

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Posgrados

Evaluación de pruebas serológicas como método rápido de diagnóstico temprano para infección por SARS-CoV-2 en comparación con RT-qPCR en la población del Sur del Ecuador durante el año 2020-2021 – Estudio piloto

Tesis en torno a una hipótesis o problema de investigación y su contrastación

Andrea Fernanda Macías Matamoros

**Patricio Rojas Silva, M.D., Ph.D.
Director de Trabajo de Titulación**

Trabajo de titulación de posgrado presentado como requisito para la obtención del título de Magíster en Microbiología

Quito, 1 de Diciembre de 2021

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE POSGRADOS

HOJA DE APROBACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Evaluación de pruebas serológicas como método rápido de diagnóstico temprano para infección por SARS-CoV-2 en comparación con RTq-PCR en la población del Sur del Ecuador durante el año 2020-2021 – Estudio piloto

Andrea Fernanda Macías Matamoros

Patricio Rojas Silva, M.D., Ph.D.
Director del Trabajo de Titulación.

Verónica Barragán, Ph.D.
Miembro del Comité de Tesis

Paúl Cárdenas, M.D., Ph.D.
Miembro del Comité de Tesis

Patricio Rojas Silva, MD., Ph.D.
Director del Programa de Microbiología.

Hugo Burgos, Ph.D.
Decano del Colegio de Posgrados.

Quito, Diciembre 2021

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art, 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Firma del estudiante: _____

Nombre del estudiante: Andrea Fernanda Macías Matamoros

Código de estudiante: 00209301

C.I.: 070480079-6

Lugar y fecha: Quito, 01 de Diciembre de 2021.

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETheses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following graduation project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETheses>.

DEDICATORIA

A mi compañero de vida, Juan Guillermo, por animarme a seguir mis sueños, y a mis amados niños, Santiago y Samantha, son mi motor de vida.

A mis padres, Eduardo y Jenny, y a mis hermanos, José y Andrés, por su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, Patricio Rojas Silva, director del Instituto de Microbiología, por su apoyo, paciencia, consejo y dedicación. Estaré infinitamente agradecida.

A Belén Prado del Laboratorio de Bioinformática del Instituto de Microbiología, por su disposición y guía en la realización del presente trabajo.

Al Instituto de Microbiología de la USFQ, por abrirme las puertas a esta gran experiencia y a mis queridos docentes por compartir sus conocimientos a lo largo de este viaje. En especial, a Verónica Barragán, Paúl Cárdenas, Antonio Machado y Cristina Chávez, por corregir, apoyar y guiarme a lo largo de la maestría. Gracias por su dedicación a la docencia e investigación.

A mis maravillosos compañeros de posgrado, Valentina, Paula, Carolina M., Viviana, Belén, Rebeca, Carolina G., Stuart, Santiago, Sarita, Fernanda, Ligia y Lorena, quienes se convirtieron en amigos y familia durante esta etapa. Los guardo en mi corazón.

RESUMEN

El uso de pruebas de diagnóstico molecular ha sido de gran importancia en la identificación de las personas infectadas. En el inicio de la pandemia se desarrollaron pruebas para diagnosticar COVID-19 y detectar la inmunidad frente al SARS-CoV-2 por ser un método rápido y de bajo costo.

En este estudio se realizó un muestreo de tipo no probabilístico por conveniencia, que incluyó 48 pacientes diagnosticados con COVID-19 donde la fecha del inicio de los síntomas fue menor o igual a 12 días, a quienes se les tomó una muestra de hisopado orofaríngeo y sangre venosa. Se comparó una prueba cualitativa y cuantitativa para IgG/IgM, frente al método molecular, encontrando una detección del 87.23% para RT-qPCR, 56.25% para la prueba cualitativa y un 37.50% para la cuantitativa, con $p < 0.0005$. Concluyendo que las pruebas serológicas de detección de anticuerpos, rápidas y cuantitativas, son un método rápido y confiable, para la detección de anticuerpos IgG/IgM para SARS-CoV-2, pero no son eficaces en el diagnóstico temprano de COVID-19 en comparación con RT-qPCR, que es la prueba gold estándar.

Palabras clave: RT-qPCR, anticuerpos IgG/IgM, diagnóstico COVID-19, SARS-CoV-2.

ABSTRACT

The use of molecular diagnostic tests has been of great importance in identifying infected people. At the beginning of the pandemic, tests were developed to diagnose COVID-19 and detect immunity against SARS-CoV-2 for being a fast and low-cost method.

In this study, we performed a non-probabilistic convenience sampling, which included 51 patients diagnosed with COVID-19 where the date of onset of symptoms was less or equal to 12 days, from whom an oropharyngeal swab and a venous blood sample was taken. We compared the qualitative and quantitative test for IgG/IgM with the molecular method, finding a detection of 87.23% for RT-qPCR, 56.25% for the qualitative test and 37.50% for the quantitative test, with $p < 0.0005$. Concluding that rapid and quantitative serological antibody tests are a fast and reliable method for the detection of IgG/IgM antibodies to SARS-CoV-2 but are not effective in the early diagnosis of COVID-19 in comparison with RT-qPCR, which is the gold standard test.

Key words: RT-qPCR, IgG / IgM antibodies, COVID-19 diagnosis, SARS-CoV-2.

TABLA DE CONTENIDO

Hoja de aprobación de trabajo de titulación.....	2
Derechos de autor.....	3
Aclaración para publicación.....	4
Dedicatoria.....	5
Agradecimientos.....	6
Resumen.....	7
Abstract.....	8
Índice de tablas.....	10
Índice de figuras.....	11
Introducción.....	12
1. Justificación.....	12
2. Hipótesis.....	14
3. Revisión de la literatura.....	14
3.1 Biología de SARS-CoV-2.....	14
3.2 Patogenia.....	15
3.3 Transmisión.....	16
3.4 Diagnóstico de COVID-19.....	16
3.5 Sensibilidad y Especificidad de Pruebas diagnósticas.....	18
4. Objetivos.....	19
4.1 Objetivo General.....	19
4.2 Objetivos Específicos.....	19
Metodología y diseño de la investigación.....	20
1. Participantes.....	20
2. Muestras.....	20
3. Análisis cualitativo y cuantitativo en suero.....	21
4. Extracción de ARN.....	22
5. Preparación de ADNc y RT-qPCR.....	23
6. Secuenciación del genoma.....	24
Análisis Estadístico.....	25
Resultados y Análisis de datos.....	26
1. Información Clínica y Sociodemográfica de los Participantes.....	26
2. Resultados cualitativos y cuantitativos.....	30
3. Resultados de RT-qPCR.....	31
4. Comparación de las pruebas serológicas de anticuerpos y RT-qPCR.....	32
5. Secuenciamiento y Comparación frente a la cepa de referencia de Wuhan.....	35
Discusión.....	38
Conclusiones.....	42
Referencias.....	43
Índice de anexos.....	49

INDICE DE TABLAS

Tabla N°1. Condiciones de reacción para RT-qPCR.....	23
Tabla N°2. Distribución de los participantes de provincias del Ecuador.....	26
Tabla N°3. Características clínicas de los pacientes.....	29
Tabla N°4. Asignación de clado y linaje de siete muestras secuenciadas.....	37
Tabla N°5. Sustituciones de aminoácidos encontradas.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de género de los participantes en el estudio.....	27
Figura 2. Frecuencia de edades de los participantes en el estudio.....	27
Figura 3. Desenlace de los pacientes.....	28
Figura 4. Distribución de resultados positivos y negativos de IgG e IgM según prueba cualitativa.....	30
Figura 5. Distribución de resultados positivos y negativos de IgG e IgM según prueba cuantitativa.....	31
Figura 6. Detección de positivos mediante RT-qPCR.....	32
Figura 7. Comparación de resultados positivos y negativos según pruebas serológicas y RT-qPCR.....	32
Figura 8. Comparación de resultados positivos según pruebas serológicas y RT-qPCR.....	33
Figura 9. Comparación de IgM Cuantitativo y RT-qPCR.....	34
Figura 10. Relación entre la Edad y RT-qPCR.....	35

INTRODUCCIÓN

1. JUSTIFICACION

Los primeros casos de la enfermedad COVID-19 fueron reportados por primera vez a nivel mundial en diciembre 2019 en la ciudad de Wuhan, China. Luego, el virus responsable de esta infección se diseminó a nivel global, ocasionando la primera pandemia por el coronavirus SARS-CoV-2, que fue declarada oficialmente por la OMS el 11 de marzo de 2020 (OMS, 2020).

El 28 de febrero de 2020 se reportó el primer caso oficial de COVID-19 en Ecuador, siendo Guayaquil la primera ciudad en notificarlo. Debido a su fácil transmisión por gotículas respiratorias y aerosoles durante contacto cercano (OMS, 2020) se propagó rápidamente aumentando el número de casos confirmados en todo el país. El 14 de marzo de 2020 se reporta por primera vez una paciente con COVID-19 en la provincia del Azuay, el 16 de marzo en El Oro y Morona Santiago, y el 20 de marzo en Cañar, donde inicialmente la velocidad de propagación fue lenta debido a las medidas dispuestas por el gobierno; sin embargo, y tras de 15 meses de la epidemia, según el Boletín Provincial con fecha del 11 de junio de 2021, se han confirmado, mediante la prueba de RT-qPCR, 23.758 casos en Azuay, 20.880 casos en El Oro, 5.817 en Morona Santiago y 5.745 en Cañar (MSP, 2020).

Al inicio de 2020 se emplearon las pruebas inmunocromatográficas como diagnóstico rápido de la infección por SARS-CoV-2, lo que implica en realidad la detección de la respuesta de IgM específica que es un marcador eficaz de la infección primaria, aunque con menor validez en reactivaciones o reinfecciones (García & Ory, 2017). Debido a la alta demanda, se comercializan kits de pruebas rápidas de anticuerpos de diferentes marcas comerciales, la

mayoría de procedencia China, las cuales presentan una gran variabilidad en el número de ensayos empleados para el cálculo de la sensibilidad y especificidad (La Marca et al., 2020).

A inicios de abril 2020, varios países como España, Italia, Turquía, y República Checa adquirieron miles de pruebas rápidas defectuosas, siendo el último caso reportado en abril en Colombia que adquirió 47.500 pruebas defectuosas, con el fin de disminuir el tiempo de detección de la infección (Cantillo, 2020). Varios estudios como el de *Mercado y col.*, compararon nueve tipos de pruebas rápidas serológicas encontrando una sensibilidad entre el 69% a 93% en personas sintomáticas y una sensibilidad menor al 40% en personas asintomáticas y, acorde con revisiones sistemáticas como la de *Deeks y col.*, concluyen en una baja sensibilidad del 30% en los primeros siete días de enfermedad. A pesar de esto, la producción masiva de pruebas a nivel mundial tentó al Ecuador a la introducción de 470 marcas de test rápidos y 71 kits para RT-qPCR aprobados por la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria, ARCSA, en las primeras semanas de pandemia, por lo que se vio la necesidad de evaluar el rendimiento de pruebas rápidas y pruebas cuantitativas de anticuerpos con RT-qPCR para comparar y comprobar si su sensibilidad es la reportada por el fabricante, con el propósito de que la comunidad obtenga resultados fiables y puedan ser utilizados como diagnóstico temprano de COVID-19. Además, el uso de la tecnología Nanopore como método de diagnóstico ha permitido q países como el nuestro tengan al alcance el secuenciamiento, con el fin de identificar la transmisión y diversidad genética del SARS-CoV-2 además del monitoreo de las variantes y la epidemiología a nivel mundial; por lo que con el secuenciamiento se espera realizar un diagnóstico clínico preciso y la evaluación de las cepas circulantes en cuatro provincias del Sur del Ecuador.

2. HIPÓTESIS

Las pruebas serológicas de detección de anticuerpos, rápidas y cuantitativas, son un método rápido y confiable para el diagnóstico temprano de COVID-19 en comparación con RT-qPCR.

3. REVISIÓN DE LA LITERATURA

3.1. Biología de SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 pertenece a la familia *Coronaviridae*, que está conformada por cuatro géneros: α -coronavirus, β -coronavirus, γ -coronavirus y δ -coronavirus, y que se caracterizan por poseer envoltura e infectar a mamíferos y aves. Los coronavirus poseen un genoma de ARN de aproximadamente 30 kilobases de longitud de cadena positiva con envoltura. SARS-CoV-2 pertenece al grupo de los β -coronavirus, que ocasiona una enfermedad que afecta principalmente las vías respiratorias y puede ocasionar enfermedad pulmonar grave (Perrotta et al., 2020). El genoma codifica para proteínas estructurales como: la proteína de la espiga (spike S), proteína de la nucleocápside (N), proteína de membrana (M) y proteína de envoltura (E), y 17 proteínas no estructurales (ns1 a ns17) (Domling & Gao, 2020). La proteína E participa en el ensamblaje y liberación de partículas virales. La proteína M proporciona la forma de la envoltura viral y se une a la nucleocápside, mientras que la proteína N se une al genoma del ARN construyendo la nucleocápside. Las proteínas M, E y S entran en el complejo del compartimento intermedio del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi y constituyen la envoltura viral (Bahrami & Ferns, 2020). La entrada del virus está mediada por la proteína de la espiga (proteína S) que está compuesta por dos subunidades S1 y S2. La función de la subunidad S1 es unirse al receptor en la célula hospedadora y consta de un dominio N-terminal (NTD) y un dominio de unión al receptor (RBD). La subunidad S2 fusiona las membranas de

los virus con las células huésped y contiene péptido de fusión (FP), repetición de heptada 1 (HR1), hélice central (CH), dominio conector (CD), repetición de heptada 2 (HR2), dominio transmembrana (TM) y cola citoplásmica (CT)El dominio de unión al receptor (RBD) se acopla específicamente al receptor de la célula huésped, determinando así el tropismo y la patogenicidad de la célula viral. (Wang M. et al., 2020).

3.2. Patogenia

El reconocimiento de receptores celulares por SARS-CoV-2 se da mediante la proteína de la espiga, que posee el dominio de unión al receptor (RBD), donde el virus se une de forma específica al receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) del humano que promueve la escisión de la hemaglutinina por parte de proteínas de superficie celular denominadas serin proteasa 2 transmembranal (TMPRSS2) y catepsinas, de las vías respiratorias (Perrotta et al., 2020). Estas proteasas activan la entrada de SARS-CoV-2 en la célula anfitriona, donde RBD atraviesa cambios conformacionales como una bisagra, lo que lleva a la exposición de los determinantes de la proteína de la espiga para activar el receptor de la célula anfitriona (Shang et al., 2020). Este proceso forma dos estados: conformación "hacia abajo" y conformación "hacia arriba". En el estado "hacia abajo", los motivos de reconocimiento no sobresalen de la interfaz. En el estado abierto "hacia arriba" se realiza la fusión del SARS-CoV-2 y las membranas de la célula huésped para el ingreso del virus contribuyendo a la propagación de SARS-CoV-2. El cambio de posición de RBD determina la infectividad, pero también sirve de mecanismo de evasión de la respuesta inmune (Wang M. et al., 2020). Es la afinidad entre RBD y ACE2 lo que determina principalmente qué hospedador es susceptible a la infección por SARS-CoV-2.

3.3. Transmisión

SARS-CoV-2 se transmite principalmente por gotitas respiratorias, aerosoles y fómites (Sharma et al., 2020). Las gotitas respiratorias son partículas que posee un diámetro mayor a 5 μm y se producen al toser, estornudar y gritar, pueden transmitir virus o bacterias y se depositan en superficies, mientras que los aerosoles que miden menos de 5 μm , se generan al respirar y hablar y permanecen suspendidas en el aire (Kutti-Sridharan et al., 2020).

3.4. Diagnóstico de COVID-19

El diagnóstico de primera línea se basa en el uso de pruebas moleculares como RT-PCR cuantitativo (RT-qPCR), que detectan ARN del virus en muestras de hisopados orofaríngeos, nasofaríngeos, esputo y líquido broncoalveolar con diferente rendimiento diagnóstico. La carga viral se puede estimar con RT-qPCR con la búsqueda específica del gen N mediante la extracción de ARN, para sucesivamente convertirlo en ADNc a través de una retrotranscriptasa y amplificar el gen a buscar. Se ha determinado que la carga viral máxima que alcanzan hasta 6 días después de la aparición de los síntomas se encuentra entre 10^4 a 10^7 copias/ml en hisopados (Dhama et al., 2020). La RT-qPCR usa primers específicos que apuntan a las regiones específicas del virus, y sondas fluorescentes que controlan el progreso de la amplificación a nivel que se producen amplicones en la muestra, donde se usa el denominado Ct o Cq para correlacionar la concentración del objetivo y su positividad.

Las pruebas cuantitativas y cualitativas de anticuerpos son importantes en el diagnóstico y vigilancia de la enfermedad, y pueden complementar a las pruebas moleculares, pues pueden detectar los anticuerpos desde los 7 días luego del inicio de los síntomas, detectar infecciones pasadas y evaluar la respuesta humoral en individuos o cohortes con diferentes métodos de tratamiento (Vandenberg et al., 2021). La detección se realiza mediante un ensayo

cromatográfico de inmunoabsorción para la detección cualitativa de anticuerpos IgG o IgM, que consiste en membranas de nitrocelulosa inmovilizadas e impregnadas con el antígeno específico de SARS-CoV-2 conjugado con nanopartículas de oro coloreadas, las cuales se van a unir a los anticuerpos IgG o IgM para detectarse de forma colorimétrica en 10 minutos (Kevadiya et al., 2021). Sin embargo, las limitaciones de las pruebas rápidas son que al detectar anticuerpos, los niveles de IgM se forman desde los primeros ocho días de la infección por el virus, y depende de las características del paciente, sin embargo, estos ensayos conllevan bajo tiempo y costo apoyando al diagnóstico en el contexto epidemiológico. Por otro lado, la RT-qPCR puede tener un tiempo de respuesta mayor a 48 horas y aumentar los riesgos de contaminación cruzada, baja calidad en la extracción y purificación de ácidos nucleicos, los primers que se dirigen a diferentes partes de genomas pueden ser afectados por la variación de la secuencia del ARN viral y finalmente altos costos (Kevadiya et al., 2021).

En la investigación y el diagnóstico clínico, los métodos de secuenciación de alto rendimiento, conocidos como secuenciación de próxima generación (NGS), permiten la caracterización simultánea de millones de fragmentos de ADN individuales (o fragmentos de ADNc), identificando la diversidad viral mediante la secuenciación de ARN lo que facilita el ensamblaje del genoma y su respectivo análisis, siendo importante para el diagnóstico preciso, seguimiento y control de una infección viral (Mohamadian et al., 2021). El secuenciamiento mediante la tecnología de Oxford-Nanopore, permite el secuenciamiento de lecturas largas de estas moléculas individuales, el cual se basa en el principio de que, el ARN de una sola hebra del SARS-CoV-2 se transloca sobre una proteína nanoporosa que está formada de dos unidades, una enzima motor y un lector de nanoporos incorporados en una membrana eléctrica. Las moléculas de ARN causan una fluctuación de corriente la cual permite el ingreso a través del nanoporo, mientras tanto, el proceso de translocación del ARN del SARS-CoV-2 resiste

parcialmente el flujo de iones en el lector de nanoporos, por lo que detecta el paso de nucleótidos en tiempo real según la corriente producida por cada uno de éstos y finalmente se decodifica para generar una secuencia de ARN. El ARN del SARS-CoV-2 se transloca a través de los nanoporos a alta velocidad, alrededor de 80 bases por segundo (Du, 2021). Con el instrumento de Oxford Nanopore MinION se ha estudiado el ARN genómico de SARS-CoV-2 encontrando modificaciones en su genoma, además de estudiar la tasa de evolución del virus (Wang Ming, 2020). Aunque no es considerado un método de diagnóstico de primera línea; el tiempo de respuesta, la portabilidad y el costo cumple un papel importante en la vigilancia epidemiológica, determinando las secuencias con gran precisión (Bull et al., 2020).

3.5. Sensibilidad y Especificidad de Pruebas Diagnósticas

Las pruebas de diagnóstico brindan información definitiva sobre la presencia o ausencia de una enfermedad. La sensibilidad analítica de una prueba se basa en la capacidad de detectar la cantidad mínima de analito de una prueba (Dhama et al., 2020), es decir, la cantidad de copias del ADN procedente de la retrotranscripción del virus SARS-CoV-2 para RT-qPCR y la cantidad de anticuerpos presentes en sangre para pruebas rápidas y cuantitativas de anticuerpos, y así detectar la capacidad de detectar un verdadero positivo. (Trevethan, 2017). La especificidad analítica se refiere a la capacidad de diferenciar de forma exclusiva el analito en presencia de sustancias interferentes en condiciones controladas de laboratorio (Dhama et al., 2020), es decir, la capacidad de las pruebas para detectar un verdadero negativo.

En un metaanálisis realizado por el grupo de Bastos & col., evaluaron 4969 investigaciones basada en la sensibilidad o especificidad de pruebas serológicas comparadas con RT-qPCR para determinar la mejor precisión diagnóstica, encontrando una sensibilidad alta (entre 69.9% y 98.9%) luego de las tres semanas de aparición de los síntomas en comparación a los primeros siete días (entre 13.4% y 50.3%) en el diagnóstico de COVID-19

agudo (Lisboa et al., 2020). En cuanto a la secuenciación mediante nanoporos, se ha conseguido determinar secuencias de consenso altamente precisas, con variantes de un solo nucleótido (SNV) detectadas con una sensibilidad >99% y una precisión >99% proporcionando la idoneidad para el análisis del genoma del SARS-CoV-2 (Bull et al., 2020).

Las pruebas de sensibilidad y especificidad varían según los kits disponibles. Mediante comparación se ha encontrado una alta similitud en las sensibilidades analíticas para la detección del SARS-CoV-2 con RT-qPCR (Vogels et al., 2020) (Florez et al, 2020) y alta comparabilidad en ensayos serológicos (Santaella-Tenorio J, 2020).

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar las pruebas serológicas como método rápido de diagnóstico temprano para COVID-19 en comparación con RT-qPCR en la población del Sur del Ecuador en el año 2020-2021.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar la población de estudio con la información clínica y sociodemográfica de pacientes positivos con SARS-CoV-2 de las provincias de Azuay, Cañar, El Oro y Morona Santiago.
- Comparar la sensibilidad de detección de la infección con SARS-CoV-2 entre pruebas serológicas de anticuerpos cualitativas y cuantitativas, con RT-qPCR.
- Caracterizar las muestras positivas de RT-qPCR mediante secuenciamiento para identificar las variantes circulantes.

- Comparar las mutaciones de las muestras secuenciadas con respecto a la muestra 0 de Wuhan.

METODOLOGÍA Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

1. Participantes

El presente es un estudio piloto que tiene como universo a la población del sur del Ecuador, donde el muestreo es de tipo no probabilístico por conveniencia. Los individuos que formarán parte del estudio deben cumplir con los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de Inclusión:

- Residir en las provincias del sur del Ecuador: Azuay, Cañar, El Oro y Morona Santiago.
- Pacientes diagnosticados con COVID-19.
- Pacientes que presentan signos y síntomas.
- El transcurso de inicio de los síntomas debe ser de un máximo de 12 días.

Criterios de Exclusión:

- Mujeres embarazadas.
- Menores de 18 años de edad.

Todos los pacientes accedieron a participar en este estudio mediante consentimiento informado.

2. Muestras

Se recolectaron 51 muestras de hisopados orofaríngeos y sangre en un laboratorio clínico particular en la ciudad de Cuenca entre agosto 2020 y febrero 2021. De las cuales, tres muestras fueron excluidas por no cumplir con el criterio de ser mayor de edad. Se recolectaron los datos clínicos de los participantes. Las muestras de hisopados contenían el inactivador viral Shield (Zymo Research) y fueron almacenadas a 2°C hasta su respectivo envío al Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito para ser procesadas. Para las muestras de sangre, se extrajo el suero mediante centrifugación a 5000 rpm y aquellas que no se lograron

analizar inmediatamente se almacenaron a una temperatura de congelación de -8°C . Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos (CEISH) de la Universidad San Francisco de Quito V 3.1.1. Aprobación MSP, Oficio No. MSP-SDM-10-2013-1019-O.

3. Análisis cualitativo y cuantitativo en suero

Se realizaron pruebas de anticuerpos cuantitativas utilizando el kit de detección NovaLisa® SARS-CoV-2 (COVID-19) IgG/IgM (NovaTec Immundiagnostica GmbH) según las instrucciones del fabricante, y para las pruebas cualitativas el cassette de prueba rápida COVID-19 IgG/IgM de Healgen Scientific. Se realizaron dos experimentos independientes por cada muestra.

Para la determinación cuantitativa se realizó la técnica ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Las muestras de suero se diluyeron en una relación 1:100 con el tampón de dilución, y se mezclaron en vortex. Se colocaron 100 μL del estándar y muestras en los pocillos respectivos las cuales están recubiertas con antígenos específicos, luego se recubrió las tiras con autoadhesivos y se incubó por 1 hora a 37°C . Luego de la incubación, se retiró el autoadhesivo, se aspiró el líquido y se lavó tres veces con 300 μL de tampón de lavado. Para retirar el líquido sobrante se sacude sobre papel absorbente. Se pipetearon 100 μL de conjugado de peroxidasa de rábano (HRP) en cada pocillo e incubar por 30 min a temperatura ambiente (20°C) a oscuridad. Repetir el lavado como se lo realizó anteriormente. Pipetar 100 μL de Solución de Sustrato Tetrametilbencidina (TMB) en todos los pocillos e incubar 15 min en oscuridad a 20°C . Finalmente pipetear en todos los pocillos 100 μL de la Solución de Parada en el mismo orden e intervalo de tiempo para obtener un cambio de color azul a amarillo. Se mide en un espectrofotómetro de placas ELISA a 450 nm. La intensidad de color es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos en la muestra. (https://www.rafer.es/sites/default/files/kit_elisa_sars-cov-2_covid-19_igm_.pdf) Un valor

mayor a 1.1 UA/ml se considera positivo, entre 0.9 y 1.1 UA/ml se considera indeterminado, y menor a 0.9 UA/ml es negativo.

Para la determinación cualitativa de anticuerpos se usó la técnica de flujo lateral mediante el dispositivo de prueba rápida para COVID-19 IgG / IgM que consiste en colocar el dispositivo sobre una superficie plana y agregar 5 µL de muestra al pocillo S, luego añadir 2 gotas (80 µL) de buffer al pocillo B evitando la formación de burbujas de aire. Los resultados se leen a los 10 minutos. (<https://www.healgen.com/if-respiratory-covid-19>)

4. Extracción de ARN

El ARN viral se extrajo usando el kit de extracción Quick-RNA™ Viral de Zymo Research. Para extraer el ARN total de cada muestra, se añade 800 µl de tampón de ARN viral a cada 400 µl de muestra (2: 1) y mezclar. A continuación, se transfiere la mezcla a una Columna 2 IC Zymo-Spin™ y se debe centrifugar por 2 minutos, para transferir la columna a un nuevo tubo. Luego se realiza un tratamiento con DNasa I, para lo cual, se realiza un lavado con 400 µl de Tampón de ARN a la columna, luego centrifugar y desechar. Se añaden 40 µl de mezcla de reacción de ADNasa I directamente a la matriz de la columna y se incuba a temperatura ambiente (20-30 ° C) durante 15 minutos. Finalmente se añaden 500 µl de tampón de preparación de ARN a la columna, para luego centrifugar y desechar.

Para la purificación del ARN se añaden 500 µl de tampón de lavado viral a la columna, centrifugar 30 segundos y desechar el líquido. Añadir 500 µl de etanol (95-100%) a la columna y centrifugar durante 1 minuto para asegurar la eliminación completa del tampón de lavado. Luego, transferir la columna a un tubo sin nucleasas y agregar 15 µl de agua sin ADNasa / ARNasa directamente a la matriz de la columna para centrifugar durante 30 segundos con el fin de eluir el ARN. (Volumen final de elución: 25 µl)

5. Preparación de ADNc y RT-qPCR

Para la retrotranscripción se coloca en tubo limpio los siguientes reactivos, mediante mezcla suave, según la tabla siguiente:

Tabla N°1. Condiciones de reacción para RT-qPCR

Reactivos	Concentración inicial	Volumen inicial μ l	Concentración final	Volumen final μ l
Mol. Grade H ₂ O	-	1.85	-	40.79
MgSO ₂ 1.6mM/ dNTPs 200mM	2X	5.00	1X	110.25
SuperScript III/ Taq platinum	200U	0.20	4U	4.41
Forward primer	20 μ M	0.250	0.500 μ M	5.51
Forward reverse	20 μ M	0.250	0.500 μ M	5.51
Sonda	5 μ M	0.250	0.125	5.51
ROX	-	0.200	-	4.41
	Volumen de reacción	8.00	VolumenTotal	176.40

Se utilizó el sistema ABI 7300 Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) donde la reacción de amplificación consistió en un primer paso de 15 min a 50°C, seguido por 2 minutos a 95°C para la desnaturalización inicial, 15 segundos a 95°C para la desnaturalización y 30 segundos a 55°C para la extensión, con un total de 35 ciclos. Se detectó el gen N2 utilizando los primers recomendados por el CDC, 2019-nCoV N2-Forward TTA CAA ACA TTG GCC GCA AA, N2-Reverse GCG CGA CAT TCC GAA GAA para la detección de secuencias genéticas específicas de SARS-CoV-2.

Un valor de C_t menor o igual a 30 se definió como prueba positiva y apta para hacer secuenciamiento. Un valor de C_t mayor a 30 se consideró como prueba positiva, pero no apta para secuenciamiento.

6. Secuenciación del genoma

Las muestras seleccionadas fueron procesadas con el secuenciador MinION (Oxford-Nanopore Technologies). Para la secuenciación se realizó el esquema de imprimación desarrollado por la Red ARTIC para nCoV-2019 (https://www.protocols.io/view/ncov-2019-sequencing-protocol-bbmuik6w?version_warning=no), utilizando los juegos de imprimaciones V3.

El producto de esta reacción se purificó mediante el uso de perlas magnéticas AMPure XP (Beckman Coulter, EE. UU.), y se cuantificó utilizando un kit de ensayo de ARN Qubit (Thermo Scientific, Invitrogen, EE. UU.). Después se realizó la preparación de la biblioteca de cDNA utilizando el kit RAPID de código de barras (SQK-RBK004) (Oxford Nanopore Technologies), para cargar en la celda de flujo MinION (FLO-MIN 106). Para poder monitorear la secuencia en tiempo real se utilizó el software RAMPART (v1.0.5) de la red ARTIC (<https://github.com/artic-network/rampart>). Después de la secuenciación, se utilizó Nanoplot y Porechop (V 0.2.4) (<https://github.com/rrwick/Porechop>) para determinar la calidad de la secuencia y realizar demultiplex y extracción del adaptador, respectivamente. Para generar genomas de consenso, las lecturas se mapearon contra la cepa de referencia de Wuhan-Hu-1 (número de acceso de GenBank MN908947). Finalmente se utilizó la herramienta NextClade (v0.4.0) para asignar los clados a cada una de las secuencias, y se cargaron los genomas en el programa CoV-GLUE para la clasificación del linaje.

Para determinar el número de variaciones frente a la muestra de Wuhan de la base de datos GISAID, se realizó una comparación usando la plataforma NextClade.

7. Análisis Estadístico

Se realizó una base de datos y se analizó la sensibilidad para la detección de SARS-COV-2 por RT-PCR en comparación con los métodos de anticuerpos por ELISA e inmunocromatografía, mediante el porcentaje de pruebas positivas por cada uno de los métodos, con un intervalo de confianza del 95%. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism 9.2.0, donde se empleó el Modelo de correlación de Pearson, considerando los valores del coeficiente r donde, aquellos valores menores a 0 tienen correlación negativa y valores superiores una correlación positiva, y todos aquellos iguales o cercanos a 0 no poseen ninguna correlación entre las variables. Además, se obtuvo el p value considerando un valor menor a 0,05 como estadísticamente significativo.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE DATOS

1. Información Clínica y Sociodemográfica de los Participantes

En este estudio participaron 48 pacientes de cuatro provincias del Sur del Ecuador, 72.91% pertenecientes a la provincia del Azuay, 16.67% de la provincia de Cañar, 8,33% de Morona Santiago y el 2.08% de El Oro; distribuidos en siete ciudades. Tabla N°2

Tabla N°2. Distribución de los participantes de las Provincias del Ecuador

Provincia	Ciudad	<i>n</i> = 48	%
Azuay	Cuenca	34	70.83
	Gualaceo	1	2.08
Cañar	Azogues	8	16.67
El Oro	Machala	1	2.08
Morona Santiago	Morona	2	4.17
	Limón Indanza	1	2.08
	Macas	1	2.08
TOTAL		48	100

Del total de los participantes, 18 eran mujeres y 30 eran varones (Figura1), donde la mediana de edad fue de 59 años. Veinte y dos de los pacientes eran de la tercera edad (>60 años) (Figura2). Los principales síntomas de estos fueron fiebre, disnea y tos, reportados en 56.25%, 41.67% y 27.08% de los 48 pacientes, respectivamente. Los síntomas menos frecuentes fueron insomnio, debilidad muscular y síncope en 2.08% de los pacientes.

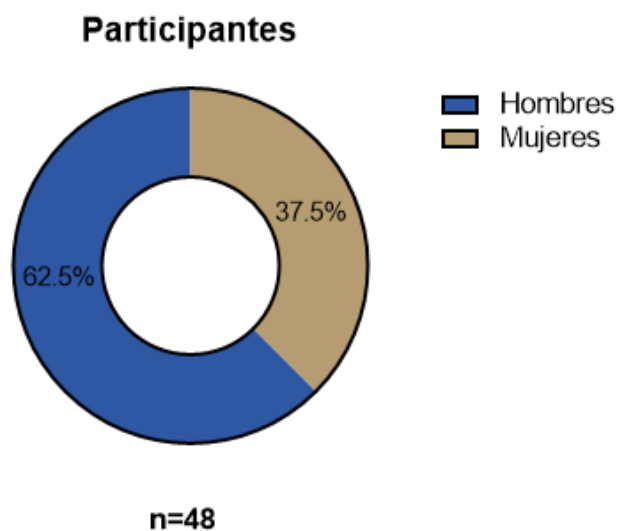


Figura 1. Distribución de género de los participantes en el estudio (n=48)

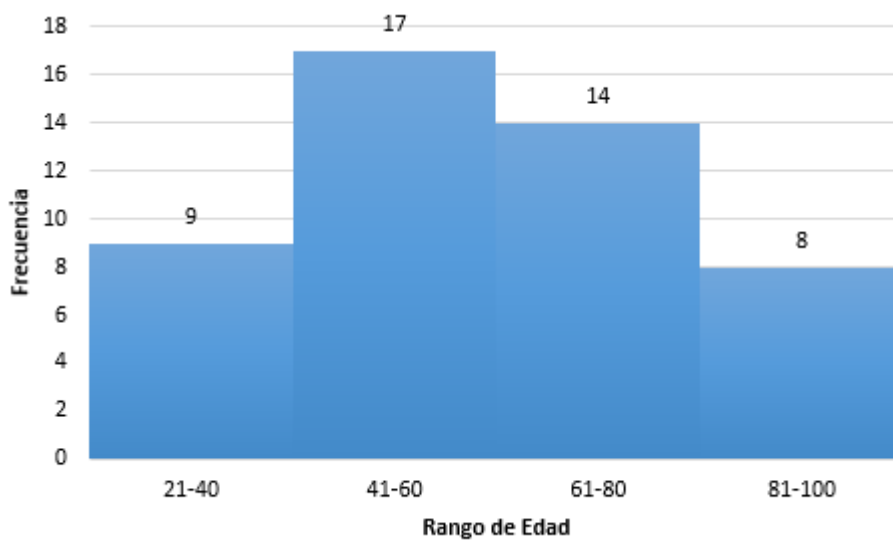


Figura 2. Frecuencia de edades de los participantes en el estudio (n=48)

Un dato adicional de los pacientes fue la ocupación o profesión, donde el 20.83% fueron amas de casa y el 18.75% se encontraban jubilados. Estos pacientes se encontraban en la ciudad de Cuenca, en busca de tratamiento de la COVID-19; el 20.83% (10) fallecieron.

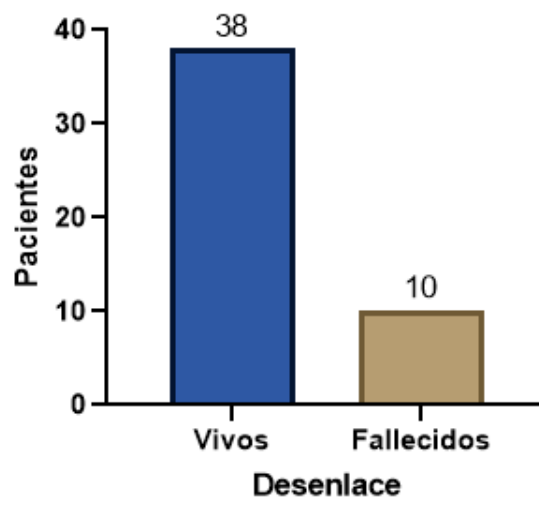


Figura 3. Desenlace de los pacientes.

Tabla N°3. Características clínicas de los pacientes

Síntomas	Valor <i>n</i> = 48	%
Fiebre	27	56.25
Disnea	20	41.67
Tos	13	27.08
Decaimiento	12	25.0
Diarrea	11	22.92
Dolor de Cuerpo	9	18.75
Dolor de Cabeza	8	16.67
Malestar	7	14.58
Hipogeusia	7	14.58
Dolor de Pecho	6	12.50
Congestión	6	12.50
Dolor de Garganta	5	10.42
Vomito	5	10.42
Anosmia	4	8.33
Nauseas	4	8.33
Hiporexia	3	6.25
Mareo	2	4.17
Insomnio	1	2.08
Debilidad muscular	1	2.08
Sincope	1	2.08

2. Resultados cualitativos y cuantitativos

Las muestras para la prueba de anticuerpos se tomaron en el mismo momento que los hisopados orofaríngeos. La información de la fecha de inicio de los síntomas se obtuvo de los pacientes, y el período de enfermedad varió de 1 a 12 días. De 48 muestras de sueros, se obtuvo que: en la prueba cualitativa, 56.25% (27) tuvieron aparición de anticuerpos IgM dentro de los primeros 12 días de síntomas indicando infección aguda, y el 54.17% (26) de éstos marcaron positividad en anticuerpos IgG. Por otro lado, el 43.75% (21) y 45.83% (22) marcaron negatividad en la producción de IgM e IgG, respectivamente. (Figura 4)

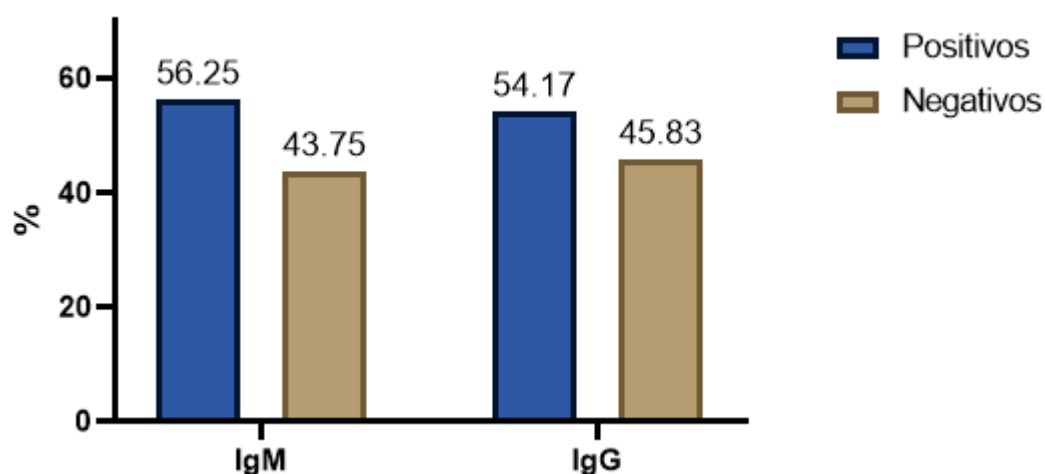


Figura 4. Distribución de resultados positivos y negativos de IgG e IgM según prueba cualitativa ($n = 48$).

En la prueba cuantitativa, la detección de positivos en anticuerpos IgM fue del 37.50% (18) y 62.50% (30) para IgG, encontrando negatividad en 52.08% (25) y 33.33% (16) para IgM e IgG, respectivamente. Por lo cual, los casos que se encontraban en un intervalo entre 0.9 y 1.1 UA/ml fue considerado como indeterminado. (Figura 5)

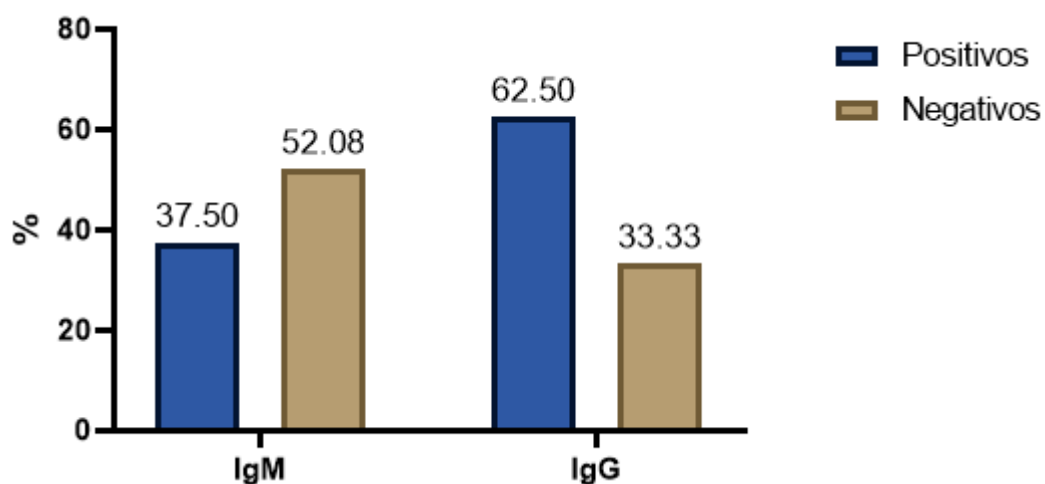


Figura 5. Distribución de resultados positivos y negativos de IgG e IgM según prueba cuantitativa. ($n = 48$).

3. Resultados de RT-qPCR

Es importante destacar que una de las muestras no fue analizada, ya que se derramó durante el transporte, por lo que se encontró, que, de 47 muestras orofaríngeas analizadas, 41 de los pacientes fueron positivos mediante RT-qPCR, con una tasa de detección del 87.23%, de las cuales el 53.19% (25) obtuvieron un C_t menor a 30 y fueron idóneas para el secuenciamiento. Sin embargo, sólo se lograron secuenciar siete muestras. (Figura 6)

Además, dentro del grupo evaluado, 25 fueron pacientes hospitalizados con criterio clínico de neumonía confirmados mediante RT-qPCR, de los cuales 13 pertenecían al grupo de personas en riesgo por ser de la tercera edad.

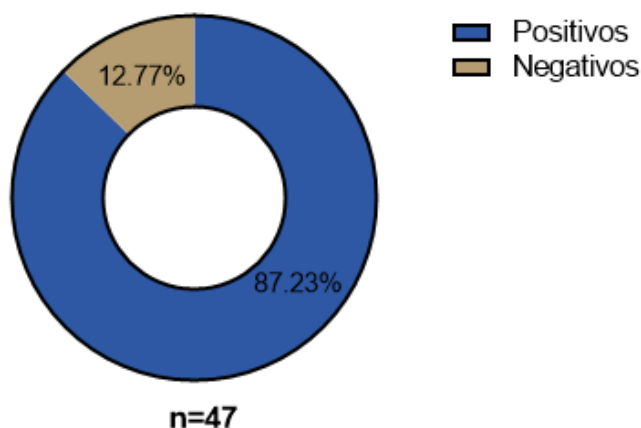


Figura 6. Detección de positivos mediante RT-qPCR

4. Comparación de las pruebas serológicas de anticuerpos y RT-qPCR

Se realizó una comparación de las pruebas de anticuerpos y la RT-qPCR, tomando en cuenta los pacientes positivos y negativos de las pruebas serológicas en IgM que es el primer anticuerpo en aparecer a partir de los primeros cuatro días de síntomas (Xiang et al., 2020) (Figura 7).

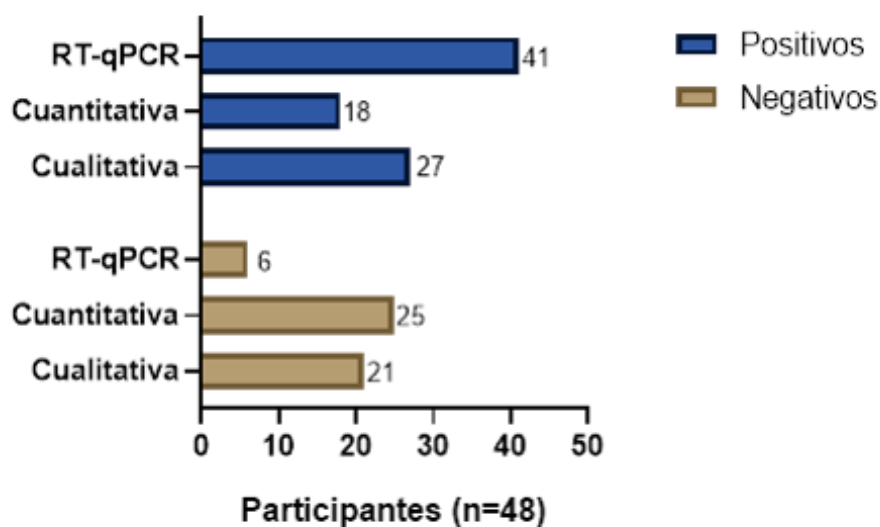


Figura 7. Comparación de resultados positivos y negativos según pruebas serológicas y RT-qPCR. ($p < 0.0005$)

De los resultados obtenidos la prueba cualitativa detectó 27 positivos y la cuantitativa sólo 18 para IgM. La diferencia entre las pruebas es de 9 pacientes, de los cuales cinco fueron considerados como indeterminados y cuatro como negativos en la forma cuantitativa, sin embargo los mismos muestras reflejaron positividad de manera cualitativa, determinando una sensibilidad de la prueba rápida de Healgen Scientific, frente a la prueba realizada mediante ELISA NovaLisa®.

Para evaluar la sensibilidad de detección de la infección con SARS-CoV-2 entre pruebas serológicas de anticuerpos cualitativas y cuantitativas con RT-qPCR, se comparó la positividad de las pruebas con el anticuerpo IgM, obteniendo que la prueba cualitativa identificó a 27 positivos (56.25%), la prueba cuantitativa a 18 positivos (37.50%) y la prueba molecular 43 (87.23%) con $p < 0.0005$ (Figura 8). Concluyendo que la RT-qPCR es la prueba más sensible para la detección de SARS-CoV-2, mientras que la prueba rápida o cualitativa tiene mayor capacidad de detección de anticuerpos frente a la prueba cuantitativa.

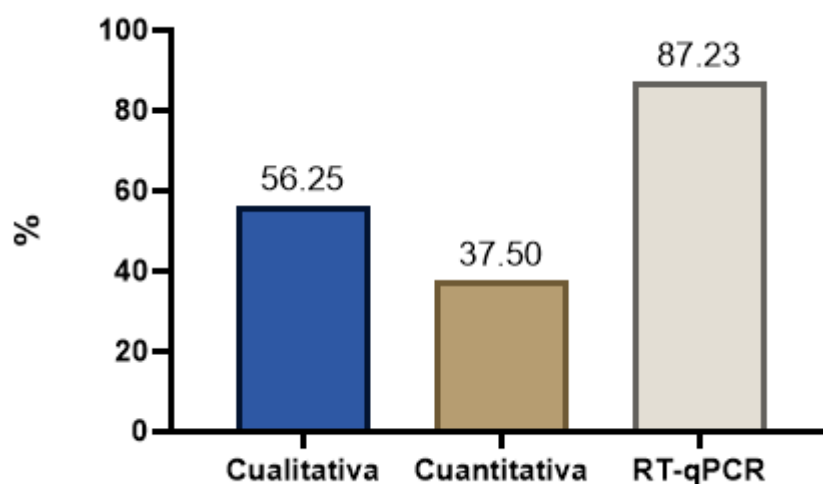


Figura 8. Comparación de resultados positivos según pruebas serológicas y RT-qPCR. ($p < 0.0005$)

Por otro lado, se realizó una comparación entre el Ct de la RT-qPCR y los resultados de IgM por la prueba cuantitativa para ver, si a menor Ct hay un aumento de cantidad de anticuerpos IgM, mediante el factor de correlación de Pearson obteniendo un valor de 0.047 y p value de 0.374, lo cual significa que no existe una dependencia entre los valores de la inmunoglobulina producidos por los pacientes y el Ct de la RT-qPCR (Figura 9).

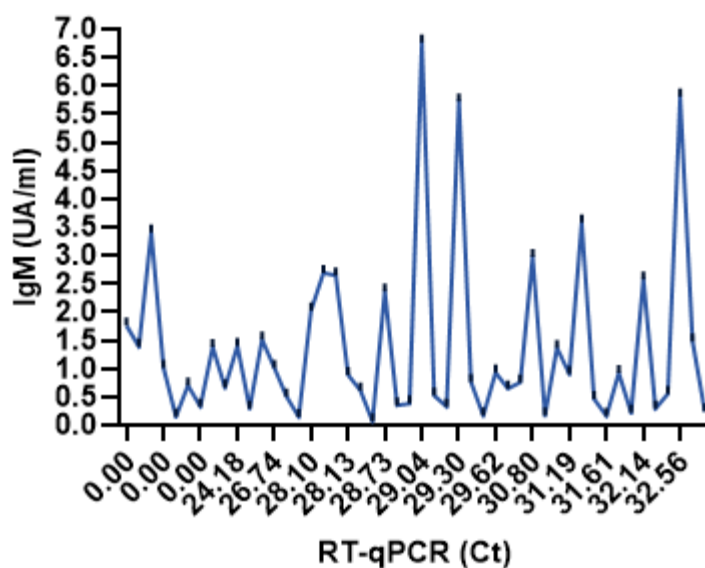


Figura 9. Comparación de IgM Cuantitativo y RT-qPCR.

Finalmente se realizó una comparación entre el Ct de la RT-qPCR y la edad de los pacientes obteniendo un valor de -0.1111 para el factor de correlación de Pearson y un p value de 0.489, lo cual significa que no existe una relación de la edad frente al Ct obtenido en la RT-qPCR (Figura 10), pues la edad, no es un factor para el contagio de SARS-CoV-2, ya que es importante la relación con otras variables como la clínica del paciente, estado de salud, enfermedades e incluso la asunción de riesgos.

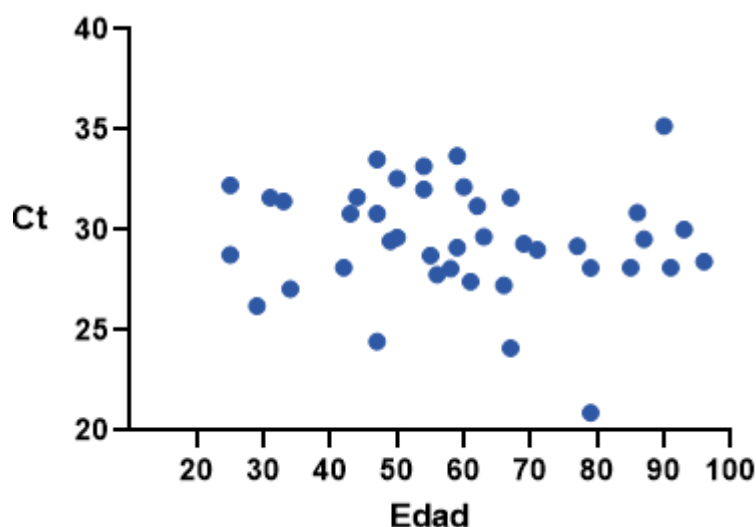


Figura 10. Relación entre la Edad y RT-qPCR.

5. Secuenciamiento y Comparación frente a la cepa de referencia de Wuhan

La secuenciación del SARS-CoV-2 se realizó en siete muestras pertenecientes a las ciudades de Cuenca (5), Azogues (1) y Machala (1). Los clados encontrados corresponden a 20D (EPI_ISL_539785), 20A (EPI_ISL_539786, EPI_ISL_539787, EPI_ISL_539788, EPI_ISL_1366725), y 20B (EPI_ISL_697787, EPI_ISL_1366722) (Tabla 4).

En la muestra EPI_ISL_539785 se encontraron un total de 11 mutaciones, encontrando también seis sustituciones de aminoácidos: N:R203K, N:G204R, ORF1a:T1246I, ORF1a:G3278S, ORF1b:P314L, S:D614G. En la muestra EPI_ISL_539786 se encontraron un total de 6 mutaciones, encontrando tres sustituciones de aminoácidos: ORF1a:K3353R, ORF1b:P314L, S:D614G. En la muestra EPI_ISL_539787 se encontraron un total de 7 mutaciones, encontrando tres sustituciones de aminoácidos: M:D3G, ORF1b:P314L, S:D614G. En la muestra EPI_ISL_539788 se encontraron un total de 8 mutaciones, encontrando cinco sustituciones de aminoácidos: ORF1a:F908L, ORF1a:S984G, ORF1b:P314L, ORF1b:M657I, S:D614G. En la muestra EPI_ISL_1366725 se encontraron un total de 20 mutaciones,

encontrando nueve sustituciones de aminoácidos: N:S194L, N:H300Y, ORF1a:I114T, ORF1a:L3606F, ORF1b:P314L, ORF1b:H604Y, ORF3a:Q57H, S:T29I, S:D614G. En la muestra EPI_ISL_697787 se encontraron un total de 9 mutaciones, encontrando seis sustituciones de aminoácidos: N:R203K, N:G204R, ORF1b:Y29H, ORF1b:P314L, ORF1b:T2592I, S:D614G. Finalmente, en la muestra EPI_ISL_1366722, se encontraron un total de 14 mutaciones, encontrando ocho sustituciones de aminoácidos: N:R203K, N:G204R, N:D377Y, ORF1a:L3606F, ORF1b:P314L, ORF1b:V2061L, S:D138Y, S:D614G. Es así que, en todas las muestras se encontró la sustitución D614G en la proteína de la espiga, variación que se ha convertido en la más abundante a nivel mundial. (Tabla 5)

En la determinación del linaje de las muestras, se obtuvo que, para EPI_ISL_539786 y EPI_ISL_539787 provienen del linaje B.1, que se encuentra relacionado a las primeras muestras obtenidos en el brote de Italia al inicio de la pandemia. Para EPI_ISL_539785, EPI_ISL_697787, EPI_ISL_1366725, EPI_ISL_1366722, se encontraron dentro del linaje B.1.1 comúnmente encontrado en Reino Unido, así como EPI_ISL_539788 asignado al linaje B.1.223 también proveniente del Reino Unido y España. (<https://clades.nextstrain.org/>)

Tabla N°4. Asignación de clado y linaje de siete muestras secuenciadas.

GISAID id	Clado	Linaje	Mutaciones
EPI_ISL_539785	20D	B.1.1.1	C3037T, C4002T, G10097A, C13536T, C14408T, A23403G, C23731T, G28881A, G28882A, G28883C
EPI_ISL_539786	20A	B.1	C3037T, A10323G, C14408T, A20268G, A23403G
EPI_ISL_539787	20A	B.1	C3037T, C3130T, T3793C, C14408T, A23403G, A26530G
EPI_ISL_539788	20A	B.1.223	T2987C, C3037T, A3215G, C14408T, G15438T, A20268G, A23403G
EPI_ISL_697787	20B	B.1.1	C3037T, T13552C, C14408T, C21242T, A23403G, G28881A, G28882A, G28883C
EPI_ISL_1366725	20A	B.1.111	T606C, C1060T, C3037T, A8479G, C10507T, G11083T, C14408T, C15277T, C18877T, C21648T, A23056G, A23403G, G25563T, G28079T, C28253T, C28854T, T28978A, C29171T, G29260A
EPI_ISL_1366722	20B	B.1.1	C2110T, C3037T, C8917T, G11083T, C14408T, G19648T, G21974T, A23403G, C27600T, G28881A, G28882A, G28883C, G29402T

Tabla N°5. Sustituciones de aminoácidos encontradas

GISAID id	Sustituciones de aminoácidos	Total
EPI_ISL_539785	N:R203K,N:G204R,ORF1a:T1246I,ORF1a:G3278S,ORF1b:P314L,S:D614G	6
EPI_ISL_539786	ORF1a:K3353R, ORF1b:P314L,S:D614G	3
EPI_ISL_539787	M:D3G,ORF1b:P314L,S:D614G	3
EPI_ISL_539788	ORF1a:F908L, ORF1a:S984G,ORF1b:P314L,ORF1b:M657I,S:D614G	5
EPI_ISL_697787	N:R203K,N:G204R,ORF1b:Y29H,ORF1b:P314L,ORF1b:T2592I,S:D614G	6
EPI_ISL_1366725	N:S194L,N:H300Y,ORF1a:I114T,ORF1a:L3606F,ORF1b:P314L,ORF1b:H604Y,ORF3a:Q57H,S:T29I,S:D614G	9
EPI_ISL_1366722	N:R203K,N:G204R,N:D377Y,ORF1a:L3606F,ORF1b:P314L,ORF1b:V2061L,S:D138Y,S:D614G	8

DISCUSION

Al inicio de la pandemia se desarrollaron pruebas serológicas con el propósito de evaluar la infección viral aguda y crítica de COVID-19, comprender la respuesta inmunitaria frente a la infección, estudiar una posible reacción cruzada con otros coronavirus, determinar la duración de la inmunidad, orientar el desarrollo de la enfermedad y generar datos epidemiológicos a nivel mundial. La necesidad de estudios seroepidemiológicos para conocer el grado de propagación del COVID-19 fue de gran auge, sin embargo, la prueba RT-qPCR fue declarada la prueba estándar para el diagnóstico de COVID-19. En nuestro país, el ingreso acelerado de pruebas rápidas serológicas implicó su uso como diagnóstico primario de la enfermedad, mientras que el alcance del uso de la prueba RT-qPCR fue inicialmente bajo debido a la dificultad de acceder a los reactivos, su costo alto y la capacitación del personal de salud.

En este estudio encontramos que las pruebas serológicas de detección de anticuerpos, rápidas y cuantitativas, no deben usarse para el diagnóstico temprano de COVID-19, pues la RT-qPCR obtuvo un alto rendimiento diagnóstico obteniendo que, de una cohorte de 48 pacientes, se lograron identificar 43 positivos, lo que corresponde a una detección del 87.23%, mientras que la prueba cualitativa detectó a 30 positivos y la prueba cuantitativa sólo detectó 18, lo que corresponden al 56.25% y 37.50%, respectivamente. Por lo que, la sensibilidad de la prueba rápida fue mayor, en comparación con el método ELISA, lo que puede explicarse a la alta sensibilidad reportada por el fabricante de la prueba rápida donde indica una sensibilidad de 100% para IgM y 96.7% para IgG, pues aseguran detectar los anticuerpos IgM de 3 a 5 días después de la incubación, pero al mismo tiempo, que los resultados positivos pueden deberse a una infección pasada o presente con cepas de coronavirus distintas del SARS-CoV-2, como los coronavirus HKU1, NL63, OC43 o 229E (<https://www.healgen.com/if-respiratory-covid-19>).

Estos datos son similares a los obtenidos por Daoud, McLeod & Stockman, donde encuentran una sensibilidad del 66,2% para IgM con el mismo kit de pruebas, sin ninguna reactividad cruzada con otro tipo de virus (Coronavirus 229 E, NL63, NL63 + RSV, 229 + RSV, metapneumovirus humano, parainfluenza, influenza A, influenza B, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis B, VPH, VIH.) o metabolitos (hemoglobina, bilirrubina conjugada, bilirrubina no conjugada, antibióticos: ciprofloxacina, cefotaxima, meropenem, imipenem, amikacina y anfotericina). Otros estudios publicados, indican que varios kits pueden tener una sensibilidad que varía del 9% al 88,6%, pero que depende de la duración de la enfermedad: sensibilidad de 40 a 86% (7 a 13 días después del inicio de los síntomas) y sensibilidad de 67 a 100% (14 a 20 días después del inicio de los síntomas) (La Marca et al., 2020), pues la seroconversión después de la exposición al SARS-CoV-2 puede suceder desde los 7 a 14 días después del inicio de la enfermedad, y mientras aumenta el tiempo de exposición, la tasa de detección es mayor para las pruebas serológicas y menor para las pruebas moleculares (Wang P,2020).

En cuanto a la prueba cuantitativa mediante el método de ELISA, se demostró que dentro de los primeros días de síntomas hay una baja sensibilidad (37.50%) frente a las pruebas rápidas y RT-qPCR, acorde a lo reportado por el fabricante NovaTec Inmunodiagnostica, que detecta los anticuerpos frente a la proteína N indicando una sensibilidad diagnóstica del 30% dentro de los 12 días de los síntomas (https://www.rafer.es/sites/default/files/kit_elisa_sars-cov-2_covid-19_igm_.pdf). Esto es paralelo a otros estudios que utilizan la misma marca, como el grupo de *Catry y col.* en Bélgica, que encuentran una detección del 33.33% en pacientes leves a moderados; o en Francia, donde *Michel y col.*, reportan una sensibilidad disminuida del 19.4%. Pudiendo deberse a la proteína a la que está dirigida la prueba, ya que otras marcas

umentan su detección cuando están dirigidas a la proteína S. (Tré-Hardy et al., 2021) (Yassine et al., 2021)

Por lo tanto, las pruebas serológicas se pueden usar en combinación con pruebas moleculares para evitar falsos negativos, ya que la RT-qPCR es la prueba con mayor sensibilidad y especificidad en la detección temprana de SARS-CoV2, pues se conoce que detecta desde 10 copias por reacción (D'Cruz et al., 2020). En este caso, la detección fue del 87.23% (n=43), pero varios aspectos pudieron interferir en los resultados, por ejemplo, las siete muestras negativas por RT-qPCR pudieron deberse a que los participantes ya pasaron por el proceso de infección y que no se encontraban dentro de los 12 días del inicio de los síntomas, o que, al contrario, se encontraban dentro del período de ventana donde el virus se encontraba en la etapa de incubación y en el cual no pudo ser detectado por la prueba RT-qPCR. Además se pueden presentar mutaciones en las regiones diana a la cual están dirigidos los primers y la sonda; razón por la que el secuenciamiento formó parte de este estudio, ya que es importante la identificación de las cepas circulantes en las provincias de Azuay, Cañar, El Oro y Morona Santiago, donde se secuenciaron siete muestras pertenecientes a Azuay(5), Cañar(1) y El Oro(1), a causa de que las muestras de Morona Santiago no cumplían con el criterio de obtener un valor de C_t menor a 30. Es así, que se identificó el linaje B y el sublinaje B.1, los cuales son los más prevalentes en todo el mundo. (Cella, 2021), donde B.1.1.1 y B.1.223 se han reportado hasta la fecha prioritariamente en Reino Unido con una prevalencia del 58% y 72% respectivamente, además se identificó B.1.111 proveniente de Estados Unidos. En todas las muestras se encontraron varias sustituciones de aminoácidos, en comparación con la cepa de referencia de Wuhan, encontrando que en el 100% de éstas se hizo presente la mutación D614G en la proteína S. Donde, estudios recientes han demostrado que la sustitución D614G suprime una interacción de enlace de hidrógeno del trímero S, que cambia alostéricamente el RBD a

una conformación ascendente, lo que promueve la unión con el receptor ACE2, conduciendo a una infectividad estable que aumenta su transmisibilidad, por lo que aumentaría la entrada viral en las células y contribuiría a títulos de virus más altos después de múltiples ciclos de infección. (Hoffmann, Kleine-Weber & Pohlmann, 2020) (Plante et al., 2021).

Por lo que, se sugiere estudios donde se incluya un número mayor de muestras para obtener más información de las cepas circulantes en las provincias del Ecuador, además tomar en cuenta la cantidad de kits de prueba rápidas o cuantitativas circulantes en el país y medir su límite de detección para comprobar su uso en el monitoreo de los pacientes. También medir la persistencia de anticuerpos durante un período de tiempo prolongado con diferentes poblaciones clínicas, ya que, se desconoce a ciencia cierta si los anticuerpos indican protección contra la enfermedad o actúan como neutralizantes, por lo que al finalizar la pandemia se podría conocer esa información y contar con ensayos donde también se estudie la inmunidad celular, importante para la inmunidad a largo plazo.

CONCLUSIONES

La prueba molecular RT-qPCR sigue siendo el estándar de oro para el diagnóstico de COVID-19 en muestras orofaríngeas, nasofaríngeas y lavados broncoalveolares. Sin embargo, según el tipo de muestra, el estadio de la enfermedad, y la toma luego del inicio de los síntomas; la sensibilidad de la prueba puede afectarse. La RT-qPCR resultó ser la prueba más sensible y apta para la detección de SARS-CoV-2, pues se detectaron el 87.23% de positivos, a comparación de la prueba cualitativa y cuantitativa donde hubo una positividad del 56.25% y 37.50%, de forma estadísticamente significativa, lo cual rechaza la hipótesis planteada. Concluyendo que las pruebas serológicas de detección de anticuerpos, rápidas y cuantitativas, son métodos aptos para la detección de anticuerpos de tipo IgG/IgM contra SARS-CoV-2, pero no son útiles para el diagnóstico de Covid-19-

Es recomendable una combinación de pruebas diagnósticas clínicas: moleculares y serológicas para lograr una sensibilidad y especificidad adecuadas, pues la capacidad de combinar la RT-qPCR con pruebas de anticuerpos y evitar falsos negativos, apoya la vigilancia de la salud pública e informa datos clínicos relevantes en la dinámica de COVID-19. Además, el uso del secuenciamiento es importante para rastrear la transmisión del virus, detectar mutaciones y realizar seguimiento epidemiológico en el Ecuador.

Se espera que a futuro haya un aumento en la sensibilidad y especificidad de kits rápidos y que el uso de estas pruebas, sean correctamente utilizadas e interpretadas por parte del personal de salud, para el manejo adecuado de los pacientes.

REFERENCIAS

- Bahrami, A., & Ferns, G. A. (2020). Genetic and pathogenic characterization of SARS-CoV-2: a review. *Future Virology*, 10.2217/fvl-2020-0129. <https://doi.org/10.2217/fvl-2020-0129>
- Bull, R.A., Adikari, T.N., Ferguson, J.M. et al. Analytical validity of nanopore sequencing for rapid SARS-CoV-2 genome analysis. *Nat Commun* 11, 6272 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20075-6>
- Catry, E., Jacqmin, H., Dodemont, M., Saad Albichr, I., Lardinois, B., de Fays, B., Delaere, B., Closset, M., Laurent, T., Denis, O., Galanti, L., Mullier, F., & Huang, T. D. (2021). Analytical and clinical evaluation of four commercial SARS-CoV-2 serological immunoassays in hospitalized patients and ambulatory individuals. *Journal of virological methods*, 289, 114060. <https://doi.org/10.1016/j.jviro.2020.114060>
- Cella E, Benedetti F, Fabris S, Borsetti A, Pezzuto A, Ciotti M, Pascarella S, Ceccarelli G, Zella D, Ciccozzi M, Giovanetti M. (2021). SARS-CoV-2 Lineages and Sub-Lineages Circulating Worldwide: A Dynamic Overview. *Chemotherapy* 2021;66:3-7. doi: 10.1159/000515340
- D'Cruz, R. J., Currier, A. W., & Sampson, V. B. (2020). Laboratory Testing Methods for Novel Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2 (SARS-CoV-2). *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 468. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00468>
- Daoud, Z., McLeod, J., & Stockman, D. L. (2020). Higher Sensitivity Provided by the Combination of Two Lateral Flow Immunoassay Tests for the Detection of COVID-19 Immunoglobulins. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 479. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00479>

- Deeks J, Dinnes J, Takwoingi Y, Davenport C, Spijker R, Taylor-Phillips S, Adriano A, Beese S, Dretzke J, Ferrante di Ruffano L, Harris IM, Price MJ, Dittrich S, Emperador D, Hooft L, Leeflang MMG, Van den Bruel A (2020). Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013652>
- Dhama, K., Khan, S., Tiwari, R., Sircar, S., Bhat, S., Malik, Y. S., Singh, K. P., Chaicumpa, W., Bonilla-Aldana, D. K., & Rodriguez-Morales, A. J. (2020). Coronavirus Disease 2019-COVID-19. *Clinical microbiology reviews*, 33(4), e00028-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00028-20>
- Dömling, A., & Gao, L. (2020). Chemistry and Biology of SARS-CoV-2. *Chem*, 6(6), 1283–1295. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2020.04.023>
- Du, Chengao. (2021) The power of using novel nanopore sequencing technology for diagnosis, genomic and pathological studies of covid-19. E3S Web of Conferences. 2021;271. <https://www.proquest.com/conference-papers-proceedings/power-using-novel-nanopore-sequencing-technology/docview/2577683938/se-2>
doi: <http://dx.doi.org/10.1051/e3sconf/202127104024>.
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H. & Pohlmann, S. (2020) A multibasic cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells. *Mol. Cell* 181, 779–784 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.022>
- Fei Xiang, Xiaorong Wang, Xinliang He, Zhenghong Peng, Bohan Yang, Jianchu Zhang, Qiong Zhou, Hong Ye, Yanling Ma, Hui Li, Xiaoshan Wei, Pengcheng Cai, Wan-Li Ma. (2020) Antibody Detection and Dynamic Characteristics in Patients With Coronavirus Disease 2019. *Clinical Infectious Diseases*. Volume 71, Issue 8, 15 October 2020, Pages 1930–1934. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa461>

- Florez, J., Gil, H., García, D., González, R., Valenzuela, A., Ciuffreda, L., Flores, C. (2020). *Sensitivity of different RT-qPCR solutions for SARS-CoV-2 detection. International Journal of Infectious Diseases.* Vol 99, 190-192 <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.07.058>
- García, I. & Ory, F. (2017). Diagnóstico rápido en serología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* Vol 35, Issue 4. Pages 246-254. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.12.013>
- Kevadiya BD, Machhi J, Herskovitz J, Oleynikov MD, Blomberg WR, Bajwa N, Soni D, Das S, Hasan M, Patel M, Senan AM, Gorantla S, McMillan J, Edagwa B, Eisenberg R, Gurumurthy CB, Reid SPM, Punyadeera C, Chang L, Gendelman HE. (2021). Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. *Nature reviews. Microbiology.* 2021 May;20(5):593-605. doi: 10.1038/s41563-020-00906-z. Epub 2021 Feb 15. PMID: 33589798
- Kutti-Sridharan, G., Vegunta, R., Vegunta, R., Mohan, B. P., & Rokkam, V. (2020). SARS-CoV2 in Different Body Fluids, Risks of Transmission, and Preventing COVID-19: A Comprehensive Evidence-Based Review. *International journal of preventive medicine*, 11, 97. https://doi.org/10.4103/ijpvm.IJPVM_255_20
- La Marca, A., Capuzzo, M., Paglia, T., Roli, L., Trenti, T., & Nelson, S. M. (2020). Testing for SARS-CoV-2 (COVID-19): a systematic review and clinical guide to molecular and serological in-vitro diagnostic assays. *Reproductive biomedicine online*, 41(3), 483–499. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.06.001>
- Lisboa Bastos M, Tavaziva G, Abidi S K, Campbell J R, Haraoui L, Johnston J C et al. (2020). Diagnostic accuracy of serological tests for covid-19: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2020; 370 :m2516. <https://doi.org/10.1136/bmj.m2516>

- Mercado M, Malagón-Rojas J, Delgado G, Rubio VV, Muñoz Galindo L, Parra Barrera EL et al. (2020) Evaluation of nine serological rapid tests for the detection of SARS-CoV-2. *Rev Panam Salud Publica.* 2020;44:e149 <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.149>
- Michel, M., Bouam, A., Edouard, S., Fenollar, F., Di Pinto, F., Mège, J. L., Drancourt, M., & Vitte, J. (2020). Evaluating ELISA, Immunofluorescence, and Lateral Flow Assay for SARS-CoV-2 Serologic Assays. *Frontiers in microbiology*, 11, 597529. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.597529>
- Mohamadian, M., Chiti, H., Shoghli, A., Biglari, S., Parsamanesh, N., & Esmaeilzadeh, A. (2021). COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis. *The journal of gene medicine*, 23(2), e3303. <https://doi.org/10.1002/jgm.3303>
- Perrotta, F., Matera, M. G., Cazzola, M., & Bianco, A. (2020). Severe respiratory SARS-CoV2 infection: Does ACE2 receptor matter?. *Respiratory medicine*, 168, 105996. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2020.105996>
- Plante, J.A., Liu, Y., Liu, J. et al. (2021) Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness. *Nature* 592, 116–121. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2895-3>
- Romano-Bertrand, S., Aho-Glele, L. S., Grandbastien, B., Gehanno, J. F., & Lepelletier, D. (2020). Sustainability of SARS-CoV-2 in aerosols: should we worry about airborne transmission?. *The Journal of hospital infection*, 105(4), 601–603. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.06.018>
- Santaella-Tenorio J. (2020). SARS-CoV-2 diagnostic testing alternatives for Latin America. *Colombia medica (Cali, Colombia)*, 51(2), e4272. <https://doi.org/10.25100/cm.v51i2.4272>

- Shang, J., Wan, Y., Luo, C., Ye, G., Geng, Q., Auerbach, A., & Li, F. (2020). Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *PNAS*. May 26, 2020 117 (21) 11727-11734. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003138117>
- Sharma, R., Agarwal, M., Gupta, M., Somendra, S., and Saxena, S. K. (2020). Clinical characteristics and differential clinical diagnosis of novel coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Coronavirus Dis.* 2019 (COVID-19) 2020, 55–70. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4814-7_6
- Tré-Hardy, M., Wilmet, A., Beukinga, I., Favresse, J., Dogné, J. M., Douxfils, J., & Blairon, L. (2021). Analytical and clinical validation of an ELISA for specific SARS-CoV-2 IgG, IgA, and IgM antibodies. *Journal of medical virology*, 93(2), 803–811. <https://doi.org/10.1002/jmv.26303>
- Trevethan, R. (2017). Sensitivity, Specificity, and Predictive Values: Foundations, Pliabilities, and Pitfalls in Research and Practice. *Frontiers in Public Health*. Vol 5, 2296-2565. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00307>
- Vandenberg, O., Martiny, D., Rochas, O., van Belkum, A., & Kozlakidis, Z. (2021). Considerations for diagnostic COVID-19 tests. *Nature reviews. Microbiology*, 19(3), 171–183. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00461-z>
- Vogels, C.B.F., Brito, A.F., Wyllie, A.L. et al. Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR primer-probe sets. *Nature reviews. Microbiology*, 5, 1299–1305 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0761-6>
- Wang Mei-Yue, Zhao Rong, Gao Li-Juan, Gao Xue-Fei, Wang De-Ping, Cao Ji-Min. (2020). SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology Vol 10*. [https://www.frontiersin.org/articWang P. \(2020\)le/10.3389/fcimb.2020.587269](https://www.frontiersin.org/articWang P. (2020)le/10.3389/fcimb.2020.587269)

- Wang Ming, Fu, A., Hu, B., Tong, Y., Liu, R., Liu, Z., Gu, J., Xiang, B., Liu, J., Jiang, W., Shen, G., Zhao, W., Men, D., Deng, Z., Yu, L., Wei, W., Li, Y., Liu, T. (2020). Nanopore Targeted Sequencing for the Accurate and Comprehensive Detection of SARS-CoV-2 and Other Respiratory Viruses. *Small* 2020, 16, 2002169. <https://doi.org/10.1002/sml.202002169>
- Wang, Pei. (2020). Combination of serological total antibody and RT-PCR test for detection of SARS-COV-2 infections. *Journal of virological methods*, 283, 113919. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113919>
- Yassine, H. M., Al-Jighefee, H., Al-Sadeq, D. W., Dargham, S. R., Younes, S. N., Shurrab, F., Marei, R. M., Hssain, A. A., Taleb, S., Alhussain, H., Al-Nesf, M. A., Al-Khal, A., Qotba, H., Althani, A. A., Tang, P., Abu-Raddad, L. J., & Nasrallah, G. K. (2021). Performance evaluation of five ELISA kits for detecting anti-SARS-COV-2 IgG antibodies. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 102, 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.10.042>

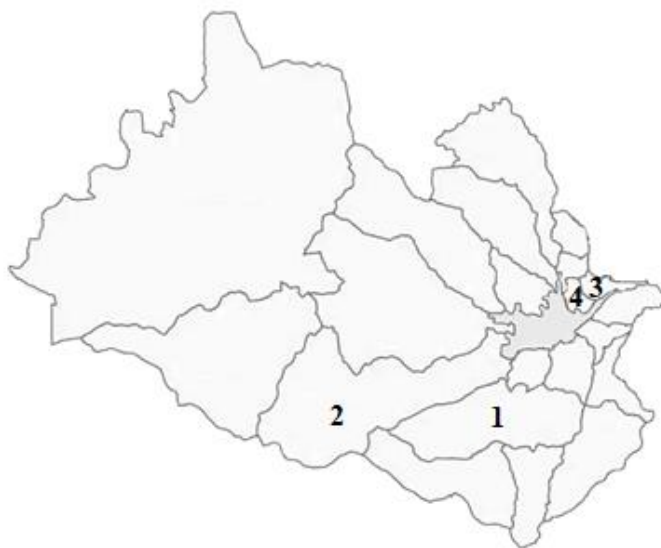
INDICE DE ANEXOS

ANEXO A: Mapas de los puntos de recolección de las muestras.....	50
Anexo A1. Mapa de la ciudad de Cuenca que muestra los lugares donde se recolectaron las muestras de sangre e hisopados orofaríngeos. Los números corresponden a las parroquias rurales de Tarqui(1), Baños(2), Llacao(3) y Ricaurte(4).....	50
Anexo A2. Mapa de la ciudad de Cuenca que muestra los lugares donde se recolectaron las muestras de sangre e hisopados orofaríngeos. Los números corresponden a las parroquias urbanas de Huaynacapac(1), Totoracocha(2), San Sebastian(3), Bellavista(4), Yanuncay(5) y El Vecino(6).....	50
Anexo A3. Mapa de la ciudad de Gualaceo que muestra el lugar donde se recolectaron las muestras de sangre e hisopados orofaríngeos.....	51
Anexo A4. Mapa de la provincia de Cañar que muestra la ciudad de Azogues (1) donde se recolectaron las muestras de sangre e hisopados orofaríngeos.....	51
Anexo A5. Mapa de la provincia de El Oro que muestra el lugar donde se recolectaron las muestras de sangre e hisopados orofaríngeos, en la ciudad de Machala (1)	52
Anexo A6. Mapa de la provincia de Morona Santiago que muestra los lugares donde se recolectaron las muestras de sangre e hisopados orofaríngeos, Los números corresponden a las ciudades de Limón Indanza (1) y Morona (2)	52
Anexo A7. Coordenadas correspondientes a los lugares donde se tomaron las muestras.....	53
 ANEXO B: Socio demografía y datos clínicos de los participantes.....	 56
Anexo B1. Edad de los participantes del estudio.....	56
Anexo B2. Asignación de códigos para las muestras, según provincia o ciudad.....	56
Anexo B3. Resultados de Análisis cuantitativos, cualitativos y RT-qPCR.....	57
Anexo B4. Sustituciones de aminoácidos encontradas en siete muestras secuenciadas.....	59

ANEXOS

ANEXO A: Mapas de los puntos de recolección de las muestras

Anexo A1. Mapa de la ciudad de Cuenca que muestra los lugares donde se recolectaron las muestras de sangre e hisopados orofaríngeos. Los números corresponden a las parroquias rurales de Tarqui(1), Baños(2), Llacao(3) y Ricaurte(4).



Anexo A2. Mapa de la ciudad de Cuenca que muestra los lugares donde se recolectaron las muestras de sangre e hisopados orofaríngeos. Los números corresponden a las parroquias urbanas de Huaynacapac(1), Totoracocha(2), San Sebastian(3), Bellavista(4), Yanuncay(5) y El Vecino(6).



Anexo A3. Mapa de la ciudad de Gualaceo que muestra el lugar donde se recolectaron las muestras de sangre e hisopados orofaríngeos.



Anexo A4. Mapa de la provincia de Cañar que muestra la ciudad de Azogues (1) donde se recolectaron las muestras de sangre e hisopados orofaríngeos.



Anexo A5. Mapa de la provincia de El Oro que muestra el lugar donde se recolectaron las muestras de sangre e hisopados orofaríngeos, en la ciudad de Machala (1).



Anexo A6. Mapa de la provincia de Morona Santiago que muestra los lugares donde se recolectaron las muestras de sangre e hisopados orofaríngeos, Los números corresponden a las ciudades de Limón Indanza (1) y Morona (2).



Anexo A7. Coordenadas correspondientes a los lugares donde se tomaron las muestras

Código	Provincia - Ciudad	Coordenadas
C01	Azuay - Cuenca	2°53'28.6"S 78°59'45.1"W
C02	Azuay - Cuenca	2°58'11.7"S 79°02'08.5"W
C03	Azuay - Cuenca	2°58'11.7"S 79°02'08.5"W
C04	Azuay - Cuenca	2°58'11.7"S 79°02'08.5"W
C05	Azuay - Cuenca	2°58'11.7"S 79°02'08.5"W
C06	Azuay - Cuenca	2°53'46.1"S 78°59'11.6"W
C07	Azuay - Cuenca	2°54'49.5"S 79°02'10.6"W
C08	Azuay - Cuenca	2°54'49.5"S 79°02'10.6"W
C09	Azuay - Cuenca	2°53'30.7"S 79°00'54.8"W
C10	Azuay - Cuenca	2°51'21.0"S 78°54'34.2"W
A11	Cañar - Azogues	2°44'06.0"S 78°50'53.1"W
A12	Cañar - Azogues	2°44'06.0"S 78°50'53.1"W
A13	Cañar - Azogues	2°44'06.0"S 78°50'53.1"W
A14	Cañar - Azogues	2°44'06.0"S 78°50'53.1"W
A15	Cañar - Azogues	2°44'06.0"S 78°50'53.1"W
A16	Cañar - Azogues	2°44'06.0"S 78°50'53.1"W
A17	Cañar - Azogues	2°44'06.0"S 78°50'53.1"W

A18	Cañar - Azogues	2°44'06.0"S 78°50'53.1"W
C19	Azuay - Cuenca	2°54'13.5"S 79°03'03.6"W
C20	Azuay - Cuenca	2°54'13.5"S 79°03'03.6"W
C21	Azuay - Cuenca	2°54'13.5"S 79°03'03.6"W
C22	Azuay - Cuenca	2°54'52.8"S 79°00'12.9"W
C23	Azuay - Cuenca	2°54'52.8"S 79°00'12.9"W
C24	Azuay - Cuenca	2°54'52.8"S 79°00'12.9"W
C25	Azuay - Cuenca	2°54'52.8"S 79°00'12.9"W
C26	Azuay - Cuenca	2°54'52.8"S 79°00'12.9"W
M27	Morona Santiago - Morona	2°54'23.8"S 79°01'03.5"W
M28	Morona Santiago- Limón Indanza	2°57'54.9"S 78°25'46.2"W
C29	Azuay - Cuenca	2°54'20.9"S 79°01'54.4"W
C30	Azuay - Cuenca	2°52'55.2"S 79°01'27.2"W
C31	Azuay - Cuenca	2°52'53.7"S 79°00'25.6"W
C32	Azuay - Cuenca	2°54'42.9"S 79°01'16.0"W
C33	Azuay - Cuenca	2°53'03.8"S 78°59'52.2"W
C34	Azuay - Cuenca	2°53'43.2"S 79°00'20.2"W
C35	Azuay - Cuenca	2°54'39.0"S 78°59'43.6"W
G36	Azuay - Gualaceo	2°53'22.4"S 78°46'34.5"W

C37	Azuay - Cuenca	2°53'07.2"S 79°03'03.7"W
C38	Azuay - Cuenca	2°53'19.3"S 79°01'58.2"W
C39	Azuay - Cuenca	2°51'22.8"S 78°58'04.0"W
C40	Azuay - Cuenca	2°54'39.0"S 79°01'20.4"W
O41	El Oro - Machala	3°14'45.3"S 79°57'35.4"W
C42	Azuay - Cuenca	2°52'56.7"S 78°59'44.3"W
M43	Morona Santiago - Morona	2°53'43.0"S 79°01'58.2"W
M44	Morona Santiago - Macas	2°19'18.3"S 78°08'04.0"W
A45	Cañar - Azogues	2°44'50.4"S 78°51'19.7"W
C46	Azuay - Cuenca	2°53'23.4"S 79°02'34.9"W
A47	Azuay - Cuenca	2°44'45.1"S 78°50'53.0"W
C48	Azuay - Cuenca	2°55'00.6"S 79°04'01.2"W
A49	Cañar - Azogues	2°33'11.1"S 78°56'13.0"W
C50	Azuay - Cuenca	2°53'39.0"S 79°00'23.0"W
C51	Azuay - Cuenca	2°52'06.2"S 79°04'19.6"W

ANEXO B: Sociodemografía y datos clínicos de los participantes

Anexo B1. Edad de los participantes del estudio

Edad	Participantes
	n = 51
0-20	3
20-40	9
40-60	17
60-80	14
80-100	38

Anexo B2. Asignación de códigos para las muestras, según provincia o ciudad

Código:	Ciudad o Provincia
C	Cuenca
A	Azogues
M	Morona Santiago
G	Gualaceo
O	El Oro

Anexo B3. Resultados de Análisis cuantitativos, cualitativos y RT-qPCR.

(Para la prueba cuantitativa, valores mayores a 1.1 UA/ml= positivo, entre 0.9 y 1.1 UA/ml= indeterminado, y menor a 0.9 UA/ml= negativo. Para la RT-qPCR, valores de C_t menor o igual a 30= positivo y aptas para secuenciamiento; valores de C_t mayor a 30 =positivo, no apta para secuenciamiento.)

No= Muestras que no amplificaron en la RT-qPCR

Código	IgG (UA/ml)	IgM (UA/ml)	IgG	IgM	C_t RT-qPCR
C01	0.25	0.29	Negativo	Negativo	33.57
C02	3.82	6.77	Positivo	Positivo	33.17
C03	3.54	2.69	Positivo	Positivo	27.77
C04	3.47	1.009	Positivo	Positivo	27.42
C05	0.44	0.51	Negativo	Negativo	27.05
C06	1.06	1.402	Negativo	Positivo	26.21
C07	3.04	1.509	Positivo	Positivo	27.27
C08	0.64	1.76	Negativo	Positivo	No
C09	0.34	0.3	Negativo	Negativo	24.44
C10	3.12	2.36	positivo	positivo	28.73
A11	3.66	1.39	positivo	positivo	No
A12	2.73	0.38	positivo	Negativo	29.01
A13	3.16	2.65	positivo	positivo	28.13
A14	3.26	3.4	positivo	positivo	No
A15	1.26	0.35	Negativo	Negativo	28.76
A16	1.89	0.46	Positivo	Negativo	No
A17	3.45	1.01	Positivo	Positivo	No
A18	2.88	0.61	Positivo	Negativo	28.16
C19	0.97	0.46	Negativo	Negativo	31.6
C20	1.34	0.26	Negativo	Negativo	32.73

C21	2.43	3.58	Positivo	Positivo	31.42
C22	1.63	0.24	Negativo	Negativo	35.17
C23	0.55	2.97	Negativo	Positivo	30.8
C24	2.57	2.58	Positivo	Positivo	32.14
C25	0.36	0.55	Negativo	Negativo	32.23
C26	0.59	0.92	Negativo	Positivo	31.62
M27	3.206	0.520	Positivo	Negativo	29.12
M28	1.172	0.327	Negativo	Negativo	29.19
C29	0.276	0.150	Negativo	Negativo	No
C30	0.213	0.758	Negativo	Positivo	30.03
C31	19.175	0.889	positivo	Positivo	28.13
C32	4.143	5.806	positivo	positivo	32.56
C33	1.849	0.644	positivo	positivo	29.66
C34	1.914	0.612	positivo	positivo	28.13
C35	0.253	0.067	Negativo	Negativo	28.42
G36	1.226	0.704	Negativo	positivo	No
C37	1.826	0.142	positivo	Negativo	28.07
C38	2.118	0.160	positivo	Negativo	31.61
C39	0.373	0.169	Negativo	Negativo	29.54
C40	2.210	0.762	positivo	positivo	29.44
O41	3.369	0.660	positivo	positivo	24.1
C42	0.453	0.221	Negativo	Negativo	32.02
M43	0.189	0.326	Negativo	Negativo	Derramada
M44	0.088	0.174	Negativo	Negativo	30.8
A45	0.381	2.031	Negativo	positivo	28.1
C46	4.135	0.902	positivo	positivo	31.19

A47	0.612	5.726	Negativo	positivo	29.3
C48	3.324	1.379	positivo	positivo	20.9
A49	2.526	1.480	positivo	positivo	33.69
C50	2.619	1.363	positivo	positivo	30.85
C51	1.813	0.93	positivo	positivo	29.62

Anexo B4. Sustituciones de aminoácidos encontradas en siete muestras secuenciadas.

ID	GISAID id	Sustituciones de aminoácidos	Total
C03	EPI_ISL_539785	N:R203K,N:G204R,ORF1a:T1246I,ORF1a:G3278S,ORF1b:P314L,S:D614G	6
C04	EPI_ISL_539786	ORF1a:K3353R,ORF1b:P314L,S:D614G	3
C05	EPI_ISL_539787	M:D3G,ORF1b:P314L,S:D614G	3
C07	EPI_ISL_539788	ORF1a:F908L,ORF1a:S984G,ORF1b:P314L,ORF1b:M657I,S:D614G	5
A15	EPI_ISL_697787	N:R203K,N:G204R,ORF1b:Y29H,ORF1b:P314L,ORF1b:T2592I,S:D614G	6
C30	EPI_ISL_1366725	N:S194L,N:H300Y,ORF1a:I114T,ORF1a:L3606F,ORF1b:P314L,ORF1b:H604Y,ORF3a:Q57H,S:T29I,S:D614G	9
O41	EPI_ISL_1366722	N:R203K,N:G204R,N:D377Y,ORF1a:L3606F,ORF1b:P314L,ORF1b:V2061L,S:D138Y,S:D614G	8