Moreira-Soto, 2013). Todos los coronavirus humanos, como se ha descrito, tienen en un principio un origen zoonótico, para SARS-CoV (1 y 2), MERS-CoV, HCoV-NL63 y HCoV-229E el reservorio natural son los murciélagos y para HCoV-OC43 y HKU1 probablemente el reservorio está en los roedores. (Cui *et al.* 2019, Dabanch, 2020).

1.4 Estructura de SARS-CoV 2

El SARS-CoV-2 es un virus envuelto, de forma esférica, con un diámetro de 120 nm (Bravo *et al.* 2020) (Fig.2). La envoltura consiste en una bicapa lipídica derivada del retículo endoplásmico rugoso intracelular y de las membranas de Golgi de las células infectadas (Solis, 2020). El genoma de SARS-CoV-2 consiste en ARN monocatenario, no segmentado, de polaridad positiva. Tiene un tamaño aproximado de 29,9 kb (Wang *et al.* 2020). Dentro del extremo 3' encontramos los genes que codifican para cinco proteínas estructurales: Glicoproteína S (espiga), Proteína E (envoltura), Proteína M (membrana), Proteína N (nucleocápside), Hemaglutinina-esterasa (HE) (Arandia *et al.* 2020; Bravo *et al.* 2020; Hasöksüz *et al.* 2020; Jin *et al.* 2020).

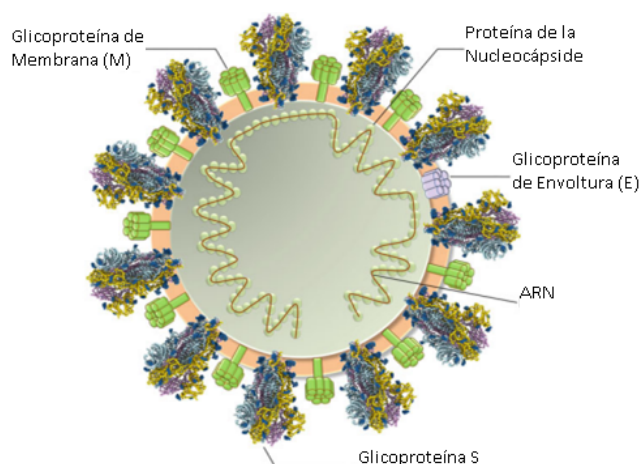


Fig.2. Estructura de SARS CoV-2. El SARS-CoV 2 presenta la glicoproteína S de superficie, que media en la interacción con el receptor celular, además de la glicoproteína M y E que se encuentran en la bicapa lipídica que encapsula la nucleocápside helicoidal que comprende el ARN viral asociado con la proteína N. Recuperado de Shailendra k. Saxena et al. 2020

En la envoltura encontramos la glicoproteína S que forma trímeros llamados espículas, cada monómero tiene dos subunidades, S1, que actúa como ligando uniéndose a los receptores de la célula diana, y S2, que interviene en la fusión de la envoltura con la membrana celular (Bravo *et al.* 2020; Hasöksüz *et al.* 2020). Dicha proteína cuando emerge de la envoltura le da un aspecto al virión el cual, al microscopio electrónico, se ve como una “corona” siendo la característica por la que se denominó a la partícula viral Coronavirus (CoV).

Por otro lado encontramos la glicoproteína M, pequeña proteína con tres dominios transmembrana (Arandia *et al.* 2020) que interviene en el ensamblaje y formato de los viriones (Bravo *et al.* 2020; Hasöksüz *et al.* 2020). La glicoproteína E, involucrada también en el ensamblaje de las partículas virales (Bravo *et al.* 2020; Hasöksüz *et al.* 2020). A su vez, en la envoltura observamos la proteína hemaglutinina-esterasa (HE) que se comparte con algunos CoV (Jin *et al.* 2020), se cree que las actividades de ésta mejoran la entrada de células mediadas por la proteína S y la propagación del virus a través de la mucosa (Arandia *et al.* 2020).

En la nucleocápside de forma helicoidal se encuentra, además del genoma, la proteína nucleocápside (N) fosforilada, la cual se compone de dos dominios separados, un dominio N-terminal y un dominio C-terminal, ambos capaces de unirse al ARN in vitro, pero cada dominio utiliza diferentes mecanismos para unirse al ARN (Arandia *et al.* 2020).

Finalmente, en el genoma de los coronavirus (CoV) también encontramos el marco de lectura abierto (ORF) 1a / b en el extremo 5', que codifica para 16 proteínas no estructurales (nsp1 a nsp16)(Arandia *et al.* 2020) (Fig.3).

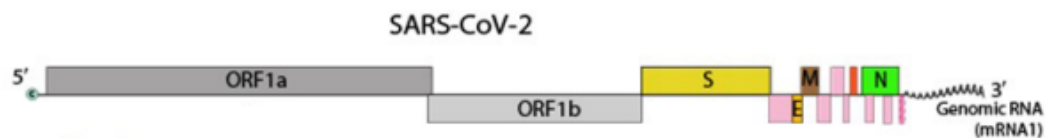


Fig.3. Genoma de SARS CoV 2. El genoma codifica cuatro proteínas estructurales principales, incluida la glicoproteína spike (S), la glicoproteína de membrana (M), la glicoproteína de la nucleocápside (N), la glicoproteína de envoltura (E). Además comprende un marco de lectura abierto ORF que codifica para proteínas no estructurales. Recuperado de Shailendra k. Saxena et al. 2020.

1.5 Replicación de SARS-CoV 2

En cuanto al proceso de replicación de SARS CoV- 2 comienza con la unión del virus al receptor de la célula huésped. Este receptor convertidor de angiotensina ACE 2, el cual se encuentra expresado en células de diferentes órganos, principalmente en los pulmones, los riñones y el intestino que representan los principales objetivos del coronavirus (Arandia *et al.* 2020). La glicoproteína S de SARS CoV 2 es la que reconoce y se une al receptor ACE2 utilizando dos subunidades, la subunidad S1, responsable de

la unión con el receptor de la célula hospedero y la subunidad S2, responsable de la fusión del virus con las membranas celulares (Marín, 2020). Luego de dicha unión, se forma un complejo que es procesado proteolíticamente por la proteasa de serina transmembrana tipo 2 (TMPRSS2), lo que conduce a la escisión de ACE2 y a la activación de la glicoproteína espiga S, finalizando con la entrada del virus a la célula (Marín, 2020).

Luego el ARN viral es liberado al citoplasma de la célula huésped. El ARN genómico se traduce en poliproteínas pp1 y pp2, las cuales se escinden en pequeñas proteínas por acción de proteasas virales. A continuación las polimerasas, mediante un proceso de traducción discontinua, comienzan a sintetizar ARN mensajeros subgenómicos, los cuales codifican proteínas virales (Swatantra *et al.* 2020).

Finalmente, el ensamblaje del virión se da mediante la interacción del ARN viral con el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. Estos viriones luego son liberados de la célula mediante vesículas (Swatantra *et al.* 2020) (Fig.4).

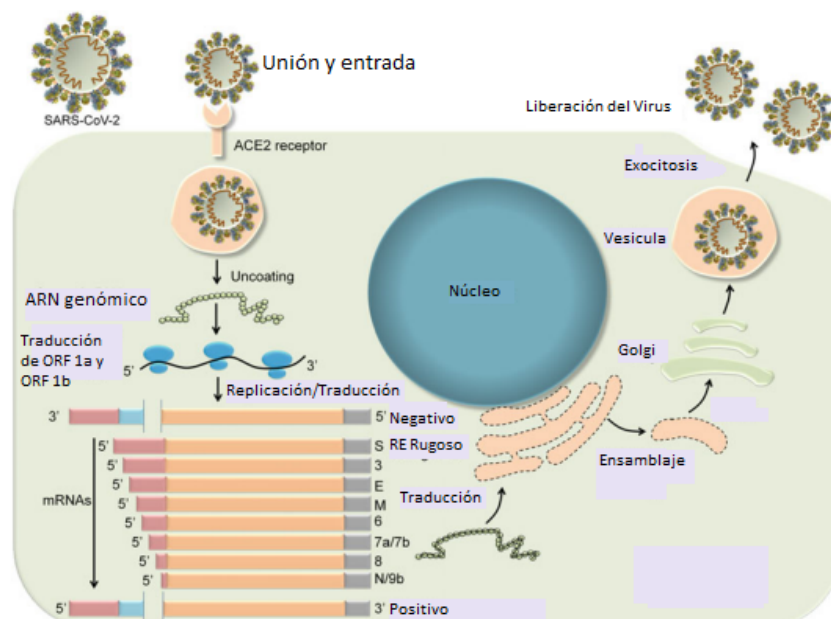


Fig.4. Esquema de Replicación de SARS CoV-2. Entrada del SARS-CoV 2 en la célula blanco, replicación del virión en el citoplasma, ensamblaje de las partículas virales en el retículo endoplásmico (RE) y aparato de Golgi. Finalmente liberación de las mismas por exocitosis. Adaptado de Swatantra et al. 2020.

1.6 Manifestaciones Clínicas

La presentación clínica de los siete coronavirus que infectan humanos sigue dos líneas de progresión distintas. Por un lado el SARS-CoV, el MERS-CoV y el nuevo SARS-CoV 2 se presentan con complicaciones respiratorias graves y, muy frecuentemente con afectaciones multisistémicas, en algunos casos presentando insuficiencia renal, cardíaca, neurológica y/o síntomas entéricos y con casos fatales (Berry *et al.* 2015). Por otro lado, los cuatro coronavirus humanos endémicos cuyos síntomas son leves, principalmente afectando el tracto respiratorio superior. (Berry *et al.* 2015)

La presentación clínica de estos últimos cuatro coronavirus humanos endémicos es muy similar y sintomáticamente indistinguible de las IRAs estacionales y sistemáticas que se dan todos los años. Comúnmente se presenta con rinorrea, dolor de garganta, tos y fiebre. Sin embargo también pueden presentarse algunas manifestaciones clínicas en el tracto respiratorio inferior que incluyen bronquiolitis, neumonía, exacerbaciones asmáticas, exacerbaciones agudas de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y crup (Berry *et al.* 2015).

El nuevo SARS-CoV 2 que genera la enfermedad conocida como Covid-19 se caracterizó por presentar inicialmente tos y fiebre que en un 8 a 19% de los pacientes progresan en Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda (SDRA), estando principalmente en riesgo ancianos y pacientes con comorbilidades (Felsenstein *et al.* 2021). Los signos y síntomas generales más frecuentes que presenta el Covid-19 son tos, fiebre, disgeusia y/o anosmia/hiposmia, síntomas gastrointestinales, cansancio, fatiga, dolor muscular, entre otros (Madrigal-Rojas *et al.* 2020). A medida que fueron apareciendo nuevas variantes del virus, éstas se fueron asociando más a determinados síntomas que eran más comunes para cada una de ellas.

1.7 Diagnóstico etiológico

El diagnóstico clínico de las infecciones respiratorias agudas no permite precisar la etiología, ya que muchos signos y síntomas son similares en las infecciones virales. Aún así existen algunas asociaciones características que ayudan al diagnóstico (Carballal *et al.* 2015). En la década del 60 hasta fines del 80, el diagnóstico viral estaba basado en el

cultivo viral, detección de antígenos por técnicas clásicas y test serológicos, encontrando solamente el agente viral en el 20 al 50% de los casos. Durante la década del 90 la tasa de detección viral aumentó del 75 al 85% por la utilización de técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), (Broor *et al.* 2008).

La Inmunofluorescencia (IF) es una técnica que permite la detección del agente viral en muestras clínicas, basada en la formación del complejo antígeno-anticuerpo con alta especificidad y afinidad, empleando un fluorocromo como detector (Adamo *et al.* 2018). La inmunofluorescencia como método directo es una de las técnicas más utilizada para el diagnóstico rápido diferencial durante el período agudo.(Carballal *et al.* 2015) Esta técnica brinda la visualización, en el aspirado nasofaríngeo (ANF) o hisopado nasofaríngeo (HNF), de unas pocas o muchas células infectadas dando una imagen típica, que permite hacer un diagnóstico con certeza rápidamente (Carballal *et al.* 2015).

La visualización de la interacción antígeno-anticuerpo puede lograrse cuando un anticuerpo se conjuga con una enzima como la peroxidasa, que puede catalizar una reacción que produce color. Ochenta años atrás, fueron Albert Hewett Coons, Hugh J Creech, Norman Jones y Ernst Berliner de la Universidad de Harvard junto a Coons, quienes publicaron la primera aplicación práctica de esta nueva técnica inmunológica (Ministerio de Salud Bogotá, 1991)(Ortiz Hidalgo, 2018). En 1980 Milstein, Kohler y Jerne, la historia de la IHQ los llevó al Premio Nobel con los anticuerpos monoclonales y desarrollaron más esta magnífica técnica que se utiliza diariamente en laboratorios en todo el mundo. Hoy en día la detección masiva de los diferentes agentes virales en hospitales se realiza mediante métodos directos, principalmente métodos rápidos.

En los últimos años ha avanzado la utilización de los métodos directos moleculares para la detección de ácidos nucleicos virales, como la PCR, ya que son altamente sensibles y específicos. Por ello estamos ante una nueva era en la epidemiología de los virus respiratorios detectados por medio del empleo de la tecnología molecular con amplificación (Carballal *et al.* 2015). Sin embargo, consumen mayor costo financiero para el diagnóstico masivo. (Carballal *et al.* 2015) Por esto, las técnicas clásicas siguen siendo de importancia, acompañando especialmente en el tamizaje inicial ante una alerta de brote.

Actualmente en la práctica clínica, los métodos de detección se han actualizado rápidamente debido a la profundización de la comprensión de COVID-19. Las pruebas de

detección de ácidos nucleicos, tomografía computarizada de tórax, confirmación de la historia epidemiológica y las manifestaciones clínicas son bases importantes para el diagnóstico de la neumonía por coronavirus (Li *et al.* 2020; Loeffelholz *et al.* 2020). Los métodos diagnósticos para SARS-CoV 2 que se destacan son RT-PCR real time, test de anticuerpos y test de antígenos (Calvache Meza *et al.* 2020).

Las pruebas serológicas o test de anticuerpos analizan el componente sérico de la sangre que incluye los anticuerpos contra componentes específicos de los antígenos, que son reconocidos por el sistema inmune como extraños, dirigidos por la respuesta inmune del individuo. Como método diagnóstico tiene la ventaja de ser rápida, fácil de realizar, sin requerimientos complejos, sin embargo dan una respuesta de detección tardía, determina en general que la infección es pasada o está al final de la infección activa (Calvache Meza *et al.* 2020).

La prueba de ácido nucleico (PCR) es la técnica Gold estándar y método más empleado, sin embargo tiene requerimientos de infraestructura y equipamiento propios, es susceptible de contaminarse, tiene alto costo (Reina *et al.* 2020) y se ha observado escasez en la provisión de insumos debido a su alta demanda en el inicio de esta pandemia. En comparación, el método de detección de antígeno en secreciones respiratorias tiene las ventajas de la rapidez, practicidad/sencillez, accesibilidad, aplicabilidad y sustentabilidad. En el caso de SARS-CoV-2, se ha demostrado que el virus es detectable en secreciones respiratorias hasta un día antes de la aparición de síntomas clínicos (Diao *et al.* 2020). Los antígenos virales son marcadores específicos del virus y preceden a la aparición de anticuerpos en las personas infectadas (To *et al.* 2020). Por esto es que, la detección de antígeno viral permitiría el tamizaje inicial con un diagnóstico temprano, además de rápido y accesible a realizarse ante la urgencia de un brote.

Los test rápidos de antígenos comerciales utilizados en la actualidad tienen la ventaja de otorgar una respuesta rápida, sin embargo son costosos en la manufactura del dispositivo sintético para los presupuestos austeros de nuestras políticas públicas sanitarias y difícilmente degradables o reciclables que perjudican nuestro ambiente y contradice los ODS. Los ensayos rápidos de antígeno por inmunofluorescencia directa (IFD) proporcionarán la posibilidad de testeo diagnóstico de SARS-CoV-2 en la población, con la

ventaja de obtener resultados rápidos, de bajo costo y sustentables. Si bien la IFD es una técnica menos sensible que la PCR, teniendo en cuenta la experiencia con estos métodos para los virus del panel diagnóstico actual, como Influenza A y B, Virus Respiratorio Sincicial, Parainfluenza 1, 2, 3, Adenovirus y Metapneumovirus, es de gran utilidad en la vigilancia centinela, brindando un tamizaje inicial en el diagnóstico diferencial.

2. PROBLEMA E HIPÓTESIS

Tras la diseminación mundial del SARS CoV-2 y la emergencia sanitaria consiguiente, la creciente demanda de reactivos para diagnóstico de COVID-19 desafía las metas de control de los organismos de salud. Para la infección por SARS-CoV-2, una de las preocupaciones manifiesta fue el diagnóstico temprano, particularmente importante, no sólo para mejorar la supervivencia de los pacientes, sino también para implementar medidas de protección adecuadas y garantizar la seguridad del equipo de salud y de la población.

La masividad de casos sospechosos de COVID-19, la necesidad urgente de tests poblacionales y poder hacer un tamizaje inicial en el momento de la etapa aguda o clínica de la enfermedad del paciente, para realizar el diagnóstico diferencial, hacen imprescindible desarrollar una técnica rápida, económica, ecológica y de fácil implementación en nuestro ámbito.

Teniendo en cuenta por un lado, la problemática clínica y epidemiológica que plantea la pandemia COVID-19 explicitada arriba, y por otro lado, previendo la sucesión de este contexto pandémico hacia la endemidad regional, donde el SARS CoV-2 formaría parte de las IRAs estacionales del panel respiratorio, es que el desarrollo y adaptación de una herramienta de diagnóstico temprano, como método con su técnica, basada en la detección del antígeno por Inmunofluorescencia, será esencial para el tamizaje inicial y de utilidad en la vigilancia centinela dentro del diagnóstico diferencial en las políticas públicas sanitarias.

En ese marco, surgió una gran meta con este trabajo de tesina, la de producir un método diagnóstico de SARS-CoV-2 a partir de la elaboración de improntas con células de muestras respiratorias de pacientes transitando la infección con SARS CoV-2 que produce

la enfermedad Covid 19. Dichas improntas se enfrentarán con los anticuerpos del suero de pacientes convalecientes (recuperados de COVID-19), funcionando estos últimos como reactivo intermediario para el posterior marcaje con el conjugado con fluorocromo.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Desarrollar una herramienta de diagnóstico rápido de SARS-CoV-2 basada en una técnica de detección de antígeno viral por inmunofluorescencia.

3.2 Específicos

- Desarrollar, optimizar y estandarizar improntas celulares a partir de muestras clínicas respiratorias de pacientes con diagnóstico de COVID-19.
- Implementar y adaptar una técnica de inmunofluorescencia directa para la detección del SARS-CoV-2 tanto “in house”, como comercial, para contribuir en las políticas públicas sanitarias.
- Determinar la sensibilidad, especificidad, y valor predictivo positivo y negativo de la IF para detectar SARS-CoV-2 en pacientes con COVID-19.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras clínicas utilizadas son hisopados nasofaríngeos (HNF) y los sueros empleados para el desarrollo de la técnica de IFD, fueron obtenidas ambos de pacientes con diagnóstico confirmado de COVID-19 (resultado positivo para SARS-CoV-2 por biología molecular/PCR), y de pacientes con diagnóstico negativo de COVID-19 (resultado negativo para SARS-CoV-2 por biología molecular/PCR), remitidas por los centros asistenciales colaboradores entre mayo y noviembre de 2020. Los centros de salud fueron el Hospital Regional Arturo Illía de la ciudad de Alta Gracia, el Hospital Señor del Milagro de Salta, la Fundación para el Progreso de la Medicina y el Hospital Italiano de Córdoba, quienes conforman el equipo de trabajo y colaboraron en la obtención y recuperación de las muestras clínicas para este proyecto. Los tres centros de Salud, antes mencionados, tenían la RT-qPCR determinada en el muestreo, pero no se accedió a saber la

carga viral, contamos solamente con que eran Reactivos o No reactivos. En cambio, las improntas realizadas con las muestras del Hospital Señor del Milagro, Salta, contaban con el dato de la carga viral. Se utilizó la técnica RT-qPCR para la cuantificación viral. En todos los casos, se utilizó el protocolo de diagnóstico recomendado por los organismos de referencia, Organización Mundial de la Salud y ANLIS INEI “Dr. Carlos G. Malbrán” (CDC, 2020; Corman *et al.* 2020; Organización Panamericana de la Salud, 2020; US Centers for Disease Control and Prevention, Respiratory Virus Branch and Division of Viral Diseases, 2020).

Los datos clínicos de los pacientes incluidos en el estudio se registraron en una base de datos resguardando la confidencialidad de los mismos mediante la información a los pacientes y la utilización de consentimiento informado.

Cabe destacar que las muestras fueron tratadas de acuerdo a las “pautas generales para el manejo de muestras de secreciones respiratorias de infecciones respiratorias” emitidas por el Ministerio de Salud de la Nación y el Protocolo de abordaje COVID-19, Provincia de Córdoba. Recomendaciones provisorias para el equipo de Salud. Actualizadas 11.03.2020. También se siguieron las Directrices de bioseguridad de laboratorio para el manejo y transporte de muestras asociadas con el nuevo coronavirus 2019 elaboradas por organizaciones internacionales (WHO/PAHO). Al llegar la muestra al laboratorio personal entrenado o laboratorista recibe la misma y la ficha de datos del paciente, con guardapolvo, guantes y barbijos. Luego el laboratorista desinfecta todo con hipoclorito de sodio al 0,1 %, coloca la muestra en la heladera de 4°C temporalmente, y esteriliza bajo luz UVc la ficha durante 15 min. de cada lado. Un segundo integrante ingresa la ficha a un Excel de registro de casos en la oficina.

Las instalaciones e infraestructuras utilizadas están ubicadas dentro del Laboratorio de Virus Influenza y Otros Virus Respiratorios junto a otros espacios de Laboratorios afines que pertenecen al Instituto de Virología “Dr. José María Vanella” Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Los insumos y reactivos utilizados para llevar a cabo el trabajo, como portaobjetos para IF, microscopio de epifluorescencia, anticuerpos primarios (policlonales y monoclonales), anticuerpos secundarios, improntas de cultivo para control, buffers, fueron propios del laboratorio ó cedidos por investigadores colegas de Laboratorios del

INVIV-FCM-UNC/CONICET, Laboratorio de Hemoderivados, UNC, Laboratorio del IIFP de la UNLP/CONICET, Instituto Ferreyra/CONICET y Laboratorio de Inmunología FCQ-UNC/CONICET.

4.1 Improntas celulares

Las muestras clínicas son HNF, a partir de los cuales se elaboraron los homogenatos para obtener las improntas de vidrio como soporte, que fueron fijadas y acondicionadas para las pruebas de inmunofluorescencia.

Como primer paso se llevó a cabo el procesamiento de las muestras lo cual se realizó en un laboratorio con una cabina R2 con estrategias de R3, donde se colocan con antelación todos los materiales necesarios, los insumos, los reactivos, los aparatos in situ y los protocolos de procesamiento de la muestra. Se deja en funcionamiento 15 minutos la luz UV de la cabina. El operador se coloca todo el equipo de protección personal (EPP) bajo la supervisión de un colega para trabajar. Se trabaja de a par de operadores. Previo al trabajo y luego de finalizado el mismo, se descontaminan las superficies de trabajo con una solución de hipoclorito de sodio al 0,1% y posteriormente alcohol etílico al 70%.

Las muestras respiratorias obtenidas por HNF vienen inmersas en PBS o en medio de transporte viral y las células epiteliales son liberadas mediante procedimientos mecánicos. Esta muestra homogeneizada se fraccionó en alícuotas para almacenamiento y pruebas complementarias.

Se toma una de las alícuotas y se agrega 2 ml de PBS, luego se centrifuga durante 5 minutos a 3000 revoluciones por minuto (rpm), y finalmente se descarta el sobrenadante. Este procedimiento constituye un lavado y se repite dos veces. Luego del segundo lavado, el pellet obtenido es resuspendido en 160 ul de PBS (Fig. 5).

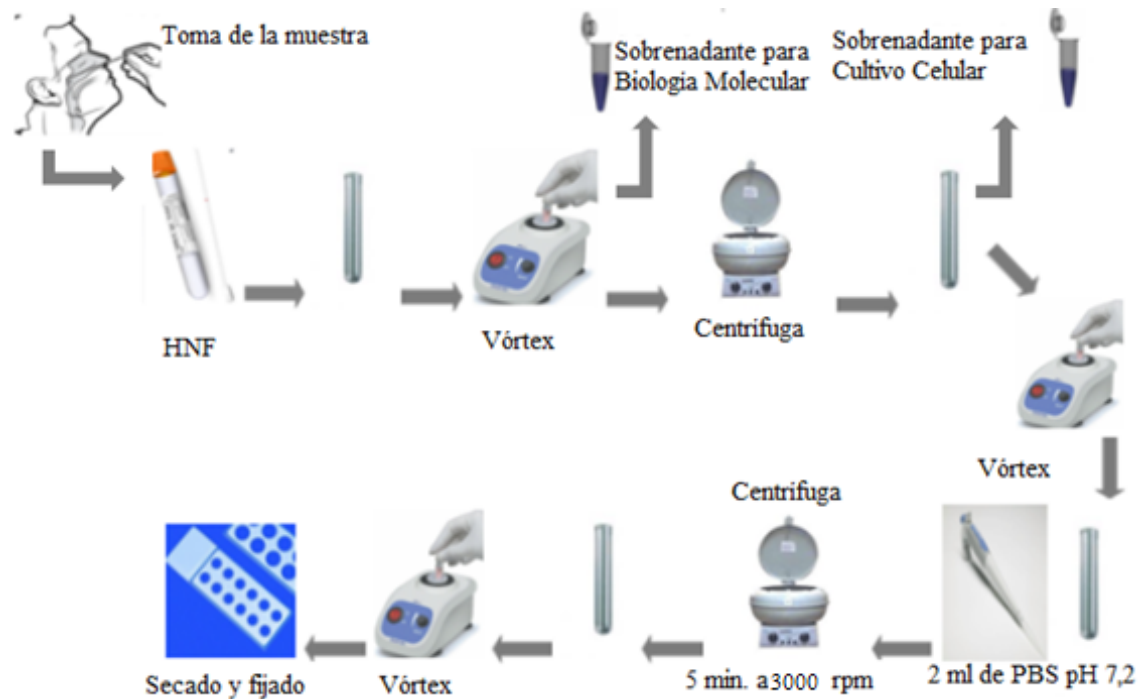


Fig.5. Procesamiento de la muestra. El HNF recibido en el laboratorio se somete a un proceso de lavado previo al sembrado de las células de la muestra en las improntas.

Las células lavadas y concentradas en suspensión se utilizaron para la elaboración de improntas sobre soporte de vidrio. A partir de esta suspensión se hicieron diluciones con solución salina de fosfatos, con las que, en un volumen final de 10 uL/pocillo, se buscó identificar la concentración celular óptima a fin de lograr una imagen representativa en el campo óptico del microscopio de fluorescencia (10 por campo 40x). Para estandarizar el número de células a sembrar en las improntas, se realizó el conteo de las células utilizando contador automático o cámara de Neubauer (ambos basados en la tinción con Trypan blue). En portaobjetos de vidrio para inmunofluorescencia de 8, 10 o 12 pocillos se colocaron 10 uL de suspensión celular con 200-400 células/uL. El soporte de vidrio con las células ya sembradas se dejó secar en estufa a 37 °C o a temperatura ambiente, y luego fueron fijadas en algunos casos utilizando formalina, y en la mayoría se utilizó acetona. Una vez realizadas las improntas, fueron almacenadas a -20°C hasta su uso. Estos procedimientos han sido descritos en trabajos previos y son utilizados en el diagnóstico de virosis respiratorias que realizamos habitualmente en el laboratorio, tanto en el servicio por demanda y para vigilancia epidemiológica que brindamos para nuestros proyectos de investigación (Cámara *et al.* 2016; Cámara, 2018; Ottogalli *et al.* 2015; Ottogalli y Cámara, 2016, 2020; Pérez *et al.* 2019; Raskovsky *et al.* 2016b; Raskovsky *et al.* 2016a, 2017; Rodríguez *et al.* 2016; Rodríguez *et al.* 2017, 2018).

Por otro lado nos enviaron 50 improntas positivas realizadas a partir de HNF RT-PCR positivos de Salta listas para ser almacenadas a -20°C hasta su uso. Las mismas se realizaron siguiendo el mismo método que en nuestro Laboratorio.

4.2 Implementación de la Inmunofluorescencia Directa

Una vez realizadas las improntas se procedió a implementar la técnica de Inmunofluorescencia directa (IFD) para la detección del antígeno SARS-CoV 2. El procedimiento general de la técnica consiste en colocar a incubar en la estufa la impronta con el anticuerpo específico conjugado con el fluorocromo .

En este trabajo se utilizaron anticuerpos intermediarios, entre el antígeno blanco y el conjugado, también llamados primarios, que están dirigidos contra el antígeno de interés. Y anticuerpos conjugados o secundarios, marcados con un fluorocromo, dirigidos contra el anticuerpo primario. Primero se incuba la impronta con el anticuerpo primario, transcurrido el tiempo de incubación, se elimina aquello que no se unió a la impronta realizando lavados con solución Buffer. Luego se procede a incubar con el anticuerpo secundario, y se realiza el mismo procedimiento de lavado. Una vez realizado esto se procede a montar la impronta, para lo cual, una vez seca la misma, se le coloca medio de montaje para fluorescencia y cubreobjetos. Finalmente se observa en un microscopio de fluorescencia (Fig. 6) (Adamo *et al.* 2018).

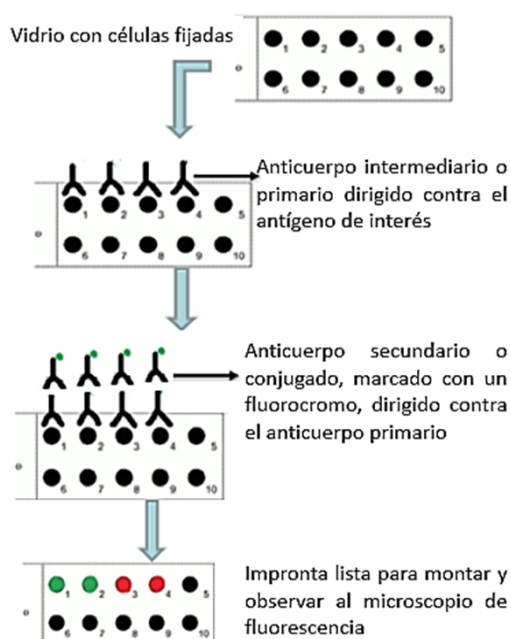


Fig.6. Inmunofluorescencia Directa. Procedimiento general de realización de la IFD utilizando anticuerpos primarios y anticuerpos secundarios marcados con un fluorocromo.

A partir del procedimiento general de la técnica se procedió a la optimización/estandarización de la misma con diferentes anticuerpos primarios, siguiendo para ello el procedimiento habitual (bloqueo, lavados, diluciones de anticuerpos, tiempo y temperatura de incubación como variables iniciales de ajuste).

Los anticuerpos primarios fueron policlonales como sueros de pacientes convalecientes y gammaglobulinas purificadas de pacientes infectados cedida por el Laboratorio de Hemoderivados, y monoclonales cedidos por el Laboratorio del IIFP de la UNLP. Los conjugados fueron anticuerpos policlonales de cabra y de ratón contra IgG de origen humano marcados con FITC (Santa Cruz, OXOID u otros). Y de cabra contra IgG de ratón marcado con FITC (Santa Cruz, OXOID u otros).

4.2.1 Bloqueo

Se probó bloquear la impronta y los anticuerpos, con el objetivo de disminuir la fluorescencia inespecífica que pudiera existir debido a que se utilizan tanto células de muestras silvestres como anticuerpos primarios policlonales silvestres. El bloqueo de los anticuerpos no dió resultado por lo que se continuó con el bloqueo de la impronta. Este bloqueo se realizó con Albúmina preparada en diferentes porcentajes: 5%, 2%, 1% y 0,5%. También se probó bloquear con Albúmina al 1% y al 0,5% + TWEEN 20 al 0,05% .

El procedimiento para bloquear la impronta fue el siguiente: previo a sembrar los anticuerpos primarios se colocó 10ul por well de Albúmina o Albúmina + TWEEN 20 y se dejó en cámara húmeda durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se realizaron lavados de 2 minutos con PBS y agua destilada, los mismos se realizaron en cubetas donde se sumergían las improntas durante dicho tiempo. Se probaron 3 y 2 lavados con PBS, y 1 lavado con agua destilada. Finalmente se deja secar la impronta a temperatura ambiente y ,una vez seca, se procede a realizar la inmunofluorescencia propiamente dicha.

4.2.2 Anticuerpos Primarios Policlonales

En esta instancia se utilizaron como anticuerpos primarios sueros de pacientes convalecientes recuperados, pacientes con infección pasada por SARS-CoV-2, es decir confirmada y ya negativizados, llamados sueros post-infección (dos resultados consecutivos de RT-qPCR negativos). Éstas muestras humanas de Centros de Salud, fueron sometidas a un tratamiento térmico (56°C por 1 h) para su inactivación, clarificadas y luego fueron convenientemente diluidas o no, para su posterior uso en los ensayos de IFD. Además se utilizaron como controles positivos dos sueros de pacientes con títulos de anticuerpos conocidos. Uno de ellos era de paciente post-vacunal (Suero post-vacunal) con título 1/6400 determinado por test CovidAR, y 5498 Unidades Arbitrarias (UA) por test Architect-ABBOTT. El otro fue de un paciente, que cursó la enfermedad natural, (Suero post-infección con títulos) con título 1/800 determinado por test CovidAR. (Tabla 1) Los conjugados utilizados fueron anticuerpos policlonales de cabra y de ratón contra IgG de origen humano marcado con FITC (OXOID) , ambos se probaron en la dilución 1/100.

Se colocó 10ul/ well de los diferentes anticuerpos intermediarios seleccionados para trabajar en la impronta. Dichos anticuerpos, previamente descongelados, se diluyeron con PBS pH 7,2. En una primera prueba, en el caso de los sueros post-infección se probó sin diluir y las diluciones 1/10, 1/20, 1/50, 1/100, 1/200. De los controles positivos (suero post-vacunal y suero post-infección con título de anticuerpos) se probaron las diluciones 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, y también sin diluir. Una vez sembrada la impronta se la llevó a incubar en cámara húmeda durante 30 minutos en estufa a 37°C. Pasado el tiempo se le realizaron a la impronta dos lavados de 15 segundos con PBS+TWEEN 20. Luego se colocó 10ul/well del anticuerpo secundario, preparado en una dilución 1/100 en PBS pH 7,2 con Azul de Evans, para aumentar el contraste entre células infectadas y no infectadas, disminuyendo la señal de fondo. Nuevamente se llevó a estufa a 37°C en cámara húmeda durante 30 min. Transcurrido dicho tiempo, se realizó el mismo procedimiento de lavado descripto. Finalmente, se dejó secar la impronta a temperatura ambiente, y se procedió a montarla, con medio de montaje para fluorescencia y cubreobjetos, para su observación al microscopio de fluorescencia.

Anticuerpos Primarios	Descripción
Suero post-infección	Paciente que cursó la enfermedad
Suero post-vacunal	Paciente postvacunal
Suero post-infección con título de anticuerpos	Paciente que cursó la enfermedad y se le determinó el título de anticuerpos

Tabla 1. Anticuerpos Primarios. Se resume la descripción de cada suero utilizado en esta instancia.

4.2.3 Gammaglobulina

En esta segunda instancia se utilizó como anticuerpo primario una gammaglobulina, de administración intramuscular, que presenta un espectro de anticuerpos muy variado. Es un reflejo del perfil serológico de nuestra población, por lo que tiene indicación para diversas patologías, tanto de origen inmune como de origen microbiológico. Esta gammaglobulina fue brindada por el Laboratorio de Hemoderivados de la UNC. Este producto está concentrado, inactivado viralmente y con filtros esterilizantes; son productos ultrapuros, sin micropartículas. Fue sometido a un proceso de pasteurizado a 60°C durante 10 horas y una filtración posterior a 0.22 μm . lo que lo hace un intermediario más limpio que los sueros silvestres de pacientes. Tiene un 14 ± 4 g % de proteínas y un título de anticuerpos por el método de ELISA CovidAR empleando el First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human) NIBSC code: 20/136 .Valor de Potencia: 2820 UI/ml (2670 - 2978 UI/ml). También posee un título de anticuerpos neutralizantes robusto de 1/1.280 para SARS-CoV 2.

El procedimiento que se siguió tanto del bloqueo como de la inmunofluorescencia fue el mismo ya descrito. La gammaglobulina se probó sin diluir, y las diluciones 1/ 2, 1/ 5, 1/100, 1/200, y 1/1000. Los conjugados utilizados fueron los mencionados anteriormente, ambos se utilizaron en la dilución 1/100.

4.2.4 Anticuerpos Monoclonales

Finalmente se utilizaron como anticuerpos primarios, monoclonales específicos contra la proteína N (Anti- N) y contra la proteína S (Anti-RBD). Es importante aclarar que éstos Mabs no son comerciales, y fueron obtenidos en ratón. Los monoclonales fueron cedidos por investigadores (Dr. Martin Rumbo y Dr. Guillermo Docena) del Laboratorio del IIFP de la UNLP.

Se siguieron los mismos procedimientos descriptos, bloqueando primero y luego realizando la inmunofluorescencia propiamente dicha. Modificando únicamente el tiempo de incubación de la impronta en la estufa a 37°C, el cual fue de 45 minutos en este caso.

Las concentraciones en las que se probaron en nuestras improntas, fueron las indicadas por los investigadores que ya los habían utilizados en otros inmunoensayos. Las diluciones de los monoclonales puestas a prueba fueron 1/100 y 1/30 para Anti-N, 1/15 y 1/ 5 para Anti-RBD. Las mismas se realizaron con PBS pH 7,4.

El conjugado utilizado fue un anticuerpo anti-ratón hecho en cabra conjugado con FITC (Santa Cruz), por indicación de los fabricantes de los Mabs. Se probaron las diluciones 1/100, 1/80, y 1/50 realizadas con PBS pH 7,2 con Azul de Evans.

4.2.5 Controles

Se realizaron en cada caso controles negativos utilizando como anticuerpo primario un suero de paciente que no cursó la enfermedad determinado por test Architect-ABBOTT. El mismo se utilizó siempre sin diluir.

Además, se realizaron controles de los anticuerpos primarios utilizados, en improntas obtenidas a partir de cultivo celular. Dichas improntas fueron cedidas por la Prof. Dra. Sandra V. Gallego. Se realizaron con células VERO Clon 76 infectadas con SARS CoV-2 y sin infectar, colectadas de la botellita de cultivo a las 24 horas cuando presentaron el efecto citopático (ECP) correspondiente. Fueron despegadas con Tripsina o con un scraper y finalmente, fueron sembradas en el vidrio.

El procedimiento a seguir fue el protocolo general de la Inmunofluorescencia Directa. Los anticuerpos primarios utilizados fueron los mencionados anteriormente, sueros de pacientes, sueros de pacientes con título de anticuerpo conocidos, gammaglobulinas, y anticuerpos monoclonales Anti-N y Anti-RBD.

Los conjugados utilizados fueron un anticuerpo policlonal de cabra contra IgG de origen humano marcados con FITC y un anticuerpo anti-ratón obtenido en cabra marcado con FITC (Santa Cruz, OXOID u otros) según corresponda.

4.3 Imágenes de la Inmunofluorescencia

Se tomaron fotos de las improntas utilizando en la mayoría de las ocasiones la cámara de un teléfono celular, y en algunos casos la cámara del microscopio, por lo que pueden observarse diferentes calidades y definiciones en las fotografías.

Se consideró a una célula positiva como aquella que presenta fluorescencia pericitoplasmática de color verde y un centro rosado/rojizo, producto de la tinción de contraste utilizada. Sin embargo cabe destacar que el centro rosado/rojizo no siempre es visible en las fotografías. Por otro lado se consideró a una célula negativa a aquella que se observa completamente con una coloración rosada/rojiza. Se consideró como positiva a aquella impronta en la que se observaron al menos dos células positivas con el patrón característico.

La morfología de las células del epitelio respiratorio del cual proviene el HNF del paciente muestreado y puestas en la impronta, varían en función de los diferentes tipos de células que existen en este tejido. Las células pueden ser aplanadas grandes superficiales que fácilmente se desprenden, otras en forma de copa llamadas caliciforme secretoras de moco, también hay en forma cúbica ciliadas y otras formas menos diferenciables y pequeñas que son las basales y células madres (Zapata, 2014).

Cabe destacar que las células de una muestra silvestre son irregulares, y diversas como se explicita arriba, en cambio en un cultivo celular infectado las células son regulares y uniformes.

4.4 Análisis estadísticos

Se realizaron análisis descriptivos con los datos clínicos recuperados de las muestras de los pacientes, para conocer aproximadamente el escenario epidemiológico de nuestro muestreo. Se vió el porcentaje de muestras provenientes de la provincia de Córdoba y de Salta, grupos etarios, y los principales síntomas observados. Estos datos ilustran y dan cierto contexto epidemiológico para conocer de donde proviene el muestreo que permite el desarrollo de la técnica de IFD.

Por otro lado, se determinaron los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo para cada uno de los anticuerpos primarios utilizados. Para esto se tomó un total de 165 vidrios, 33 vidrios para cada anticuerpo primario utilizado. Estos valores se determinaron utilizando el programa de análisis estadísticos R-medic (Mangeaud *et al.* 2018). El método patrón de comparación utilizado fue el diagnóstico por RT-PCR de las muestras provisto por los hospitales.

5. RESULTADOS

5.1 Escenario epidemiológico descriptivo de los pacientes que participaron en esta prueba metodológica

Con los datos recuperados de algunos de los pacientes a los que se les realizó el HNF durante el año 2020, se observó del total de 107 muestras que un porcentaje mayor provienen de los hospitales de Córdoba. (Fig. 7).

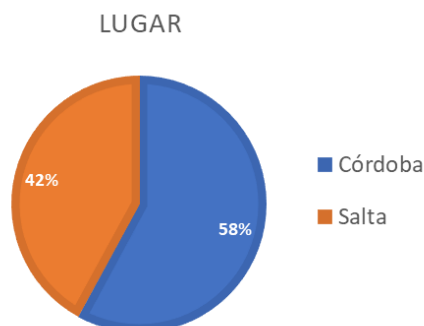


Fig.7. Lugar de procedencia de las muestras. Porcentaje de muestras provenientes de cada provincia.

En cuanto a las edades de los pacientes hisopados durante el año 2020 de los que se pudo recuperar dicho dato, se determinaron cuatro grupos etarios: niños y adolescentes (0-18 años), adultos jóvenes (19-26 años), adultos (27-59 años) y adultos mayores (60 años o más). De los 50 pacientes de los que se supo la edad el grupo más amplio fue el de adultos, y el más pequeño el grupo de los niños y adolescentes . (Fig. 8)

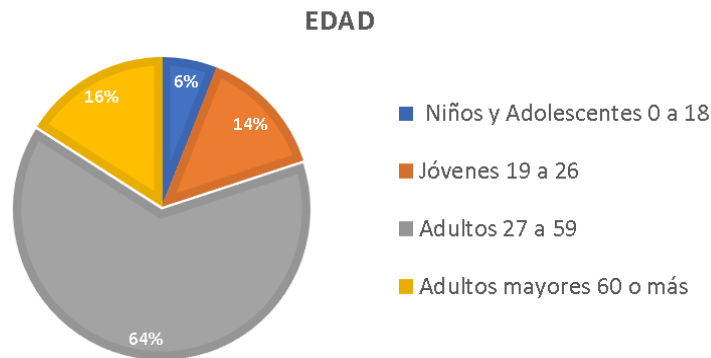


Fig.8. Grupos etarios. Porcentaje de pacientes que pertenecen a los diferentes grupos etarios.

Finalmente se observó que la mayor cantidad de pacientes presentaban síntomas, siendo los más frecuentes fiebre, tos, cefalea, odinofagia, anosmia. También hay pacientes asintomáticos, en Córdoba en mayor porcentaje. En ambas provincias el 100% de los pacientes con síntomas presentó dos o más de ellos (Fig. 9). También se observaron otros síntomas menos frecuentes como diarrea, disgeusia, artralgia, mialgia, entre otros.

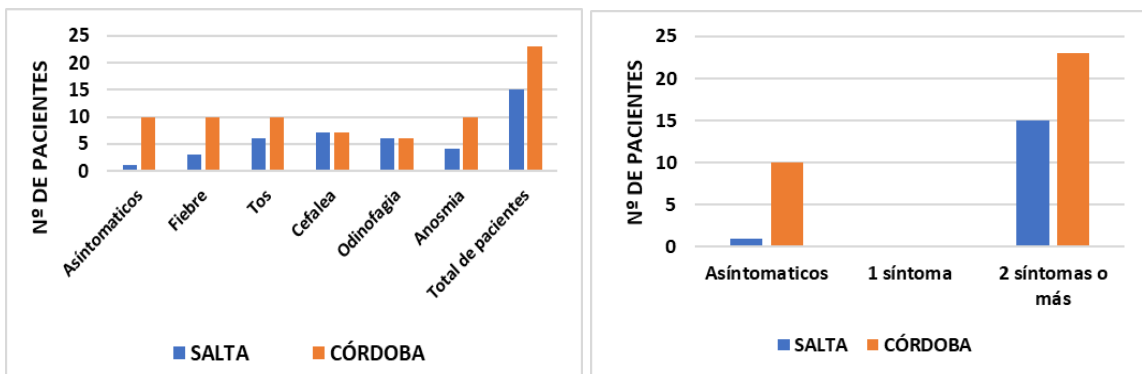


Fig.9. Signos y síntomas. Se muestra a la izquierda la frecuencia de los síntomas más comunes en los pacientes. A la derecha observamos la distribución de los pacientes en casos asintomáticos, con un síntomas, y con dos o más síntomas

5.2 Improntas celulares

La cantidad de improntas realizadas varía de 2 a 5 por muestra. Se obtuvo mejor visibilidad utilizando acetona para fijar.

La visualización de las improntas recibidas de Salta mostraron diferencias respecto de las realizadas en nuestro Laboratorio. Se observaron mayor multiplicidad celular, restos celulares, colgajos y otros residuos.

Se obtuvieron 165 improntas positivas, de las cuales 50 son provenientes de Salta, y 59 improntas negativas realizadas a partir de HNF RT-PCR positivos y negativos respectivamente, provenientes de los hospitales de Córdoba. Sumando un total de 224 improntas (Fig. 10).



Fig.10. Improntas. Vidrios con células realizados a partir de muestras de pacientes.

5.3 Implementación de la Inmunofluorescencia Directa

5.3.1 Anticuerpos Primarios Policlonales

Respecto del bloqueo se observó una mejor imagen utilizando Albúmina al 0,5% + TWEEN 20, y realizando 3 lavados de 2 minutos: dos con PBS y uno con agua destilada.

En cuanto a los dos conjugados puestos a prueba, la mejor imagen se obtuvo con el conjugado anti-IgG humana hecho en cabra diluido 1/100.

Se muestran imágenes de los controles realizados del Suero post-infección (Fig. 11), del Suero post-vacunal (Fig. 13), y del Suero post-infección con título de anticuerpo conocido (Fig. 15). Debajo de sus respectivos controles se muestran algunos resultados

obtenidos con cada anticuerpo primario en improntas realizadas en este trabajo (Figs.12 A-B; 14 A-B; 16 A-B).

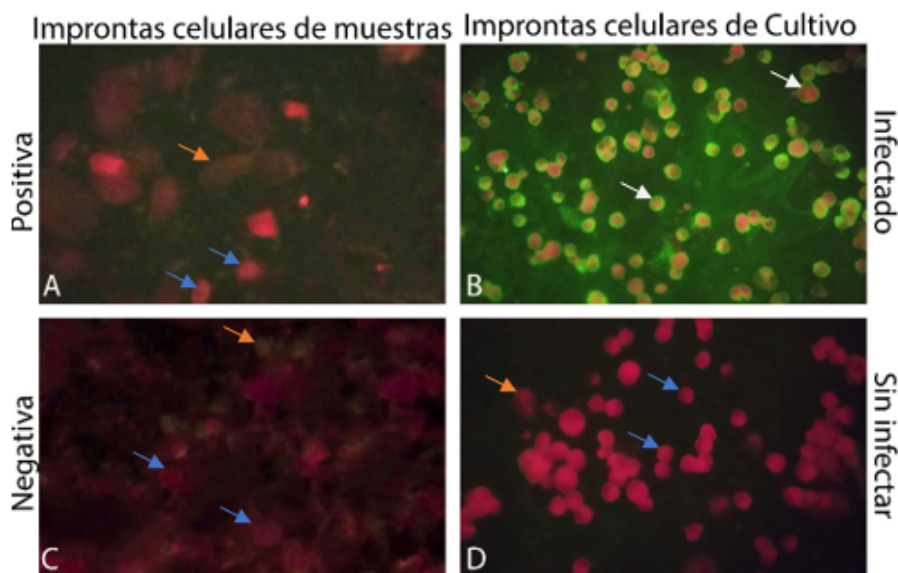


Fig.11. Controles Suero Post-infección. Se señalan con flechas blancas células positivas, con flechas azules células negativas, y con flechas naranjas manchas inespecíficas. Control Negativo: **A:** Impronta celular realizada a partir de una muestra respiratoria de un paciente positivo para SARS-CoV-2 revelada con suero control negativo. Controles del Suero post-infección: **B:** Impronta de cultivo infectado revelada con Suero post-infección. **C:** Impronta celular realizada a partir de una muestra de un paciente negativo para SARS-CoV 2 revelada con Suero post-infección **D:** Impronta de cultivo sin infectar revelada con Suero post-infección.

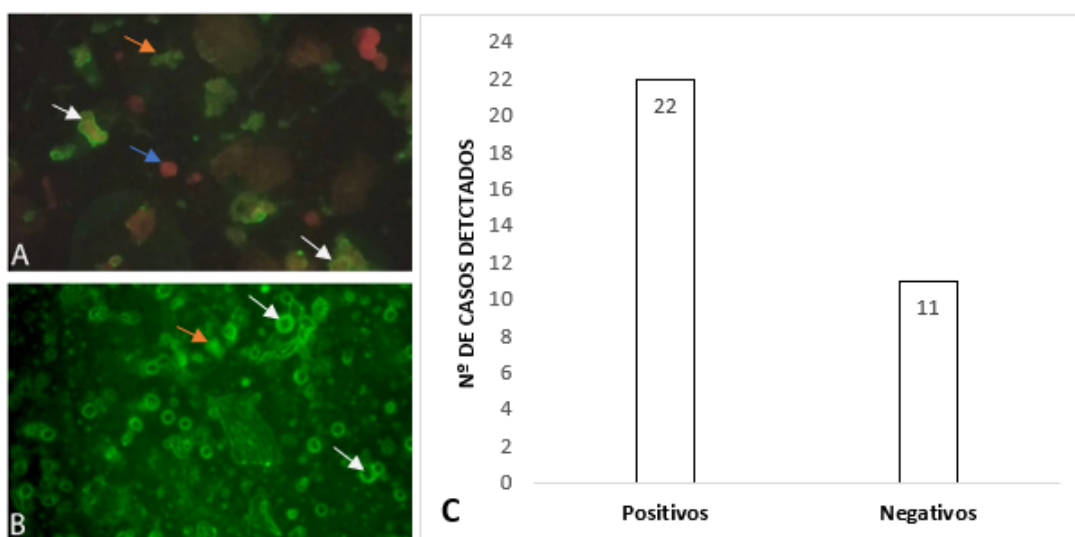


Fig.12. IFD con Suero Post-infección. Se señalan con flechas blancas células positivas, con flechas azules células negativas, y con flechas naranjas manchas inespecíficas. **A y B:** Improntas celulares realizadas a partir de una muestra respiratoria de un paciente positivo para SARS-CoV-2 reveladas con Suero post-infección. **C:** Número de casos positivos y negativos detectados con la IFD con Suero post-infección.

Se observó que del total de 33 improntas realizadas con el Suero post-infección un 67% fueron positivas y un 33% fueron negativas por RT-PCR (Fig. 12 C).

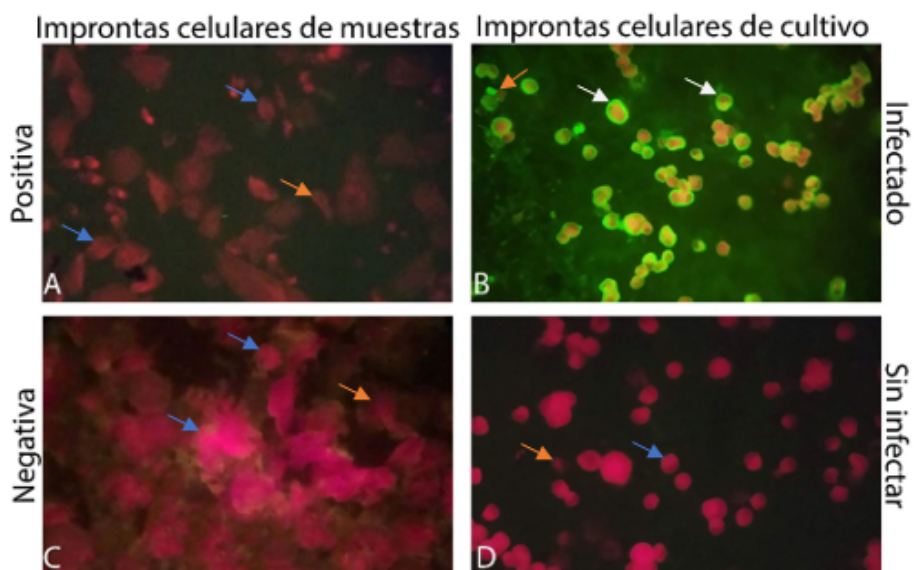


Fig.13 . Controles Suero Post-vacunal. Se señalan con flechas blancas células positivas, con flechas azules células negativas, y con flechas naranjas manchas inespecíficas. Control Negativo: **A:** Impronta celular realizada a partir de una muestra respiratoria de un paciente positivo para SARS-CoV-2 revelada con suero control negativo. Controles del Suero post-vacunal: **B:** Impronta de cultivo infectado revelada con Suero post-vacunal. **C:** Impronta celular realizada a partir de una muestra de un paciente negativo para SARS-CoV 2 revelada con Suero post-vacunal **D:** Impronta de cultivo sin infectar reveladas con Suero post-vacunal.

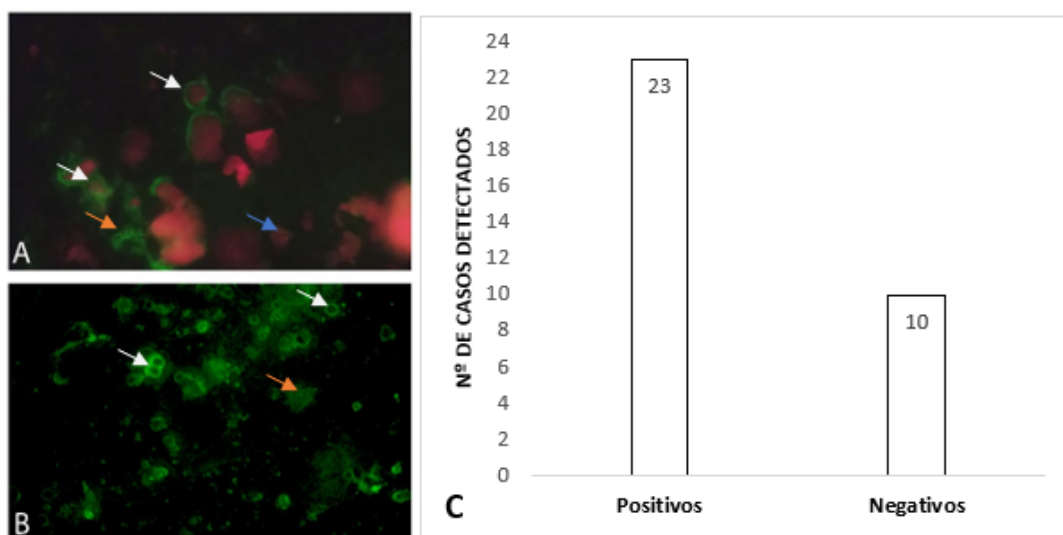


Fig.14 . IFD con Suero Postvacunal. Se señalan con flechas blancas células positivas, con flechas azules células negativas, y con flechas naranjas manchas inespecíficas. **A y B:** Improntas celulares realizadas a partir de una muestra respiratoria de un paciente positivo para SARS-CoV-2 reveladas con Suero post-vacunal. **C:** Número de casos positivos y negativos detectados con la IFD con Suero post-vacunal.

Se observó que del total de 33 improntas realizadas con el Suero post-vacunal un 67% fueron positivas y un 33% fueron negativas por RT-PCR (Fig. 14 C).

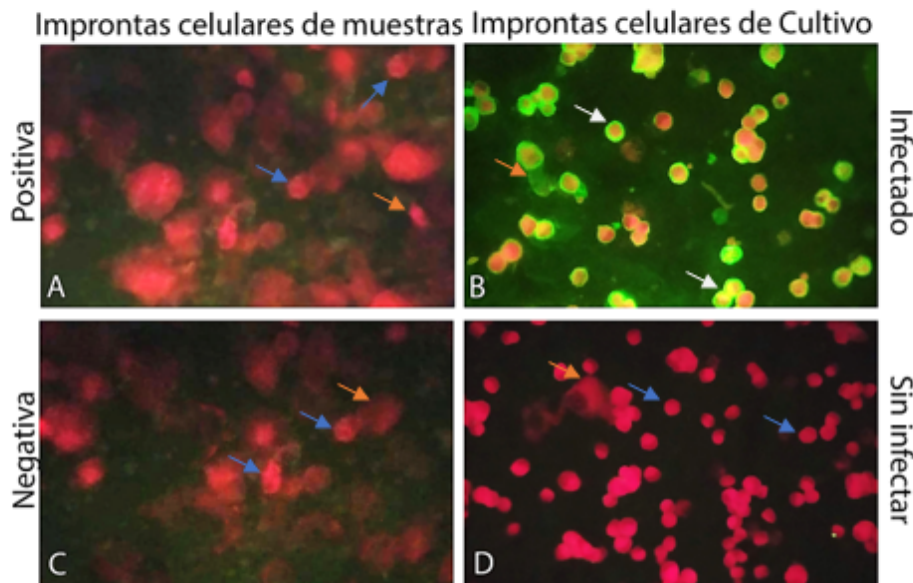


Fig.15 . Controles Suero Post-infección con título de anticuerpos. Se señalan con flechas blancas células positivas, con flechas azules células negativas, y con flechas naranjas manchas inespecíficas. Control Negativo: **A:** Impronta celular realizada a partir de una muestra respiratoria de un paciente positivo para SARS-CoV-2 revelada con suero control negativo. Controles del Suero postinfección con título de anticuerpo: **B:** Impronta de cultivo infectado revelada con Suero post-infección con título. **C:** Impronta celular realizada a partir de una muestra de un paciente negativo para SARS-CoV 2 revelada con Suero post-infección con título **D:** Impronta de cultivo sin infectar reveladas con Suero post-infección con título.

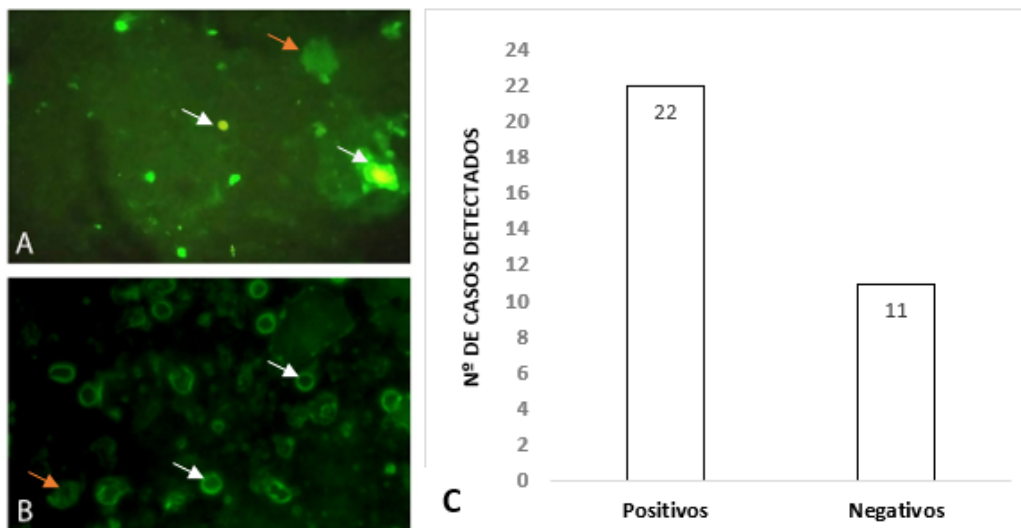


Fig.16. IFD con Suero Post-infección con título de anticuerpos. Se señalan con flechas blancas células positivas, con flechas azules células negativas, y con flechas naranjas manchas inespecíficas. **A y B:** Improntas celulares realizadas a partir de una muestra respiratoria de un paciente positivo para SARS-CoV-2 reveladas con Suero Post-infección con título. **C:** Número de casos positivos y negativos detectados con la IFD con Suero post-infección con título.

Se observó que del total de 33 improntas realizadas con el Suero post-infección con título un 67% fueron positivas y un 33% fueron negativas por RT-PCR (Fig. 16 C).

Aunque estos primeros experimentos mostraron algo de fondo con señal que interfiere se observa que las imágenes obtenidas de las improntas de muestras de pacientes presentan similitud con el control positivo realizado en células de cultivo infectadas. A su vez muestran el patrón característico de fluorescencia celular que produce SARS CoV-2 cuando infecta el epitelio respiratorio de los pacientes, que son: fluorescencia pericitoplasmática completa, en forma de casquete y de otras formas debido a la variedad celular propia de este epitelio, también puntillados, agrupamientos, entre otros. El control negativo dió correctamente.

Finalmente en cuanto a los resultados estadísticos, del total de 33 improntas realizadas con el Suero post-infección un 67% fueron positivas y un 33% fueron negativas por RT-PCR. Comparadas con el total de muestras por RT-PCR la sensibilidad de la IFD fue de 82% , la especificidad de 64% , el VPN fue de 64% , y el VPP fue de 82% (Tabla 2).

IFD	RT-PCR	
	Negativo	Positivo
Ausente	7 (VN)	4 (FN)
Presente	4 (FP)	18 (VP)
Sensibilidad = $VP/(VP + FN) = 0.82$		
Especificidad = $VN/(VN + FP) = 0.64$		

Tabla.2. Comparación de IFD con Suero post infección vs. Rt-PCR para SARS-CoV 2. VN: Verdaderos Negativos, FN: Falsos Negativos, FP: Falsos Positivos, VP: Verdaderos Positivos

De las 33 improntas realizadas con el Suero Post-vacunal un 70% fueron positivas y un 30% fueron negativas por RT-PCR. Comparadas con el total de muestras por RT-PCR la sensibilidad de la IFD fue de 83% , la especificidad de 60% , el VPN fue de 60% , y el VPP fue de 83%. (Tabla. 3)

IFD	RT-PCR		
		Negativo	Positivo
	Ausente	6 (VN)	4 (FN)
Presente	4 (FP)	19 (VP)	
Sensibilidad = $VP/(VP + FN) = 0.83$			
Especificidad = $VN/(VN + FP) = 0.6$			

Tabla.3. Comparación de IFD con Suero post vacunal vs. Rt-PCR para SARS-CoV 2. VN: Verdaderos Negativos, FN: Falsos Negativos, FP: Falsos Positivos, VP: Verdaderos Positivos

De las 33 improntas realizadas con el Suero post-infección con título de anticuerpos un 58% fueron positivas y un 42% fueron negativas por RT-PCR. Comparadas con el total de muestras por RT-PCR la sensibilidad de la IFD fue de 84% , la especificidad de 57% , el VPN fue de 73% , y el VPP fue de 73% . (Tabla. 4)

IFD	RT-PCR		
		Negativo	Positivo
	Ausente	8 (VN)	3 (FN)
Presente	6 (FP)	16 (VP)	
Sensibilidad = $VP/(VP + FN) = 0.84$			
Especificidad = $VN/(VN + FP) = 0.57$			

Tabla.4. Comparación de IFD con Suero post infección con título de anticuerpos vs. Rt-PCR para SARS-CoV 2. VN: Verdaderos Negativos, FN: Falsos Negativos, FP: Falsos Positivos, VP: Verdaderos Positivos

5.3.2 Gammaglobulina

Si bien no se planteó este paso en un principio como parte de nuestros objetivos, lo realizamos ya que aporta un control más a la implementación de la técnica y por agradecimiento a la cortesía del Laboratorio de Hemoderivados- UNC.

En cuanto al bloqueo, no se observaron diferencias en las imágenes entre las improntas bloqueadas y sin bloquear.

De todas las diluciones que se probaron, las mejores imágenes se obtuvieron con la gammaglobulina 1/100, 1/200 y 1/1000. Sin embargo entre dichas diluciones no se observaron grandes diferencias.

Respecto de los dos conjugados puestos a prueba, la mejor imagen se obtuvo con el conjugado anti-IgG humana hecho en cabra diluido 1/100.

Se muestran imágenes de los controles realizados de la gammaglobulina (Figs.17 B-D). Además del control negativo utilizando el suero negativo (Fig. 17 A). Debajo de éstas se muestran algunos resultados obtenidos con la gammaglobulina en improntas realizadas en este trabajo (Fig. 18 A-B).

Por otro lado se observó que de las 33 improntas realizadas con Gammaglobulina el 76% fueron positivas y un 24% fueron negativas (Fig. 18 C).

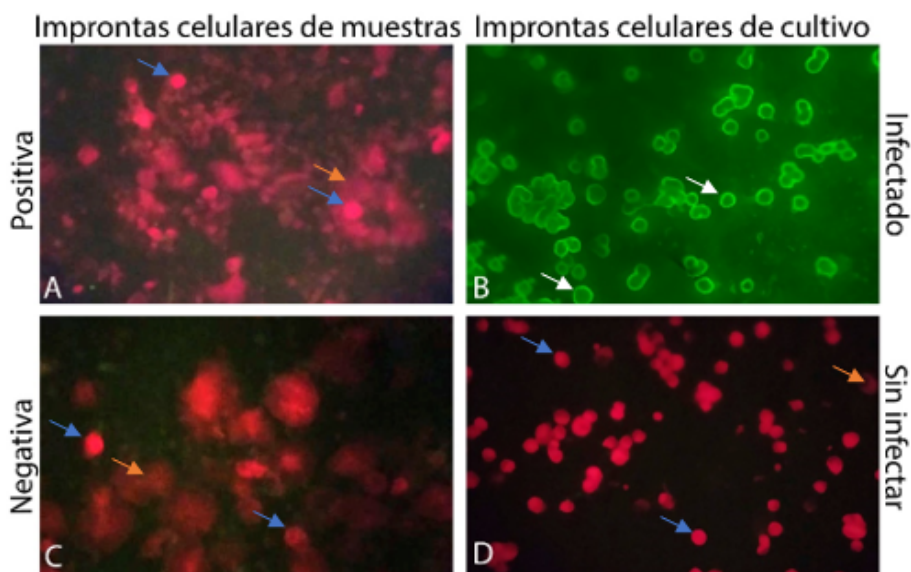


Fig.17. Controles de Gammaglobulina. Se señalan con flechas blancas células positivas, con flechas azules células negativas, y con flechas naranjas manchas inespecíficas. Control negativo: **A:** Impronta celular realizada a partir de una muestra respiratoria de un paciente positivo para SARS-CoV-2 revelada con suero control negativo. Controles de la Gammaglobulina: **B:** Impronta de cultivo infectado revelada con Gammaglobulina. **C:** Impronta celular realizada a partir de una muestra de un paciente negativo para SARS-CoV 2 revelada con Gammaglobulina **D:** Impronta de cultivo sin infectar revelada con Gammaglobulina.

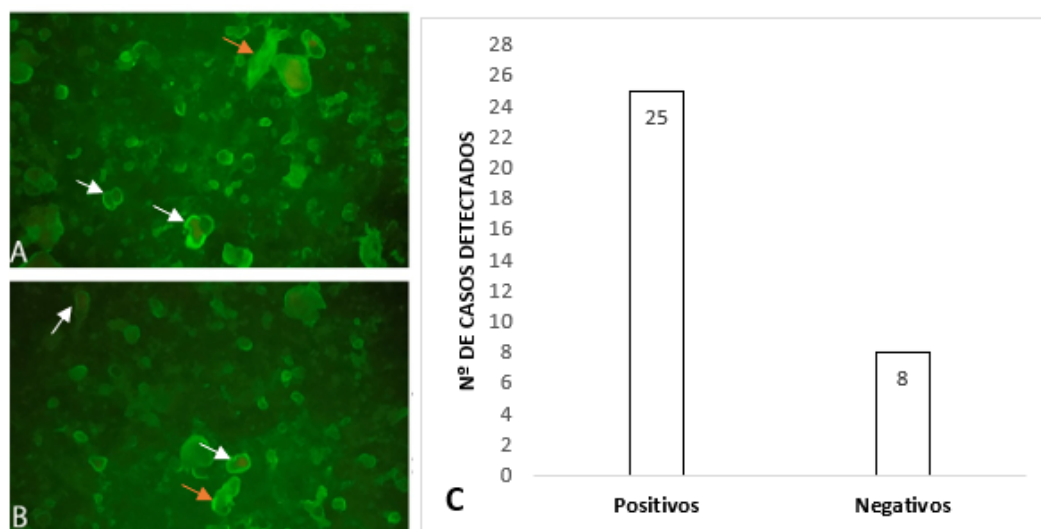


Fig.18 . IFD con Gammaglobulina. Se señalan con flechas blancas células positivas, con flechas azules células negativas, y con flechas naranjas manchas inespecíficas. **A y B:** Improntas celulares realizadas a partir de una muestra respiratoria de un paciente positivo para SARS-CoV-2 reveladas con Gammaglobulina. **C:** Número de casos positivos y negativos detectados con la IFD.

Nuevamente las imágenes obtenidas en las improntas realizadas en este trabajo presentaron similitud con el control positivo a partir de células de cultivo infectadas. Muestran el patrón característico de fluorescencia celular que produce SARS CoV-2 fluorescencia pericitoplasmática completa, puntillado, agrupamientos, fluorescencia en forma de casquete y de otras formas debido a la variedad celular propia de este epitelio, además de otros. También se observó un fondo fluorescente pero igualmente se visualizaba el patrón de fluorescencia característico. Además, todos los controles se dieron correctamente.

En cuanto a los resultados estadísticos, del total de 33 improntas un 82% fueron positivas y un 18% fueron negativas por RT-PCR. Comparadas con el total de muestras por RT-PCR la sensibilidad de la IFD fue de 85%, la especificidad de 67% , el VPN fue de 50% , y el VPP fue de 92%. (Tabla. 5)

IFD	RT-PCR		
		Negativo	Positivo
	Ausente	4 (VN)	4 (FN)
Presente	2 (FP)	23 (VP)	
Sensibilidad = $VP/(VP + FN) = 0.85$			
Especificidad = $VN/(VN + FP) = 0.67$			

Tabla.5. Comparación de IFD con Gammaglobulina vs. Rt-PCR para SARS-CoV 2. VN: Verdaderos Negativos, FN: Falsos Negativos, FP: Falsos Positivos, VP: Verdaderos Positivos

5.3.3 Anticuerpos Monoclonales

El bloqueo, en esta etapa no mostró una mejor imagen. De las diluciones que se probaron de ambos anticuerpos monoclonales los mejores resultados se observaron con Anti-N 1/30 y Anti-RBD 1/ 5. Respecto al conjugado, de las diluciones puestas a prueba, la mejor imagen obtenida fue con el anticuerpo secundario diluido 1/50.

Se muestran imágenes de los controles realizados de los anticuerpos monoclonales Anti-N (Fig.19 B-D) y Anti-RBD (Fig.21 B-D), así como del control realizado con el suero negativo (Fig.19 A; Fig.21 A). A continuación de éstos se muestran resultados obtenidos en improntas realizadas en este trabajo (Fig.20 A-B; Fig.22 A-B).

Se observó que de las 33 improntas realizadas con los anticuerpos monoclonales el 73% fueron positivas y un 27% fueron negativas (Fig.20 C). Cabe destacar que se obtuvo el mismo resultado para ambos.

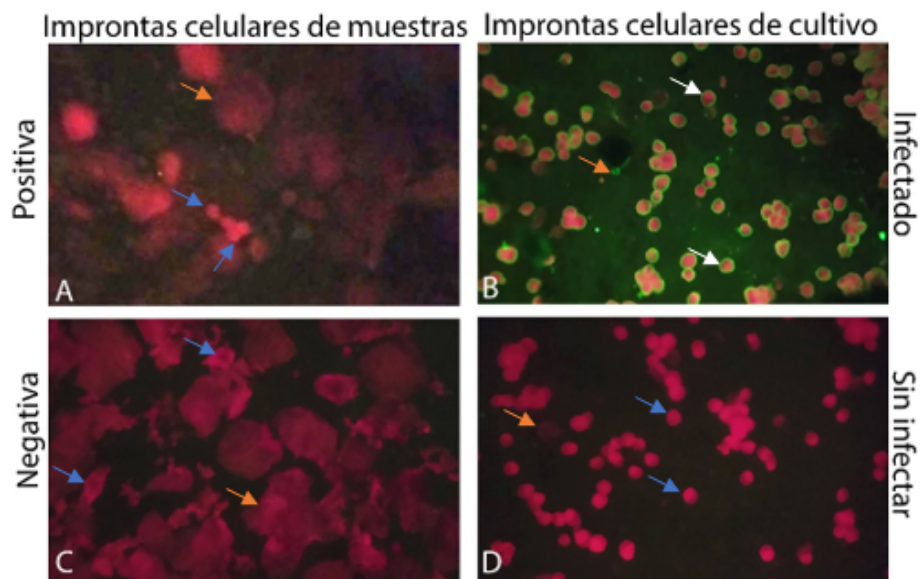


Fig.19. Controles del Monoclonal Anti-N. Se señalan con flechas blancas células positivas, con flechas azules células negativas, y con flechas naranjas manchas inespecíficas. Control negativo: **A:** Impronta celular realizada a partir de una muestra respiratoria de un paciente positivo para SARS-CoV-2 revelada con suero control negativo. Controles de Monoclonal Anti-N: **B:** Impronta de cultivo infectado revelada con Monoclonal Anti-N. **C:** Impronta celular realizada a partir de una muestra de un paciente negativo para SARS-CoV 2 revelada con Monoclonal Anti-N **D:** Impronta de cultivo sin infectar reveladas con Monoclonal Anti-N.

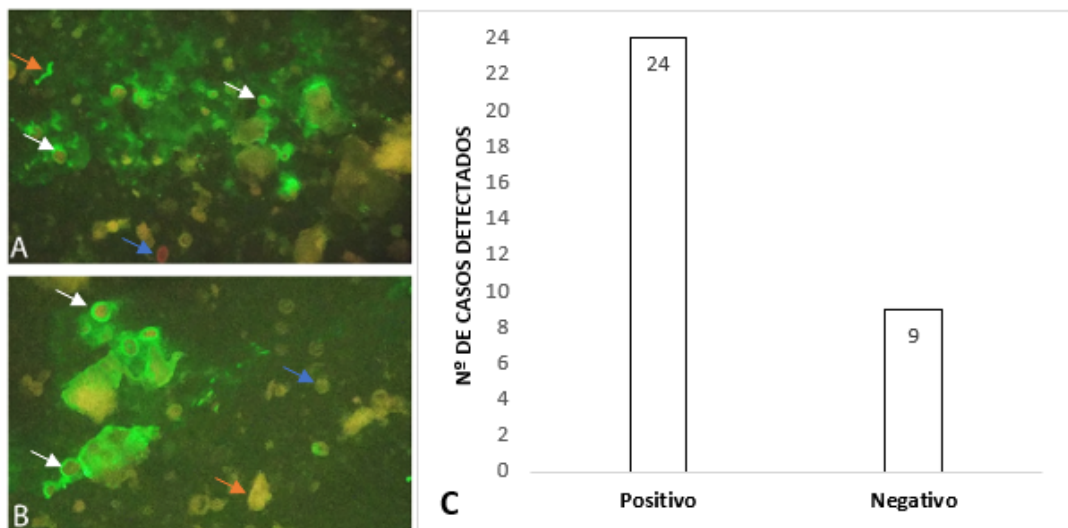


Fig.20. IFD con Monoclonal Anti-N. Se señalan con flechas blancas células positivas, con flechas azules células negativas, y con flechas naranjas manchas inespecíficas. **A y B:** Improntas celulares realizadas a partir de una muestra respiratoria de un paciente positivo para SARS-CoV-2 reveladas con monoclonal Anti-N. **C:** Número de casos positivos y negativos detectados con la IFD.

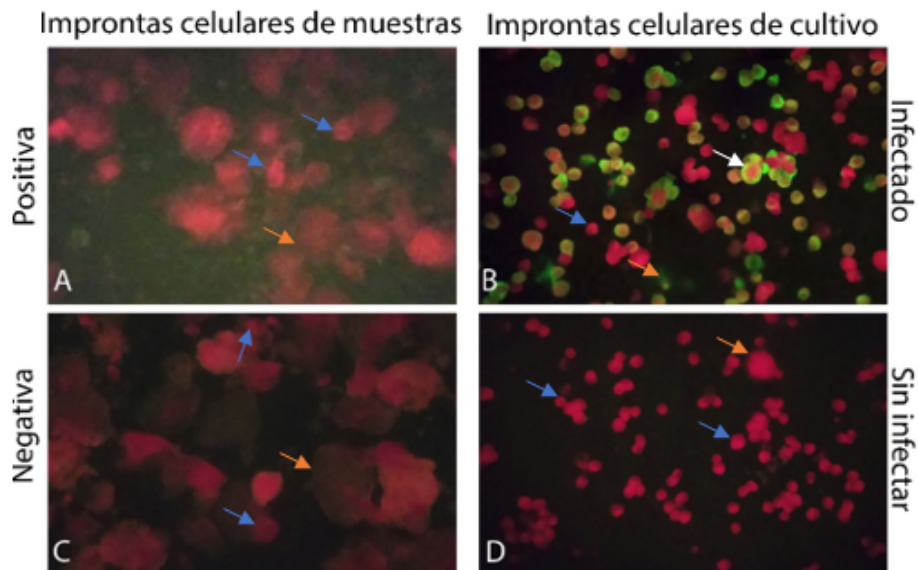


Fig.21. Controles del Monoclonal Anti-RBD. Se señalan con flechas blancas células positivas, con flechas azules células negativas, y con flechas naranjas manchas inespecíficas. Control negativo: **A:** Impronta celular realizada a partir de una muestra respiratoria de un paciente positivo para SARS-CoV-2 revelada con suero control negativo. Controles de Mab Anti-RBD: **B:** Impronta de cultivo infectado revelada con Monoclonal Anti-RBD. **C:** Impronta celular realizada a partir de una muestra de un paciente negativo para SARS-CoV 2 revelada con Monoclonal Anti-RBD. **D:** Impronta de cultivo sin infectar reveladas con Monoclonal Anti-RBD.

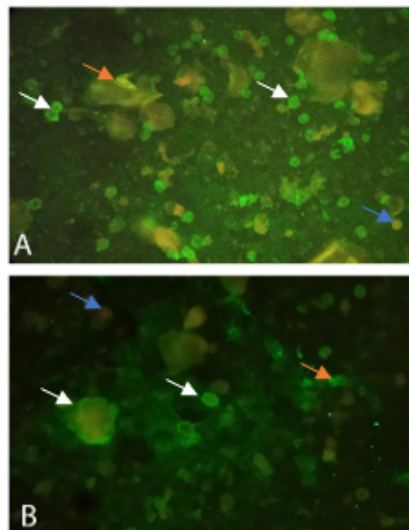


Fig.22. IFD con Monoclonal Anti-RBD. Se señalan con flechas blancas células positivas, con flechas azules células negativas, y con flechas naranjas manchas inespecíficas. **A y B:** Improntas celulares realizadas a partir de una muestra respiratoria de un paciente positivo para SARS-CoV-2 reveladas con monoclonal Anti-RBD.

Se observa que los patrones presentes en las improntas realizadas en este trabajo fueron altamente similares con el control positivo a partir de células de cultivo infectadas. Las imágenes también muestran el patrón característico de fluorescencia celular que

produce SARS CoV-2 cuando infecta el epitelio respiratorio de los pacientes, que son fluorescencia pericitoplasmática completa, agrupamientos, puntillado, fluorescencia en forma de cometa, casquete y de otras formas debido a la variedad celular propia de este epitelio. Los controles dieron correctamente en todos los casos.

Finalmente, en cuanto a los resultados estadísticos, del total de 33 improntas un 73% fueron positivas y un 27% fueron negativas por RT-PCR. Comparadas con el total de muestras por RT-PCR la sensibilidad de la IFD fue de 92% , la especificidad de 78% , el VPN fue de 78% , y el VPP fue de 92% (Tabla. 6)

IFD	RT-PCR	
	Negativo	Positivo
Ausente	7 (VN)	2 (FN)
Presente	2 (FP)	22 (VP)
Sensibilidad = $VP/(VP + FN) = 0.92$		
Especificidad = $VN/(VN + FP) = 0.78$		

Tabla.6. Comparación de IFD con Anticuerpo monoclonal vs. Rt-PCR para SARS-CoV 2.
VN: Verdaderos Negativos, FN: Falsos Negativos, FP: Falsos Positivos, VP: Verdaderos Positivos

6. DISCUSIÓN

La diseminación mundial del SARS-CoV-2 y la gravedad de la emergencia pandémica, planteó en un principio la preocupación del diagnóstico temprano, particularmente importante, no sólo para mejorar la supervivencia de los pacientes, sino también para implementar medidas de protección adecuadas y garantizar la seguridad del equipo de salud y de la población. Por otra parte, la masividad de casos sospechosos de COVID-19 y la necesidad urgente de testeos poblacionales para realizar el diagnóstico diferencial, hicieron imprescindible desarrollar técnicas de diagnóstico rápidas. En relación a esto Martínez *et al.* (2021) sostiene que es importante el uso de las pruebas rápidas o serológicas con el fin de complementar a la PCR, ya que esta última requiere de laboratorios acreditados, personal técnico-profesional idóneo, las cuales son limitaciones que afectan su rápida implementación. Al día de la fecha la RT-PCR es la técnica de

diagnóstico gold standard. La cual se utilizó desde comienzos de la pandemia, y a la que luego se le sumó el test de antígeno rápido.

A principios de este año 2022 se conjeturaba lo que ahora comunica el Ministerio de Salud de la Nación sobre la sucesión de este contexto pandémico hacia la endemidad regional, donde el SARS-CoV-2 formaría parte del panel respiratorio como una IRA estacional. Es acá donde este trabajo cobra relevancia, ya que se implementa una técnica ampliamente conocida que ya se utiliza para el diagnóstico de otros virus respiratorios (Percivalle *et al.* 2005) y ahora con perspectiva futura para la detección de SARS-CoV-2. Con las ventajas de que es una técnica rápida, que puede llevar 1 a 2 horas de trabajo en la campana de flujo laminar, de fácil implementación y que permite hacer el tamizaje inicial ante un síndrome respiratorio agudo, que detectaría el caso agudo o clínico de Covid 19. Además de ser de bajo costo por que se utilizan insumos, reactivos y aparatos básicos que ya existen en la mayoría de los laboratorios y que son comunes a otras técnicas. Dichas características, de la técnica, son descriptas y mencionadas por otros autores como Pianciola *et al.* 2010 y Wilhelm *et al.* 2014 quienes han realizado una comparación de otras técnicas, entre ellas IFD y la RT-PCR para la detección de otros virus respiratorios, evaluando posibles técnicas diagnósticas alternativas a la gold standar, a la que no todos tienen acceso. Sumado a esto, la virtud de ser sostenible y ecológica, aspecto que es muy relevante por el hecho que la mayoría de los elementos empleados se reutilizan, no contaminando con dispositivos de materiales sintéticos y no liberando sustancias tóxicas al ambiente del laboratorio ni al ecosistema.

Revalorizando las técnicas clásicas, artesanales, no sólo estamos aportando una solución al diagnóstico de una infección respiratoria y abaratando costos en el presupuesto de políticas sanitarias, sino que en el contexto ecológico mundial del cuidado del ambiente estamos respetando los objetivos de desarrollo sostenible (ODS) que involucran nuestra investigación. A saber principalmente el ODS 3 referente a la Salud garantizando una vida sana y promoviendo el bienestar para todas las edades, en este punto recobra importancia el diagnóstico diferencial rápido para otorgarle al paciente el tratamiento necesario. Y, por otro lado, el ODS 12 referente a la producción y consumo sostenible, garantizando modalidades de consumo y producción sustentable, se busca lograr hacer más y mejor con menos recursos (NACIONES UNIDAS, Objetivos de Desarrollo Sostenible, 2022).

Cabe destacar que no se encontraron reportes de autores que hayan realizado estudios similares con esta técnica de detección directa y este modelo viral, para poder comparar o no y evaluar nuestros resultados. Confirmando, entonces, que esta investigación sería la primera en este tema en Córdoba, Argentina.

Las improntas celulares se realizaron siguiendo la experiencia del equipo de investigación de 30 años como Centro centinela de referencias de Virus Influenza y Otros Virus Respiratorios a partir de muestras clínicas respiratorias de pacientes con diagnóstico de COVID-19. En esta etapa se cuidó permanentemente la logística que comprendió el ingreso, registro y procesamiento de la muestra. Así como su traslado en las condiciones adecuadas, controlando el triple empaque. Se realizaron múltiples pruebas de control para determinar el número de células óptimo por well/ul, el pH de los buffers, tiempos, temperaturas, entre otros. Siempre cuidando que el modo de operar y los operadores fueran siempre los mismos, teniendo en cuenta todos los cuidados al manipular las muestras clínicas. Aspectos que hacen al buen resultado (Guerrero Gómez C. y Sánchez Carrillo C.; 2003). Sin embargo al momento de realizar la IFD se observaron diferencias al microscopio, algunas improntas presentaban mayor mucosidad que otras. A pesar de la rigurosidad con que se trabajó, muchos vidrios fueron irregulares. Esta mucosidad a la hora de la IFD en algunos casos impedía detectar fácilmente buenos patrones celulares. Aspecto que se puede mejorar al realizar más lavados en el procesamiento de la muestra para eliminar la mucosidad de la muestra, previo a realizar las improntas. Esto nos permitiría lograr mayor definición.

Se observaron en los resultados obtenidos por IFD falsos positivos, es decir aquellas improntas realizadas con muestras de pacientes RT-qPCR negativas, que dieron positivas por la IFD. Esto posiblemente sucede debido a que estamos desarrollando procedimientos artesanales, en donde muestras silvestres (utilizadas para realizar las improntas) se enfrentan a anticuerpos policlonales (de muestras silvestres de sueros de pacientes) que contienen anticuerpos contra un sin fin de antígenos que pueden estar presentes en la muestra con la que se realizó la impronta, es decir cruces inespecíficos para lo que se está buscando. Relacionado a este punto Okba *et al.* (2020) menciona que la mayoría de los humanos tenemos anticuerpos contra los cuatro coronavirus endémicos, lo que aumenta la posibilidad de reactividad cruzada, pudiendo observarse falsos positivos. Esto, si bien hace que sea una técnica de diagnóstico menos certera, los resultados

obtenidos mostraron patrones celulares bien visibles, característicos, y definidos, por lo que consideramos que aun así es aplicable. Se debe tener en cuenta que esta IFD está pensada y es de utilidad en el tamizaje inicial, no busca reemplazar a ninguna otra técnica de diagnóstico, sino ser un complemento alternativo de implementación rápida en la fase inicial de un brote de una infección.

En las imágenes de la IFD el patrón de fluorescencia mayormente observado fue una fluorescencia perocitoplasmática, similar a lo mencionado por Díaz *et al.* (2020) quienes realizan una Inmunofluorescencia indirecta para SARS-CoV-2 observando un patrón periférico definido.

En los experimentos realizados con los anticuerpos monoclonales en algunas improntas se visualizaron más células con fluorescencia en las enfrentadas al monoclonal Anti-N. Experimentalmente fueron pocas imágenes por lo que podemos solamente presumir que puede haber cruce con los coronavirus endémicos como OC43, contra el que algunos pacientes cuentan con inmunidad previa. En relación a esto Okba *et al.* (2020) reporta que los porcentajes de similitud que hay entre la proteína N de SARS-CoV-2 con las de los otros Beta-CoV y Alfa-CoV son mayores que los porcentajes de similitud que hay entre la subunidad 1 de la proteína S de estos virus. A partir de lo cual se puede presumir que hay una mayor probabilidad de que haya cruces serológicos con otros coronavirus en aquellas técnicas diagnósticas que utilicen la proteína N como antígeno, y esta probabilidad disminuiría utilizando la proteína S como antígeno. Es sólo un supuesto, por lo que sería interesante en futuros estudios determinar aquellos pacientes que poseen inmunidad previa, conocer la patogénesis en esos casos y cómo impactaría este cruce inmunológico. Además, como perspectiva futura, sería interesante ampliar la implementación de esta IFD a los Coronavirus endémicos, RSV, entre otros, a partir de esta investigación inicial.

De las improntas de la provincia de Salta se contó con el dato de la carga viral (Ct) de las muestras clínicas con las que se realizaron. Los Ct registrados varían desde 10 a 30.4 como valor más alto. Se observó en muy pocos experimentos, en los que se obtuvo un buen resultado en la IFD, es decir que hubo reacción y se vieron patrones celulares buenos y claros, que coincide con que la muestra, con la que se realizó esta impronta, mostró un valor Ct bajo, lo que indica mayor carga viral. Esta relación es la que se esperaba, mayor

carga viral, es decir menor valor de Ct, mayor detección y mejor visualización por IFD. Sin embargo, no se pueden realizar afirmaciones generales, ya que esto fue visto solo en muy pocos experimentos, no representativos, además de que no se contaba con ese dato para todas las muestras de Córdoba, por lo que no se pudo extrapolar para todo el muestreo. Basándonos en lo observado, es de importancia su consideración y es que sería interesante realizar esta comparación en pruebas de trabajos futuros con conocimiento de este dato para todas las muestras.

Se determinó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la IFD. Nuestra prueba de IFD fue comparada estadísticamente con la técnica de diagnóstico patrón o gold standard más utilizada durante la pandemia que es la RT-PCR. Este desarrollo metodológico, si bien es altamente empleado en el diagnóstico en general y en particular con agentes virales, es nuevo con respecto al modelo viral SARS-CoV 2. Existen trabajos similares a este, sin embargo referidos a la evaluación de una IFD para detectar Influenza, donde se presentan valores de sensibilidad de 57,2% y especificidad 98,5% (Wilhelm *et al.*2014). Con respecto a los resultados obtenidos en este trabajo, son más altos para la sensibilidad y más bajos para la especificidad, sin dejar de tener en cuenta que es otro agente viral. Esto se puede atribuir a que el total de muestras analizadas en este trabajo es acotado y todas fueron tomadas durante el año 2020 en donde los casos de Covid 19 eran muchos más que en la actualidad, por lo que en su mayoría eran muestras positivas. En cuanto a los valores de VPP y VPN obtenidos con anticuerpos policlonales y con la gammaglobulina, ambos son más bajos que los determinados para la IFD para Influenza, siendo estos de VPP: 97% y VPN: 78%. Sin embargo, con los anticuerpos monoclonales se obtuvo un VPP de 92%, VPN de 78%, siendo éstos más similares.

Al analizar las IFD con monoclonales comerciales para Metapneumovirus, informados en otro reporte, observamos que poseen altos valores de sensibilidad y especificidad (Rodríguez *et al.* 2016), lo que es similar a nuestra IFD con Monoclonales. Contemplando que esta última es artesanal y la otra comercial y que estamos ante distintos modelos virales dentro de los virus respiratorios, tanto epidémicos como endémicos.

Consideramos que sería interesante que estos valores de evaluación de la técnica diagnóstica continúen realizándose con más pruebas en futuras investigaciones,

probablemente tomando un número de muestras más grande, abarcando improntas procesadas durante los años 2021-2022-2023 en los cuales la circulación de SARS-CoV-2 fue diferente.

7. CONCLUSIÓN

Esta investigación es la primera realizada en Córdoba, Argentina, constituyéndose en una labor relevante, ya que por un lado, comunicamos y confirmamos el desarrollo e implementación de un método diagnóstico directo de SARS-CoV-2 por IFD totalmente “in house”, aplicable en el tamizaje inicial, como diagnóstico diferencial cuando esta infección forme parte de las IRAs estacionales, transitando desde la pandemia a la endemia regional, y de utilidad en la vigilancia centinela.

Por otro lado, es una técnica sencilla y de rápida aplicación, accesible por que se usaron reactivos e insumos existentes en cualquier laboratorio y ecológica, ya que contempló los objetivos de desarrollo sustentable referidos al cuidado de la salud y la producción sostenible.

Finalmente, es muy importante, porque busca cumplir con la meta de brindar estrategias diagnósticas en la práctica clínica y en la vigilancia epidemiológica, aplicables en las políticas sanitarias, contribuyendo a la toma de decisiones por parte de los organismos de Salud Pública.

8. **BIBLIOGRAFÍA**

1. ADAMO, M.P., AGUILAR, J., CONTIGIANI, M., ISA, M.B. 2018. Método clásico de diagnóstico virológico. En: ADAMO, M.P., CONTIGIANI, M. *Virología: Un enfoque integral de las infecciones virales humanas*. pp. 69-84. Editorial Brujas, Córdoba, Argentina.
2. ANDERSEN, K. G., RAMBAUT, A., LIPKIN, W. I., HOLMES, E. C., GARRY, R. F. 2019. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature medicine*, 26(4), 450–452. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>
3. ARANDIA GUZMAN, J., ANTEZANA-LLAVETA, G. SARS-CoV-2: estructura, replicación y mecanismos fisiopatológicos relacionados con COVID-19. 2020 *Gac Med Bol, Cochabamba*, v. 43, n. 2, p. 170-178. <https://doi.org/10.47993/gmb.v43i2.85>
4. BANERJEE, A., DOXEY, A.C., MOSSMAN, K., IRVING, A.T. 2020 Unraveling the Zoonotic Origin and Transmission of SARS-CoV-2. *Trends Ecol Evol*. 2021 Mar;36(3):180-184. doi: 10.1016/j.tree.2020.12.002.
5. BANERJEE, A., MOSSMAN, K., BAKER, M.L. 2021. Zoonanthroponotic potential of SARS-CoV-2 and implications of reintroduction into human populations. *Cell Host & Microbe* 29, Issue 2, p160-164. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.01.004>
6. BERRY, M., GAMIELDIEN, J., FIELDING, B.C. 2015. Identification of New Respiratory Viruses in the New Millennium. *Viruses*; 7(3):996-1019. <https://doi.org/10.3390/v7030996>
7. BISCAYART, C., ANGELERI, P., LLOVERAS, S., *et al.* 2020 ‘The next big threat to global health? 2019 novel coronavirus (2019-nCoV): What advice can we give to travellers? – Interim recommendations January 2020, from the Latin-American society for Travel Medicine (SLAMVI)’, *Travel Medicine and Infectious Disease*. Elsevier USA, p. 101567. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101567>
8. BRAVO RUIZ, A., JIMENEZ VARELA, M. 2020 SARS-CoV-2 y pandemia del síndrome respiratorio agudo (COVID-19). *Ars pharm* 61(2): 63-79. Doi: <http://dx.doi.org/10.30827/ars.v61i2.15177>
9. BROOR, S., BHARAJ, P., CHAHAR, H.S. 2008. “Human metapneumovirus: a new respiratory pathogen”. *J. Biosci.* 33(4): 483-493. <https://doi.org/10.1007/s12038-008-0067-y>

10. CÁMARA, A.. et al. 2016 ‘Estudio de caso: Primera detección de Coronavirus (CoVh-229e) en adulto con infección respiratoria oriundo del interior de Córdoba, Argentina, 2011.’, in XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología y XIV Congreso Argentino de Microbiología ALAM-CAM. Rosario, Santa Fe, Argentina.
11. CÁMARA, A., RODRIGUEZ, P.E., ADAMO, M.P., CÁMARA, J. 2018. Virosis Respiratorias. En: ADAMO, M.P y CONTIGIANI, M. *Virología: Un enfoque integral de las infecciones virales humanas*. pp. 93-109. Editorial Brujas, Córdoba, Argentina.
12. CARBALLAL, G. y OUBIÑA, J.R. 2015 Diagnóstico Viroológico. En: CARBALLAL, G. y OUBIÑA, J.R. *Virología Médica 4ª edición*. pp. 205-240 Corpus libros científicos, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
13. CARBALLAL, G. y ECHEVARRÍA, M. 2015. Infecciones Respiratorias de origen viral: Impacto y diagnóstico etiológico. En: CARBALLAL, G. y OUBIÑA, J.R. *Virología Médica 4ª edición*. pp. 261-271. Corpus libros científicos, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
14. CDC 2020 ‘CDC Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel’. Available at: <https://www.fda.gov/media/134922/download>.
15. CORMAN, V. M., MUTH, D., NIEMEYER, D., DROSTEN, C. 2018. Hosts and Sources of Endemic Human Coronaviruses. *Advances in virus research*, 100, 163–188. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.01.001>
16. CORMAN, V., LANDT, O., KAISER, M., MOLENKAMP, R., MEIJER, A., et al. 2020 ‘Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR’, Charité Virology, Berlin, Germany. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies*
17. CUI, J., LI, F., SHI, Z.L. 2019. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* 17, 181–192 . <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>
18. DABANCH, J. 2021. Emergencia de SARS-CoV-2. Aspectos básicos sobre su origen, epidemiología, estructura y patogenia para clínicos. REV. MED. CLIN. CONDES - 2021; 32(1) 14-19. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2020.12.003>
19. DIAO, B., WEN, K., CHEN, J., LIU, Y., YUAN, Z., HAN, C., WU, Y. et al. 2020. Diagnosis of acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection by detection of nucleocapsid protein. *MedRxiv*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 2020.03.07.20032524. doi: 10.1101/2020.03.07.20032524.

20. DÍAZ FJ, AGUILAR-JIMÉNEZ W, FLÓREZ-ÁLVAREZ L, *et al.* 2020. Isolation and characterization of an early SARS-CoV-2 isolate from the 2020 epidemic in Medellín, Colombia. Aislamiento y caracterización de una cepa temprana de SARS-CoV-2 durante la epidemia de 2020 en Medellín, Colombia. *Biomedica*.;40(Supl. 2):148-158. Published 2020 Oct 30. doi:10.7705/biomedica.5834
21. FELSENSTEIN, S., HELBERT, J. A., McNAMARA, P. S., HEDRICH, C. M. 2020. COVID-19: Immunology and treatment options. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 215, 108448. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2020.108448>
22. GUERRERO GÓMEZ, S.; SÁNCHEZ CARRILLO, C. 2003. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología. ED.: Cercenado, E. y Cantón, R. ISBN: 84-609-2287-1. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1a.pdf>.
23. GUTIÉRREZ-SALINAS, J., MONDRAGÓN-TERÁN, P., GARCÍA-ORTÍZ, L., *et al.* 2016. Virus de la influenza humana como ejemplo de enfermedad emergente en México. *Med Int Mex.*;32(2):213-224.
24. HASÖKSÜZ, M., KILIÇ, S., SARAÇ, F. 2020. Coronavirus y SARS-COV-2. *Revista turca de ciencias médicas*, 50 (SI-1), 549–556. <https://doi.org/10.3906/sag-2004-127>
25. HUANG, C., WANG, Y., LI, X., REN, L., *et al.* 2020 Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China, *The Lancet*. Lancet Publishing Group, 395(10223), pp. 497–506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
26. JIN, Y., YANG, H., JI, W., WU, W., CHEN, S., ZHANG, W., DUAN, G. Virología, epidemiología, patogenia y control de COVID-19. *Virus*. 2020 27 de marzo; 12 (4): 372.doi: 10.3390 / v12040372.
27. LAM, T.TY., JIA, N., ZHANG, YW. *et al.* 2020. Identificación de coronavirus relacionados con el SARS-CoV-2 en pangolines malayos. *Naturaleza* 583, 282–285 <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2169-0>

28. LAUXMANN, M.A., SANTUCCI, N.E., AUTRÁN-GÓMEZ, A.M. 2020. El coronavirus SARS-CoV-2 y el brote de COVID-19. *International braz j urol: revista oficial de la Sociedad Brasileña de Urología*, 46 (supl. 1), 6–18. <https://doi.org/10.1590/S1677-5538.IBJU.2020.S101>
29. LI, B., LI, X., WANG, Y., HAN, Y., WANG, Y., WANG, C., ZHANG, G., JIN, J., JIA, H., FAN, F., MA, W., LIU, H., ZHOU, Y. 2020. Diagnostic value and key features of computed tomography in Coronavirus Disease 2019. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 787–793. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1750307>
30. LOEFFELHOLZ, M. J., TANG, Y. W. 2020 ‘Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections—the state of the art’, *Emerging Microbes and Infections*. Taylor and Francis Ltd., pp. 747–756. doi: 10.1080/22221751.2020.1745095.
31. MADRIGAL-ROJAS, J. P., QUESADA-LORÍA, M., GARCÍA-SÁNCHEZ, M., SOLANO-CHINCHILLA, A. 2021. SARS CoV-2, manifestaciones clínicas y consideraciones en el abordaje diagnóstico de COVID-19. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, vol. 86, no 629, p. 13-21.
32. MANGEAUD, A., ELÍAS PANIGO, D.H. 2018 R-Medic. Un programa de análisis estadístico sencillo e intuitivo. *Revista Methodo* 3 (1) 18-22.
33. MARÍN, J. E. O. 2020. SARS-CoV-2: origen, estructura, replicación y patogénesis. *Alerta, Revista científica del Instituto Nacional de Salud*, 3(2), 79-86.
34. MARTÍNEZ, R. A. O., & MARFULL, P. J. C. 2021. Prueba rápida y PCR Covid-19 vs score de indicación TR PCR como método diagnóstico y de evolución en la pandemia de coronavirus. En: SERNA, M.E. (Editor). *Ciencia transdisciplinar para el desarrollo y la supervivencia de la humanidad*. pp. 162-171. DOI: <http://doi.org/10.5281/zenodo.5139646>
35. MEZA CALVACHE, J. M.; ESTRADA RODRÍGUEZ, A. D.; CHABUSA MARTÍNEZ, C. B.; VELASCO PAUCAR, V. A. 2020. Utilidad de pruebas de cadena de polimerasa, pruebas rápidas y tomografías en pacientes con Covid-19. *Journal of American Health*, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 32–39,. <https://doi.org/10.37958/jah.v3i2.28>.
36. MOREIRA-SOTO, A., TROYO, A., CORRALES-AGUILAR, E. 2013 Síndrome Respiratorio de Medio Oriente causado por un coronavirus y el Hajj: ¿potencial

- para una emergencia internacional?. *Medicas UIS* [online]., vol.27, n.1 [cited 2022-04-05],pp.25-33.Availablefrom:<http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-03192014000100004&lng=en&nrm=iso>.
37. NACIONES UNIDAS, Objetivos de Desarrollo Sostenible. Disponible en: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/sustainable-development-goals/>
38. OKBA, N., MÜLLER, M.A, LI, W., WANG, C., GEURTSVANKESSEL, C.H, CORMAN, V.M, LAMERS, M.M, SIKKEMA, R.S, DE BRUIN, E., CHANDLER, FD, YAZDANPANA, Y., LE HINGRAT, Q., DESCAMPS, D., HOUHOU-FIDOUH, N., REUSKEN, C., BOSCH, BJ, DROSTEN, C., KOOPMANS, M. y HAAGMANS, BL 2020. Respuestas de anticuerpos específicos del coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo en pacientes con enfermedad por coronavirus. *Enfermedades infecciosas emergentes* , 26 (7), 1478–1488. <https://doi.org/10.3201/eid2607.200841>
39. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. 2020. Directrices de Laboratorio para la detección y diagnóstico de la Infección con el Nuevo Coronavirus 2019 (2019-nCoV). Paho - Who, 1, p. 5. Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&slug=laboratory-guidelines-for-detection-and-diagnosis-of-the-novel-coronavirus-2019-n-cov-infection&Itemid=270&lang=es.https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&slug.
40. ORTIZ HIDALGO, C. 2018. Breve nota sobre la historia de la inmunohistoquímica. *Patología Rev Latinoam*.56(2): 46-59.
41. OTTOGALLI, M.E. et al. (2015) ‘Ajustes Metodológicos: Investigación de Coronavirus por Técnicas Moleculares en Córdoba.’, in 3a Reunión conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina. Tucumán, Argentina. *transmissibles = European communicable disease bulletin*, 25(3), 2000045.<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
42. OTTOGALLI, M. E. CÁMARA, A. 2016 Análisis Molecular de Coronavirus en pacientes con enfermedades respiratorias, en la ciudad de Córdoba. Universidad Nacional de Córdoba
43. OTTOGALLI, M. E., RODRÍGUEZ, P. E., FRUTOS, M. C., MORENO, L. B., Ghietto, L. M., CUFFINI, C. G., ... & CÁMARA, A. 2021. Circulation of human

- coronaviruses OC43 and 229E in Córdoba, Argentina. *Archives of Virology*, 166(3), 929-933.
44. PERCIVALLE, E., SARASINI, A., VISAI, L., REVELLO, M.G., GERNA, G.. 2005."Detección rápida de cepas de metapneumovirus humano en aspirados nasofaríngeos y cultivos de viales de cubierta mediante anticuerpos monoclonales" *J. Clin Microbiol.* 2005 julio; 43(7): 3443–3446. doi: 10.1128/JCM.43.7.3443-3446.2005.
45. PÉREZ, I. N. et al. 2019 ‘Coronavirus humano en niños hospitalizados de Córdoba. Análisis epidemiológico anual.’, in XXXIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Virología. Valle Hermoso, Córdoba, Argentina.
46. PIANCIOLA, L., GONZÁLEZ, G., MAZZEO, M., NAVELLO, M., QUIDEL, N., & BULGHERONI, M. F. (2010). Desempeño de la prueba de inmunofluorescencia directa en el diagnóstico del virus Influenza A (H1N1). *Revista Panamericana de Salud Publica*, 27, 452-454.
47. RASKOVSKY, V. et al. 2016a. ‘First report of human metapneumovirus circulation in salta’, in iii Latinamerican symposium of environmental virology, p. 28.
48. RASKOVSKY, V.. et al. 2016b. ‘Respiratory virus surveillance in salta: circulation of influenza A and B in the first quarter of 2016’, in III Latinamerican symposium of environmental virology, p. 30.
49. RASKOVSKY, V. et al. 2017 ‘Vigilancia de virus respiratorios en salta, argentina, 2010-2016’, in XII Congreso Argentino de Virología, pp. 63–64.
50. REINA, J. y FRAILE, P. 2020. Características virológicas y diagnóstico del SARS-CoV-2. *Medicina balear*, ISSN-e 2255-0569, Vol. 35, N°. Extra 4, 2020 (Ejemplar dedicado a: COVID-19), págs. 62-68. doi: 10.3306/MEDICINABALEAR.35.04.62
51. RODRÍGUEZ, P. et al. 2016 ‘Airborne transmission HMPV and HCOV in Córdoba, Argentina. The challenge is to analyze fomite’, in III Simposio Latinoamericano de Virología Ambiental. Salta, Argentina, p. 27.
52. RODRÍGUEZ, P. E. et al. 2016. ‘Mono-infection of human Metapneumovirus in Cordoba: first clinical and epidemiological research in children with respiratory infection in 2011’, *Revista de la Facultad de Ciencias Medicas (Cordoba, Argentina)*, 73(3), pp. 170–175. doi: 10.31053/1853.0605.v73.n3.12627.

53. RODRÍGUEZ, P. E. *et al.* 2017 ‘Epidemiología de Metapneumovirus y Coronavirus humano durante el año 2016 y primer trimestre de 2017 en Córdoba.’, in XII Congreso Argentino de Virología. Buenos Aires, Argentina.
54. RODRÍGUEZ, P. E. *et al.* 2018. Infección simple de Coronavirus (CoVh-OC43) en niños internados del Hospital Infantil Municipal de Córdoba en un bimestre de 2018. En: XIX Jornada de Investigación Científica de la Facultad de Ciencias Médicas, UNC. Córdoba, Argentina.
55. ROZAS, B.A., VARGAS URRÁ, J., GARCÍA GARZÓN, J. 2020. Caracterización patogénica, clínica y diagnóstica de la pandemia por SARS-CoV-2. *Rev Chilena Infectol.* 2020 Jun;37(3):265-275. Spanish. doi: 10.4067/s0716-10182020000300265.
56. SOLÍS, J. G. B. Estructura y composición del SARS-COV-2. 2020. Fundación Benalm Volumen 30 - Número Especial.
57. SONG, Z., XU, Y., BAO, L., ZHANG, L., YU, P., QU, Y., ZHU, H., ZHAO, W., HAN, Y., QIN, C. 2019. From SARS to MERS, Thrusting Coronaviruses into the Spotlight. *Viruses*, 11(1), 59. <https://doi.org/10.3390/v11010059>
58. 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 Microbiol.* Jun;24(6):490-502. doi: 10.1016/j.tim.2016.03.003.
59. SWATANTRA, K., RAJNI, N., VIMAL, K. M., SHAIENDRA, K.S. 2020. Morphology, Genome Organization, Replication, and Pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). En: *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Therapeutics*. SHAIENDRA, K.S. pp 23-32. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-4814-7>
60. TO, K. K. W., TSANG, O. T. Y., LEUNG, W. S., TAM, A. R., WU, T. C., LUNG, D. C., YUEN, K. Y. *et al.* 2020. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *The Lancet infectious diseases*, 20(5), 565-574. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30196-1.
61. URREGO, M.G. 1991. Inmunofluorescencia fundamentos. Serie de notas e informes técnicos N° 1, cuarta impresión. Instituto Nacional de Salud, Ministerio de Salud, Bogotá.

62. US CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, RESPIRATORY VIRUS BRANCH AND DIVISION OF VIRAL DISEASES. 2020. 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes. pp. 2–3.
63. WANG, M. Y, ZHAO, R., Gao L-J., GAO X-F., WANG, D-P., CAO, J-M. (2020) SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10:587269. doi: 10.3389/fcimb.2020.587269
64. WILHELM, J., YUBERO, J., FUENTES, C., RÍOS, P., LEYTON, O., REYES, F.. 2014. Evaluación de la sensibilidad diagnóstica de tres técnicas de laboratorio para la infección por influenza A: inmunocromatografía, IFD e IFD con citocentrifugado versus RPC-TR. *Revista chilena de infectología*, 31(6), 690-693. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182014000600009>
65. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2020 ‘WHO Director-General’s opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020’, WHO Director General’s speeches,(April),p.4.
66. ZAPATA, J. 2014. Histología del sistema respiratorio. 06- 04-2014. Recuperado en: <https://www.slideshare.net/julianazapatacardona/histologa-del-sistema-respiratorio-33199311>.
67. ZHOU, P., YANG, X.L., WANG, X.G. *et al.* 2020. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579, 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>