

## ARTICULO ORIGINAL / ORIGINAL ARTICLE

**Desempeño diagnóstico de prueba serológica, respuesta de anticuerpos y correlación con características clínicas en trabajadores de salud con COVID-19 del Hospital General de Luque**  
**Diagnostic performance of serological test, antibody response and correlation with characteristics clinics in health workers with COVID-19 of the General Hospital of Luque**

Pérez Bejarano Domingo<sup>1</sup> , López Estela<sup>1</sup>, Duarte Javier<sup>1</sup>, Grijalba Ruth<sup>1</sup>, González Andrea<sup>1</sup>, Cuenca Elisa<sup>1</sup>, Enciso Ana<sup>1</sup>, Ríos Evelia<sup>1</sup>, Galeano Mariana<sup>1</sup>, Sánchez Susana<sup>2</sup>, González Laura<sup>2</sup>, Arbo Guillermo<sup>3</sup>, Gómez Luis<sup>4</sup>, Echeverría Patricia<sup>2</sup>, Giménez Edgar<sup>5</sup>, Rolón Ricardo<sup>6</sup>, Mendoza Laura<sup>2</sup>, Ríos-González Carlos Miguel<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Hospital General de Luque, Central, Luque, Paraguay

<sup>2</sup>Salud y Nutrición Paraguay (SANUPAR), Central, Fernando de la Mora, Paraguay.

<sup>3</sup>Sanatorio Santa Julia, Asunción, Paraguay

<sup>4</sup>Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y del Ambiente "Juan Max Boetner", Asunción, Paraguay.

<sup>5</sup>Investigación para el Desarrollo, Asunción, Paraguay.

<sup>6</sup>Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Instituto Nacional de Salud, Asunción, Paraguay

**Correspondencia:** Domingo Pérez Bejarano, [domineumo@yahoo.com](mailto:domineumo@yahoo.com)

**Responsable editorial:** Miriam Espinola-Canata

**Cómo referenciar este artículo:** Pérez Bejarano D, López E, Duarte J, Grijalba R, González A, Cuenca E, et al. Desempeño diagnóstico de prueba serológica, respuesta de anticuerpos y correlación con características clínicas en trabajadores de salud con COVID-19 del Hospital General de Luque. Rev. salud publica Parag. 2021; 11(1):8-19

Recibido el 04 de diciembre del 2020, aprobado para publicación el 18 de febrero del 2021

**RESUMEN**

**Introducción:** La prueba de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) tiene limitaciones en su desempeño diagnóstico y requiere equipamiento complejo. Las pruebas de detección de anticuerpos pueden ser utilizadas como cribado epidemiológico, pero deberían ser evaluadas en un contexto regional. Conociendo la rentabilidad del test, se podría explorar parte del espectro de la inmunidad humoral que evoca el *SARS-CoV-2*. El personal de salud, como población de alto compromiso y de primer impacto en la pandemia constituye el proscenio ideal.

**Objetivo:** Evaluar el desempeño diagnóstico de prueba serológica, respuesta de anticuerpos y su correlación con características clínicas en trabajadores de salud con COVID-19 del Hospital General de Luque durante el 2020.

**Metodología:** Estudio transversal, donde se procedió a llamar y citar a trabajadores de salud del Hospital General de Luque (HGL) según orden confeccionado por el Servicio de Control de Infecciones que daba cuenta de 115 personas adultas, todas ellas estudiadas desde el 20 marzo del 2020 hasta el 16 de octubre 2020, que habían sido sometidas a prueba diagnóstica para COVID-19, acorde a directrices de categorización de riesgo del MSPyBS.

**Resultados:** Del total, 56 trabajadores tuvieron diagnóstico de COVID-19 positivo, de los cuales siete mujeres (asintomáticas) mostraron niveles < 1 al inmunoensayo para anticuerpos. De los 51 trabajadores con resultado RT-PCR negativo, 3 mostraron títulos de anticuerpos elevados. La sensibilidad del test fue de 89,3%, la especificidad de 94,1% y la exactitud 91,6%. No se observó correlación entre el nivel global de anticuerpos y la edad ( $r$  0,09;  $p$

0,52) así como tampoco con las comorbilidades. Finalmente, los trabajadores con síntomas persistentes, tuvieron niveles de anticuerpos

**Conclusión:** La prueba de detección de anticuerpos anti-N para *SARS-CoV-2* tuvo un buen desempeño diagnóstico, mostrando algunos falsos negativos a la RT-PCR, confirmando su utilidad para los estudios de seroprevalencia. Los niveles de anticuerpos fueron más elevados en los trabajadores con síntomas persistentes.

**Palabras clave:** COVID-19, Reacción en Cadena en Tiempo Real de la Polimerasa, Infección por Coronavirus, Paraguay.

**ABSTRACT**

**Introduction:** The reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) test has limitations in its diagnostic performance and requires complex equipment. Antibody detection tests can be used as epidemiological screening, but should be evaluated in a regional context. Knowing the profitability of the test, part of the spectrum of humoral immunity evoked by *SARS-CoV-2* could be explored. Health personnel, as a population of high commitment and of first impact in the pandemic, constitutes the ideal stage.

**Objective:** To evaluate the diagnostic performance of the serological test, antibody response and its correlation with clinical characteristics in health workers with COVID-19 at the General Hospital of Luque during 2020.

**Methodology:** Cross-sectional study, where health workers from the General Hospital of Luque (HGL) were called and summoned according to an order drawn up by the Infection Control Service that accounted for 115 adults, all of them studied since March 20, 2020 until October 16, 2020, who had undergone a diagnostic test for COVID-19, according

to the MSP and BS risk categorization guidelines.

**Results:** Of the total, 56 workers had a positive diagnosis of COVID-19, of which seven women (asymptomatic) showed levels <1 to the immunoassay for antibodies. Of the 51 workers with a negative RT-PCR result, 3 showed elevated antibody titers. The sensitivity of the test was 89.3%, the specificity 94.1% and the accuracy 91.6%. No correlation was observed between the global level of antibodies and age ( $r$  0.09;  $p$  0.52) as well as with comorbidities. Finally, workers with persistent symptoms had levels of antibodies.

**Conclusion:** The anti-N antibody detection test for *SARS-CoV-2* had a good diagnostic performance, showing some false negatives to RT-PCR, confirming its usefulness for seroprevalence studies. Antibody levels were higher in workers with persistent symptoms.

**Keywords:** COVID-19, Polymerase Real Time Chain Reaction, Coronavirus Infection, Paraguay.

## INTRODUCCIÓN

La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) es la prueba diagnóstica de referencia en el diagnóstico de la COVID-19, pero no está exenta de problemas de desempeño ya que hasta 54% de las personas enfermas pueden tener un resultado negativo<sup>(1)</sup>. Otros aspectos relativos a la infraestructura necesaria y a los costes dificultan la masificación de su uso. Esto ha motivado la búsqueda de alternativas, más operativas y económicas por lo cual se han aprobado estudios inmunológicos que detectan la presencia de antígenos virales que también se realizan en muestras nasofaríngeas con alta especificidad y fáciles de utilizar pero también con sensibilidad singular, 56,2% (IC95% 29,5-79,8%)<sup>(2-4)</sup>. Este tipo de inconveniencia también atañe al rastreo de anticuerpos ya que la producción de IgM e IgG inicia recién posterior a la primera semana de infección en la cual la rentabilidad diagnóstica es del 30,1% (IC95% 21,4-40,7%). Las inmunoglobulinas van elevando sus títulos plasmáticos después de los 14 días, por lo que su empleo se perfila recién a partir de este periodo<sup>(5-7)</sup>.

Pero a poco más de un año de iniciada la pandemia los estudios aún son insuficientes para elaborar cifras de alta confiabilidad sobre los métodos diagnósticos disponibles y aunque se avecinan métodos más rápidos y más simples en el horizonte<sup>(8)</sup>, hay que comprender que distintos tiempos de colecta de las muestras, disímiles métodos utilizados y muchas otras variables pueden ofrecer informes dispares tanto en la RT-PCR, como en la detección de antígenos virales del *SARS-CoV-2*. Ajustes metodológicos variados podrían salvaguardar gran parte de los sesgos en estos dominios.

No sucede lo mismo con el cribado de anticuerpos desarrollados por el hospedero. Sindemia e

inmunofenotipo son fenómenos que imponen ensayos regionales de validación, con el plan de complementar las condicionantes del tipo de inmunoglobulina rastreada (IgM o IgG), del antígeno objetivo (S, N o RBD) o del método empleado (inmunoensayo por quimioluminiscencia o CLIA, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas o ELISA y ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral o LFIA)<sup>(9,10)</sup>.

En poco tiempo hemos comprendido que complejos mecanismos celulares y humorales se configuran ante la invasión del *SARS-CoV-2* y aunque sea tan solo una parte del sistema de defensa del ser humano ante este nuevo virus, la generación y durabilidad de anticuerpos parece mostrar un espectro difuso ante los diferentes grados de severidad clínica que muestra la COVID-19<sup>(11,12)</sup>.

## OBJETIVO

Evaluar el desempeño diagnóstico de prueba serológica, respuesta de anticuerpos y su correlación con características clínicas en trabajadores de salud con COVID-19 del Hospital General de Luque durante el 2020.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio transversal, donde se procedió a llamar y citar a trabajadores de salud del Hospital General de Luque (HGL) según orden confeccionado por el Servicio de Control de Infecciones que daba cuenta de 115 personas adultas, todas ellas estudiadas desde el 20 marzo del 2020 hasta el 16 de octubre 2020, que habían sido sometidas a prueba diagnóstica para COVID-19, acorde a directrices de categorización de riesgo del Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social (MSP y BS)<sup>(13)</sup>. Esta lista rigió la selección del muestreo no probabilístico por conveniencia cuyo requisito principal era haber cumplido el periodo de 14 días o más desde el diagnóstico.

Para la recolección de los datos se diseñó un cuestionario estructurado, se consignaron datos antropométricos y demográficos (género, edad, peso y altura, masa corporal o (IMC), función en la institución (personal de blanco o personal de apoyo), comorbilidades auto reportadas (hipertensión arterial, diabetes mellitus, asma, tabaquismo u otros). Se consideró la frecuencia de obesidad acorde a  $IMC \geq 30\text{kg/m}^2$ . Se registró además historia de dengue en los últimos dos años y se verificó la existencia de cicatriz de vacunación con BCG. De modo puntual se apuntó el intervalo entre inicio de síntomas y la realización del hisopado y el intervalo entre inicio de síntomas y la entrevista. En caso de los asintomáticos se consignaba el intervalo entre fecha del hisopado y la entrevista. Se anotaron todos los síntomas del estadio agudo que motivó el hisopado nasofaríngeo, los cuales se

agruparon por órganos y sistemas: Afectación de vías aéreas superiores: congestión, rinorrea, dolor de garganta; Afectación de vías aéreas inferiores: tos, catarro, falta de aire; Afectación neurológica: cefalea, anosmia, disgeusia; Afectación gastrointestinal: náuseas, vómitos, diarreas, dolores abdominales; Afectación osteoartromuscular: mialgias, dolores generalizados, dolores de espalda, artralgias; y fatiga y fiebre quedaron puntualizadas en ítems separados.

Se estableció un score de afección multiorgánica si se consignaron tres o más grupos aquí mencionados, tomando como un solo ítem la afectación de vías aéreas. La severidad del cuadro agudo quedó clasificada como leve (manejo ambulatorio) o no leve (hospitalización o ingreso a Unidad de Cuidados Intensivos o UCI). Un aspecto importante de la consulta presencial fue el interrogatorio sobre síntomas persistentes, denominando así a todo signo o síntoma que se haya prolongado más allá de dos semanas del periodo agudo. Terminada la entrevista clínica, se procedía a tomar la muestra de sangre en el Laboratorio del HGL para el estudio correspondiente (titulación de anticuerpos).

Se verificó el documento emitido por el MSP y BS y su resultado correspondiente. El procesamiento de las muestras mediante RT-PCR se realizó siguiendo las recomendaciones de la OPS<sup>(14)</sup>, que permite detectar dos genes: el gen E (cuya presencia indica que pertenece a la familia de beta coronavirus) y RdRp (cuya presencia es específica para el *SARS-CoV-2* y sirve como confirmación). Asimismo, se utilizó el gen RnaseP como control de inhibición. La prueba de RT-PCR fue realizada en muestras de hisopado nasal y faríngeo recolectadas mediante técnica estándar en medio de cultivo viral y transportadas al centro de referencia, en cadena de frío.

El inmunoensayo de electroquimioluminiscencia Elecsys Anti-*SARS-CoV-2* está destinado a ser utilizado en analizadores de cobas e (Roche Diagnostics International Ltd, Rotkreuz, Suiza) para la detección in vitro de anticuerpos (incluyendo tanto IgA como IgG) contra el *SARS-CoV-2* en suero y plasma humanos. El inmunoensayo utiliza un principio de prueba de sándwich de doble antígeno y una proteína recombinante que representa el antígeno de la nucleocápsida para la determinación de anticuerpos contra el *SARS-CoV-2*<sup>(15)</sup>.

El método fue aprobado por la FDA en el contexto de uso de emergencia y fue sujeto de publicaciones comparativas recientemente<sup>(16-18)</sup>.

Para el presente estudio, el inmunoensayo de Elecsys Anti-*SARS-CoV-2* se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y los resultados del ensayo se expresan como la tasa entre la muestra del paciente y la muestra control. Por esto no hay unidades de medida y se interpretaron de la siguiente manera: índice de corte, < 1,0 para las muestras simples que eran no reactivas/negativas para los

anticuerpos contra el *SARS-CoV-2*; índice de corte,  $\geq 1,0$  para las muestras que eran reactivas/positivas para los anticuerpos contra el *SARS-CoV-2*<sup>(19)</sup>.

Los datos de la hoja de recolección de datos se digitaron a una tabla de Microsoft Office Excel 2016 ©, en la cual se procedió al análisis descriptivo, clasificando las variables en cualitativas y cuantitativas, verificando sus frecuencias y calculando las medidas de tendencia central y de dispersión pertinentes. El test de Shapiro-Wilk se utilizó para evaluar la distribución gaussiana o no<sup>(20)</sup>. Se utilizó la transformación logarítmica de los niveles de anticuerpos. El análisis inferencial se realizó en varias etapas: a) la prueba de chi cuadrado se utilizó para la comparación de variables nominales y la prueba T de student para comparar las medias de grupos de distribución normal; b) para el rendimiento diagnóstico de la prueba de anticuerpos se tomó como patrón estándar el resultado de RT-PCR para *SARS-CoV-2*, y mediante tabla de contingencia se computó sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo, valor predictivo negativo y exactitud del test, a más del cálculo de área bajo la curva (AUC); c) ANOVA sirvió para comparar las medidas de anticuerpos ( $\log_{x+1}$ ) según intervalos de toma de muestra; d) para asociaciones entre tasas de anticuerpos con transformación logarítmica y las variables cuantitativas se empleó el coeficiente de correlación de Spearman, ANOVA (R2 de Cox-Snell) para las nominales y regresión logística para variable dependiente.

Se consideró significativo a  $p < 0,05$ . Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando GraphPad Prism 8.0 (<http://www.graphpad.com>), MedCalc (<https://www.medcalc.org/>) y el JASP, versión 0.14.0.0; JASP Team, University of Amsterdam (2020).

Todos los participantes firmaron un consentimiento informado fundamentado en los cuatro principios básicos de la ética de la investigación: respeto por las personas, beneficencia/no maleficencia, igualdad y justicia. El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Caaguazú (Ref.: CEIFCMUNCA20/20).

## RESULTADOS

Durante los meses de octubre a noviembre del 2020 se realizaron consultas presenciales al personal de salud en el consultorio de Neumología del HGL, con el objetivo de realizar vigilancia clínica a los funcionarios que, entre el 20 de marzo hasta el 16 de octubre, hayan sido categorizados por el Comité de Infecciones Intrahospitalarias como de alto riesgo de padecer COVID-19. Del total de 115 personas citadas, 107 acudieron a la entrevista de los cuales 56 habían resultado positivos para *SARS-CoV-2* a la prueba de

RT-PCR. En la Tabla 1 se exhiben las características generales de los participantes de este estudio.

**Tabla 1: Características generales de desempeño institucional, demografía y antropometría de 107 funcionarios del Hospital General de Luque, distribuidos en grupos según confirmación diagnóstica de COVID-19 por RT-PCR**

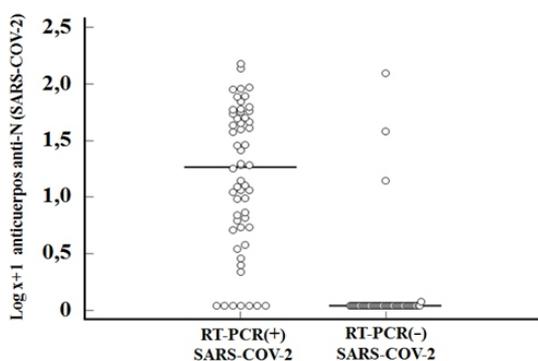
	TOTAL (N=107)	COVID-19 (+) RT-PCR (n <sub>1</sub> =56)	COVID-19 (-) RT-PCR (n <sub>2</sub> =51)	p
Personal medico, n(%)	25 (23,3)	16(28,6)	9 (17,6)	0,18
Personal de enfermería, n(%)	51 (47,6)	25 (44,6)	26 (50,9)	0,51
Personal de apoyo, n(%)	31 (28,9)	15 (26,8)	16 (31,4)	0,60
Edad en años, promedio (DS)	38,6 (9,3)	39,3 (9,7)	38,01 (8,9)	0,88
Sexo Femenino, n(%)	85 (79,4)	43 (76,8)	42 (82,3)	0,41
Índice de masa corporal k/m <sup>2</sup> , promedio (DS)	28,7 (5,6)	28,7 (5,1)	28,7 (6)	0,83

En la muestra se constató importante representación del personal de enfermería y del género femenino. Solo se verificaron tres personas > 60 años.

**Análisis de desempeño diagnóstico de la prueba serológica**

Del grupo de 56 trabajadores de salud que tuvieron el diagnóstico de COVID-19, siete mujeres, todas sintomáticas (una de moderada severidad), mostraron niveles < 1 al inmunoensayo para anticuerpos (0,1 a los 37 días de inicio de síntomas, 0,1 a los 60 días, 0,1 a los 58 días, 0,9 a los 28 días, 0,2 a los 48 días, 0,8 a los 50 días y 0,5 a los 33 días de inicio de los síntomas). Por otro lado, de los 51 individuos que resultaron negativos a la prueba de biología molecular, 3 mostraron títulos de anticuerpos elevados: 123,8 (hisopado nasofaríngeo realizado a los 5 días de inicio de síntomas, serología a los 54 días de inicio de síntomas), 12,9 (hisopado a los 4 días, serología a los 38 días) y 37,3 (hisopado a los 3 días, serología a los 33 días) Ver Figura 1.

**Figura 1: Gráfico de dispersión que muestra Logx+1 de los anticuerpos titulados en 56 individuos con RT-PCR positivo y en 51 individuos con RT-PCR negativo para SARS-COV-2 en el Hospital General de Luque**



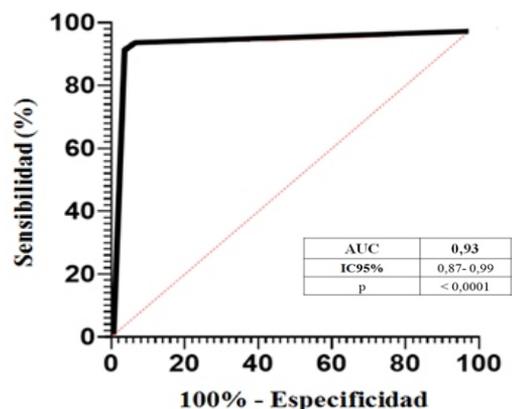
Todos estos hallazgos imponen evaluar primeramente la rentabilidad diagnóstica del inmunoensayo

tomando como patrón oro a la RT-PCR. Ver Tabla 2 y Figura 2.

**Tabla 2: Estimación de la sensibilidad, especificidad, valores predictivos y exactitud de la prueba de detección de anticuerpos mediante de electro quimioluminiscencia en 107 trabajadores de salud del Hospital Regional de Luque**

Desempeño	Valor (%)	IC 95% (%)
Sensibilidad	89,3	78,1 - 95,9
Especificidad	94,1	83,7 - 98,7
Valor Predictivo Positivo	94,3	84,7 - 98,0
Valor Predictivo Negativo	88,9	78,9 - 94,5
Exactitud	91,6	84,6 - 96,1

**Figura 2: Relación entre sensibilidad y especificidad de la prueba de inmunoensayo en 107 trabajadores de salud del Hospital Regional de Luque, expresado mediante curva ROC (Característica Operativa del Receptor)**



Necesariamente los grupos deben reconfigurarse para el análisis correlativo pertinente de las variables.

Esto significa que debemos considerar como diagnóstico positivo a aquellas personas que, pese a la biología molecular negativa, desarrollaron títulos significativos de anticuerpos, por lo que mostramos las características clínicas en la tabla 3.

**Características clínicas**

Es notoria la asimetría significativa en la proporción de hipertensos en el grupo de los trabajadores de salud con COVID-19, así como la mayor prevalencia (no significativa) de fumadores

No se constató diferencia en la proporción de cicatriz de vacuna BCG y la referencia reciente de dengue entre ambos grupos (Tabla 3).

**Tabla 3: Comorbilidades, cicatriz de vacunación con BCG y/o referencia de episodio de fiebre-dengue (2019-2020) en 107 funcionarios del Hospital General de Luque, distribuidos en grupos según confirmación diagnóstica de COVID-19**

	TOTAL (N=107)	COVID-19 (+) (n <sub>1</sub> =59)	COVID-19 (-) (n <sub>2</sub> =48)	p
<b>Comorbilidades, n(%)</b>				
Tabaquismo	18 (16,8)	12 (20,3)	6 (12,5)	0,28
Hipertensión arterial	16 (14,9)	16 (27,1)	-	0,0001
Diabetes mellitus	3 (2,8)	3 (5,1)	-	0,11
Asma bronquial	22 (20,5)	13 (22,0)	9 (18,7)	0,67
Obesidad	43 (40,1)	22 (37,3)	21 (43,7)	0,50
<b>Cicatriz de BCG y antecedente de dengue, n(%)</b>				
BCG	82 (76,6)	43 (72,8)	39 (81,2)	0,30
Antecedente de dengue (2019-2020)	56 (52,3)	32 (54,2)	24 (50,0)	0,66

En lo que respecta a las variables del episodio agudo es importante puntualizar que en el grupo COVID-19 (+) se incluyeron a 2 asintomáticos. Entre los negativos, 9 no presentaron síntomas y se sometieron a pruebas por categorización de alto riesgo. La Tabla 4 proporciona una visión general de los eventos agudos constatados o referidos, agrupados acorde a los diagnósticos.

**Tabla 4: Síntomas referidos según órganos o sistemas durante episodio agudo que motivó a realizar investigación diagnóstica para SARS-CoV-2 en 107 trabajadores de salud del Hospital Regional de Luque**

Presentación y Variables Clínicas (n,%)	COVID-19 (+) (n <sub>1</sub> =59)	COVID-19 (-) (n <sub>2</sub> =48)	p
Asintomáticos	2 (3,4)	9 (18,7)	0,009
Vías aéreas superiores	41 (69,5)	18 (37,5)	0,001
Vías aéreas inferiores	34 (57,6)	19 (39,6)	0,006
Neurológicos	56 (94,9)	21 (43,7)	0,0001
Gastrointestinal	20 (33,9)	13 (27,1)	0,44
Osteartromuscular	32 (54,2)	13 (27,1)	0,004
Fatiga	33 (55,9)	17 (35,4)	0,03
Fiebre	37 (62,7)	8 (16,6)	0,001
Escore multiorgánico	45 (76,3)	21 (43,75)	0,0006
Cuadro clínico leve	44 (74,6)	46 (95,8)	0,01

Es interesante puntualizar que los cuadros leves fueron menos frecuentes en el grupo COVID-19 (+) en el cual se consignaron 11 moderados y 4 severos. La afección multiorgánica (tres o más sistemas) también fue más frecuente en este grupo.

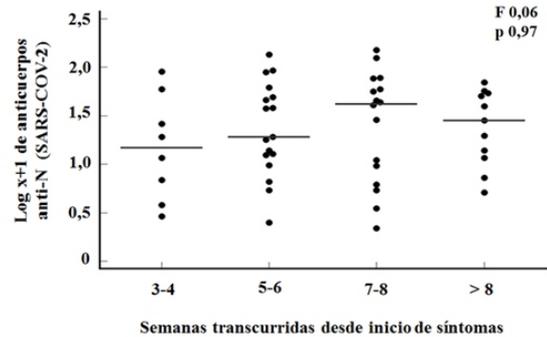
Para una justa apreciación de la correlación entre las variables analizadas en este ensayo, se debe considerar también los intervalos transcurridos desde inicio de síntomas hasta el hisopado nasofaríngeo y hasta la extracción de la muestra para titulación de anticuerpos. De este modo en el grupo COVID-19 (+) se dieron  $4,4 \pm 1,8$  días, expresados como promedio y desvío estándar (DS) mientras que en el grupo COVID-19 (-) transcurrieron  $3,8 \pm 3,6$  días desde el primer síntoma hasta el hisopado ( $p 0,268$ ). La comparación entre el inicio de síntomas y la titulación de anticuerpos séricos entre ambos grupos ( $46,03 \pm 24,8$  días vs  $57,9 \pm 31,3$  días), arrojó significativa discrepancia ( $p 0,03$ ).

**Respuesta de anticuerpos**

Al circunscribirse al análisis particular de aquellos

desarrollaron valores positivos de anticuerpos. Todos estos hallazgos imponen evaluar primeramente la rentabilidad diagnóstica del inmunoensayo tomando como patrón oro a la RT-PCR. Ver Tabla 2 y Figura 2.

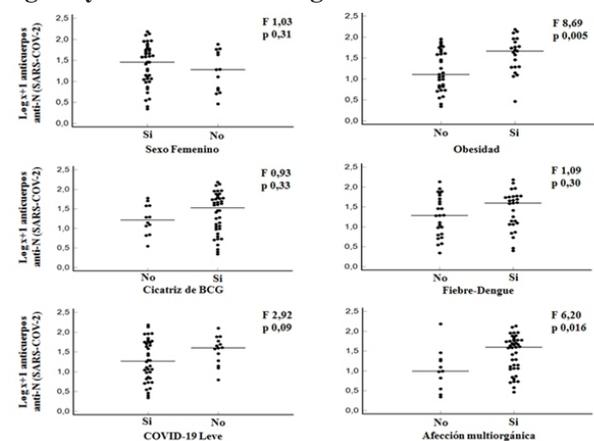
**Figura 3: Gráfico de dispersión de log10 anticuerpos anti-N (SARS-CoV-2) en 52 trabajadores de salud distribuidos según tiempo transcurrido entre inicio de síntomas y tiempo de colecta en el Hospital General de Luque**



Indagar la correlación entre el nivel global de anticuerpos con variables antropométricas y otros datos cuantitativos es una tarea trascendental. En esta perspectiva hemos verificado que no hubo correlación con la edad ( $r 0,09$ ;  $p 0,52$ ) ni con el intervalo transcurrido entre inicio de síntomas y el momento del muestreo serológico ( $r 0,02$ ;  $p 0,86$ ).

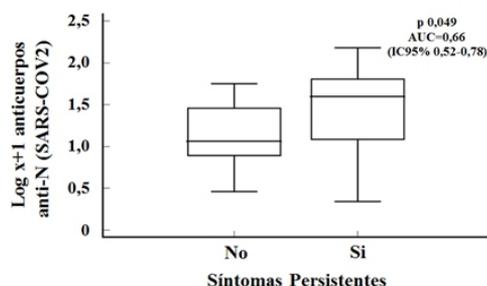
No se constató significancia entre los niveles de anticuerpos con la frecuencia de tabaquismo, hipertensión arterial, asma ni diabetes mellitus. Otras asociaciones se exponen en la Figura 4.

**Figura 4: Gráficos de dispersión de Log x+1 de anticuerpos anti-N (SARS-CoV-2) en 52 trabajadores de salud, distribuidos según género, obesidad, cicatriz de vacuna BCG, referencia de fiebre-dengue (2019-2020), severidad del cuadro agudo y afectación multiorgánica**



En la Figura 5 apreciamos que aquellos individuos con síntomas persistentes, tenían niveles de anticuerpos más notorios que los trabajadores de salud que resolvieron la enfermedad.

**Figura 5: Diagrama de cajas y bigotes que muestra la distribución logarítmica de los títulos de anticuerpos anti-N (*SARS-CoV-2*) en 52 trabajadores de salud, distribuidos según síntomas persistentes posteriores a cuadro de COVID-19**



## DISCUSIÓN

Hasta la tercera semana del mes de octubre de 2020 se habían constatado 3.794 casos de COVID-19 en trabajadores de salud, correspondiendo al 7% del total de casos notificados en el Paraguay, siendo Capital y los departamentos Central y Alto Paraná los más afectados (21). En el Hospital General de Luque, se había comprobado la infección en 4,8% de los funcionarios (20 de marzo a 16 de octubre). Todas estas cifras corresponden a confirmación diagnóstica mediante RT-PCR, método que no está exento de taras debido a su alta especificidad pero moderada sensibilidad. En un ensayo sobre 173 pacientes hospitalizados por síntomas respiratorios y tomografías de tórax compatibles con COVID-19, la prueba de RT-PCR resultó positiva en 67% mientras que se comprobó la presencia de anticuerpos en 93% (22). Este ejemplo nos hace reflexionar sobre la confiabilidad de las pruebas, la cual tiene dos cimientos calificados: la probabilidad clínica pre-test y la exactitud del método (23).

En la infección por *SARS-CoV-2* la soberana clínica ha enfrentado un dilema: los asintomáticos o pre-sintomáticos. Este contingente numeroso debilita a los filtros que buscan fiebre o alguna otra señal marcadora de la virosis. En muchos casos nadie la ve venir. Por esta razón los estudios de prevalencia serológica son instrumentos utilizados para medir la tasa de infección en grupos de alto riesgo como el personal sanitario. Un metanálisis demostró que en distintos centros de Europa, África, Asia y Norteamérica, el 8,7% de los trabajadores de salud (IC95% 6,7-10,9%) tenían títulos detectables de anticuerpos anti-*SARS-CoV-2* (24). Algunos estudios en Colombia y en Brasil mencionan cifras de 5,9% y 8,6%, respectivamente (25,26). Esto puede significar diferentes grados de impacto de la pandemia en distintas instituciones de

varias regiones pero también pueden ser resultantes de diferentes métodos empleados (10). No existe en la actualidad ninguna prueba que proporcione resultados con 100% de exactitud, y en esta tesitura se consensua una prueba "patrón oro" que se convierte en parámetro para comparar métodos alternativos de diagnóstico que van surgiendo. En esto consiste el proceso de validación de un test, y en lo que respecta al rastreo de las inmunoglobulinas han surgido varias investigaciones. Algaissi y cols, utilizando ELISA, encontraron que la respuesta al antígeno S y al N del *SARS-CoV-2* tiene alta sensibilidad y especificidad además de no mostrar reacción cruzada a componentes de otros coronavirus (27). Durante 4 semanas Bruni y cols titularon por ELISA a anticuerpos anti-RBD, anti-S y anti-N y encontraron que en infecciones que no son severas, los títulos de anti-N persistían aún después del aclaramiento viral (28). Similar sensibilidad (~70%) se encontró al comparar ELISA IgG/IgA, CLIA IgG/IgM y LFIA IgG/IgM en 128 pacientes con confirmación de COVID-19 por RT-PCR (29). Uno de los estudios más importantes comparó el Elecsys® (anticuerpos totales anti- N, CLIA) con cuatro inmunoensayos IgG anti-N (CLIA), IgG anti-S (CLIA), IgG/IgM anti S (CLIA) y IgG anti-S (ELISA), hallando una sensibilidad de 97,2% (IC95% 95,4-98,4%) y especificidad de 99,8% (IC95% 99,3-100%) (30). En el presente estudio encontramos altas cifras de sensibilidad y especificidad y un valor predictivo positivo de 94,3% (IC95% 84,7-98%), valor predictivo negativo de 88,9% (IC95% 78,9-94,5%) y una exactitud del 91,6% (IC95% 84,6-96,1%) configurando área bajo la curva (AUC) de 0,93 (IC95% 0,87-0,99). Entre los individuos que tuvieron confirmación diagnóstica, hemos notado tasas de anticuerpos por debajo del punto de corte en siete de ellos, todos sintomáticos (incluyendo un paciente con COVID-19 moderado). Hay que puntualizar, no obstante, que el intervalo entre el inicio de síntomas y la toma de muestra para serología fue amplio (28-60 días). Los hemos sorprendido al final de la curva descendente de la producción de anticuerpos? Desarrollaron anticuerpos, realmente? Rijkers y cols encontraron que 5,4% de 92 individuos no elevaron IgG (31). Estudios realizados en plasma convaleciente rastreando IgG anti-*SARS-CoV-2* mediante ELISA descubrieron que el 17% tenían valores borderline (32) mientras que otro grupo demostró tan solo 63,6% anticuerpos neutralizantes, 41 días promedio después de enfermedad leve (33). Se reportan dos casos que no desarrollaron IgG ni IgM hasta después de 50 días de iniciados los síntomas (34). Puede darse la enfermedad en pacientes que no producen anticuerpos en cuyo caso, la inmunidad celular y otros mecanismos dan cuenta de la infección (35). Existen muchas variantes de desórdenes inmunológicos en los adultos (36). ¿Cuáles y cuántas subyacen en la población de nuestro país?

Se define como caso COVID-19 falso negativo a la

persona que tiene sospecha de infección y que después de un dictamen negativo a la prueba de RT-PCR para SARS-CoV-2, resulta positiva en un test subsecuente y puede darse hasta en el 54%<sup>(1)</sup>. Hemos podido constatar tasas ponderadas de anticuerpos en tres funcionarios cuyo hisopado nasofaríngeo (efectuado entre 3-5 días desde inicio de síntomas) resultó negativo. Estos incidentes pueden deberse a falta de estandarización de la recolección de la muestra, retardos o condiciones inapropiadas en el almacenamiento antes de la remisión al laboratorio, utilización de pruebas validadas inadecuadamente (diferentes genes target para las sondas), contaminación durante el procedimiento, carga viral insuficiente, periodo de incubación de la enfermedad, presencia de mutaciones que escapan a la detección de la prueba e inhibidores de la PCR (37,38). Los porcentajes de positividad en los resultados de la RT-PCR van disminuyendo de 96,4% si la toma se hace en el día inicio de los síntomas a 75,4% al día 10 y solo a 3,3% al mes<sup>(39)</sup>. El virus puede ser detectable días antes de los síntomas alcanzando el pico de carga viral cerca del tiempo de inicio de los síntomas para luego ir declinando<sup>(40)</sup>. La recomendación actual para optimizar el diagnóstico es tomar la muestra en el día de inicio de los síntomas<sup>(41)</sup>. Los factores de riesgo de infección por SARS-CoV-2 en el personal de salud son el lugar de trabajo (sitios de alto riesgo o no), el grado de entrenamiento en prevención y control de infecciones y el uso de equipo de protección personal<sup>(42)</sup>. Sin embargo, en un reporte nacional de la situación de este grupo particular se consignó que 38% había contraído la infección en el contexto comunitario y otro 33% no pudo precisar el sitio de contagio<sup>(20)</sup>. Comparado a la población general, el perfil del personal sanitario corresponde a individuos más jóvenes, del sexo femenino, con menos comorbilidades y tasas inferiores de hospitalizaciones y muerte. Esto ocurre en la ciudad de New York<sup>(43)</sup>. En los sanatorios y hospitales del Paraguay, muchas personas desempeñan labores variadas, en diferentes turnos y en distintas situaciones de riesgo, haciendo de esta variable un factor de difícil ponderación en la predicción de los desenlaces. En esta muestra hubo diferencia significativa en la frecuencia de hipertensos entre el personal infectado o no y se consignó una alta proporción de individuos con obesidad. La vacunación con el Bacilo Calmette-Guérin (BCG) proporciona un entrenamiento inmunitario inespecífico que pudiera influenciar en el desenlace de algunas enfermedades. Las publicaciones que asocian la prevalencia de vacunación con BCG y la infección por SARS-CoV-2, proponen diferentes conclusiones<sup>(44,45)</sup>. En este ensayo no hemos encontrado asociación entre la presencia de COVID-19 y cicatriz de BCG. Debe resaltarse sin embargo que algunos individuos entrevistados aquí refirieron haberse vacunado pero no desarrollaron la cicatriz y, en general, la ausencia de

ésta no descarta las eventuales propiedades inmunológicas conferidas. Es factible que la revacunación altere la historia natural de la infección por SARS-CoV-2. Se encuentran en curso protocolos de investigación en trabajadores de salud<sup>(46,47)</sup>. Sería interesante un estudio epidemiológico que evalúe la asociación de la cobertura de BCG en los diferentes departamentos de nuestro país y el impacto de la pandemia, ajustando las variables.

En esta muestra no hemos encontrado asociación entre el antecedente de dengue y los trabajadores de salud que desarrollaron la infección por SARS-CoV-2, aunque la arbovirosis puede cursar asintomática y la referencia de la enfermedad puede no ser un indicador sensible. Un reporte de asociación epidemiológica indica que regiones con alta incidencia de fiebre dengue han presentado tasas inferiores de COVID-19<sup>(48-49)</sup>.

La frecuencia de individuos asintomáticos fue superior en el personal sanitario del grupo control ya que varios de ellos se realizaron testeos diagnósticos debido a categorización de alto riesgo en el contexto de exposición a procedimientos generadores de aerosoles. Un 3,4% del grupo COVID-19 (+) no refirió síntoma alguno y aunque este segmento constituye uno de los elementos notables de la pandemia actual, no es exclusivo de la infección por SARS-CoV-2, ya que puede verse en otras virosis respiratorias<sup>(50)</sup>.

La anosmia, la disgeusia o la cefalea fueron los síntomas prevalentes en el grupo con diagnóstico confirmado. Se refirió fiebre en el 62,7% de los casos. Excepto en lo relativo a síntomas gastrointestinales, la afectación por sistemas, la fatiga y la fiebre fueron más frecuentes entre los trabajadores de salud con COVID-19 y, acorde a lo relatado en otros reportes, la mayoría de los cuadros clínicos fue leve, no obstante es para destacar que uno de cada cuatro individuos estudiados aquí fue hospitalizado o requirió oxigenoterapia lo que confirma que el personal sanitario tiene mayores chances de desarrollar formas severas de COVID. Existe menor tasa de mortalidad de los casos en el personal de salud de los países europeos comparada a los países en vías de desarrollo<sup>(42,51-53)</sup>.

El estudio de la cinética de anticuerpos que sigue a la infección aguda por SARS-CoV-2 muestra varias vertientes y esto podría deberse a que inicialmente se empleaban inmunoensayos con diferentes desempeños. Para avanzar en la comprensión de los hallazgos de este estudio tenemos que responder dos preguntas: 1) ¿Es conveniente discriminar el tipo de inmunoglobulinas? y 2) ¿Es relevante la criba del antígeno objetivo? En primer lugar, la secuencia usual de elevación de la IgG cuando cae la IgM es descrita por varios autores, mientras que elevación más temprana de la IgG, incluso antes de la IgM es relatada por varios otros. Esta controversia generó la idea de pruebas que pueden detectar simultáneamente ambos anticuerpos<sup>(54-55)</sup>. En segundo lugar, el antígeno objetivo postula aspectos de cronología y modulación de la enfermedad.

La mayoría de los individuos tienen seroconversión a la segunda semana desde el inicio de los síntomas<sup>(56)</sup>.

Si la COVID-19 es capaz de inducir una respuesta humoral prolongada aún es motivo de debate. Desde 36 días hasta 8 meses se pueden hallar en reportes<sup>(57,58)</sup>. La ausencia de inmunidad sostenida a coronavirus estacional y la respuesta individual diferenciada ya ha sido mencionada en los años 90<sup>(59)</sup>. No es diferente con el *SARS-CoV-2*, donde vemos que la respuesta humoral se distribuye sobre un amplio rango, característica comprobada en este estudio. Es llamativa la heterogeneidad en la dinámica de la duración de los anticuerpos. Un grupo de la Universidad de Harvard demostró recientemente que existen respondedores efímeros (actividad linfocitaria extra folicular prioritaria y desregulación de centros germinales) y respondedores duraderos (genes con hipermutación somática de linfocitos memoria capaces de producir inmunoglobulinas más eficaces y una alta frecuencia de actividad de linfocitos T desde los centros germinales)<sup>(60)</sup>. Este último proceso inmune global superior de los duraderos podría tener como antecedente el acondicionamiento celular por infecciones de coronavirus estacionales. Reacción cruzada, ese sería el grito primigenio para la formación de la pared de escudos. Buscando asociación de datos demográficos o clínicos con la producción de anticuerpos hemos encontrado discrepancia de niveles de inmunoglobulinas en los pacientes obesos en el análisis univariado. Esto se contrapone a otros trabajos que encontraron que los niveles séricos de inmunoglobulinas se asocian negativamente al IMC en COVID-19, argumentando que la obesidad es una condición inflamatoria a la cual subyace un sistema inmune disfuncional<sup>(61)</sup>. Hotamisligil escribe un brillante artículo sobre desórdenes inmunometabólicos donde propone entre otras hipótesis, que los adipocitos decadentes podrían liberar efectores inmunes que disparan una respuesta inflamatoria<sup>(62)</sup>. O pudiera ser la leptina que tiene conocidos efectos sobre las células inmunes<sup>(63)</sup>. Hay cierta seducción para pensar en un estado de pre combustión sobre la cual la piroptosis inducida por el *SARS-CoV-2* inicia el caos, pero un estudio de diseño similar al nuestro y desarrollado en 956 trabajadores de salud también confirma nuestros hallazgos<sup>(64)</sup>. Aún hay un sendero que recorrer en esta línea de investigación. A nuestro entender, este es uno de los primeros estudios que correlaciona el antecedente de vacunación con BCG y el nivel de anticuerpos desarrollados por pacientes con COVID-19. Hemos encontrado mayores niveles de anticuerpos en trabajadores de salud que presentaban cicatriz de la vacuna, aunque no significativos por análisis estadístico. En la Universidad Radboud descubrieron que la BCG previa a la vacunación contra la influenza resultaba en un incremento pronunciado de la inducción de anticuerpos contra la influenza pandémica<sup>(65)</sup>. En modelos animales inyectados con BCG se comprobó una reprogramación epigenética de

los monocitos, traducida en mayor protección contra infecciones heterólogas (66,67). En este estudio hemos encontrado mayores niveles de anticuerpos anti-N anti-*SARS-CoV-2* en el personal sanitario que refirió diagnóstico de fiebre-dengue en el 2019 o 2020 aunque el papel del acaso fue mayor al 5% para explicar esta asociación. El surgimiento de reportes sobre posible reacción cruzada entre anticuerpos contra el dengue y contra el *SARS-CoV-2*, generó cierto ruido y preocupación para las fases de diagnóstico en las trincheras<sup>(68,69)</sup>. Otro aspecto de esta sindemia es la interacción moduladora que pudieran ejercer el choque de estas dos enfermedades. Los fenómenos de intensificación o refuerzo dependiente de anticuerpos en dengue (empeoramiento de la enfermedad debido a anticuerpos de infecciones anteriores) parece ser un acontecimiento excepcional en áreas endémicas (0,5%) y se da notoriamente con títulos bajos de anticuerpos (títulos altos serían protectores)<sup>(70,71)</sup>. Dada la dispersión en los niveles de anticuerpos vistos en la COVID-19 es aún prematuro definir si puede darse este fenómeno, su intensidad, las variables que intervienen y sobre todo su desenlace. Entre los asintomáticos se han constatado bajos niveles de inmunoglobulinas anti-*SARS-CoV-2*, que desaparecen a los 2-3 meses en el 40% de este grupo clínico particular<sup>(72)</sup>. La severidad del episodio agudo de la COVID-19 se asocia a diferentes niveles de respuesta humoral<sup>(56,73)</sup>. La producción de inmunoglobulinas en el contexto de la infección por el nuevo coronavirus debe ser mirada en dos momentos: durante el episodio agudo y después de éste. a) En agudo, resuelven o perjudican. La existencia de un inmunofenotipo peculiar se traduce en términos de eficacia clínica ya que los respondedores duraderos de anticuerpos desarrollan síntomas por 9,5 días (promedio) en contraposición a los 15,5 días de los respondedores efímeros<sup>(60)</sup>, pero por otro lado se encontró que un 13,5% de pacientes con neumonía severa poseía auto anticuerpos anti-interferón grupo I<sup>(74)</sup>. b) Después del capítulo agudo: ¿protegen o agravan?, la presencia de anticuerpos anti-N y anti-S se asocia a una reducción de riesgo de reinfección durante 6 meses<sup>(75)</sup>, mientras que en nuestro modesto trabajo se ha encontrado la asociación de los niveles de anticuerpos anti-N con síntomas persistentes. Creemos que esto es muy relevante ya que una de las hipótesis explicativas para el “Long COVID-19” es la persistencia de efectores inmunológicos o mediadores inflamatorios perennes o de depuración dilatoria. Probablemente este es uno de los primeros trabajos que correlacionan los síntomas pos-COVID-19 con el nivel de anticuerpos. El trabajo tiene varias limitaciones como: la muestra poblacional es pequeña, el diseño transversal no nos permite evaluar la dinámica de la respuesta de los anticuerpos, la historia clínica tomada después de un intervalo con amplio rango puede tornarse imprecisa y la necesaria transformación logarítmica de los niveles de anticuerpos está sujeta a debates en el seno de la bioestadística.

## CONCLUSIÓN

Se ha encontrado que la prueba de detección de anticuerpos anti-N para *SARS-CoV-2* tiene un buen desempeño diagnóstico habiendo descubierto algunos falsos negativos a la RT-PCR, confirmando por ende su utilidad para los estudios de seroprevalencia en este grupo particular.

Enmarcados en el contexto regional de nuestra realidad sanitaria, hemos estudiado el impacto de la cicatriz de BCG y el antecedente de dengue sobre la frecuencia de la COVID-19 y el nivel de anticuerpos. Las tendencias insinuadas en los resultados dan pie a profundizar metodologías más depuradas para evaluar estas correlaciones.

Tal vez el hallazgo más provocador sea la tendencia que encontramos entre el nivel de anticuerpos anti-N y los síntomas persistentes, que plantea una respuesta a las causales de la indefinida terminología conocida como “Long Covid”. Si se validan nuestros hallazgos se reafirman los descubrimientos recientes sobre cierto subproducto de la reacción inmune y plantea además efectos colaterales a largo plazo.

**Contribuciones:** AV, EM, NS, AG, LS, y MS colaboraron en la concepción del estudio original, recolección de los datos y la redacción del manuscrito. LO y HK realizaron el análisis de datos e interpretación de datos. HK, MS, AG y LS participaron en la concepción del estudio original y en la redacción del manuscrito. AG y AV colaboraron en la concepción del estudio original, la interpretación de datos, la redacción del manuscrito. Todos los autores revisaron y aprobaron la versión

**Declaración.** Las opiniones expresadas en este manuscrito son responsabilidad del autor y no reflejan necesariamente los criterios ni la política de la RSP y/o del INS

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1- Arevalo-Rodriguez I, Buitrago-Garcia D, Simancas-Racines D, Zambrano-Achig P, del Campo R, Ciapponi A, et al. False-negative results of initial RT-PCR assays for COVID-19: A systematic review. *PLoS One*. 2020 Dec 10; 15(12): e0242958. doi: 10.1371/journal.pone.0242958

2- Caruana G, Croxatto A, Coste AT, Opota O, Lamoth F, Jatón K, et al. Diagnostic strategies for SARS-CoV-2 infection and interpretation of microbiological results. *Clin Microbiol Infect*. 2020;26(9):1178-1182. doi:10.1016/j.cmi.2020.06.019

3- Centers for Disease Control and Prevention (8CDC). Using Antigen Tests. Interim Guidance for Antigen Testing for SARS-CoV-2. [Internet]. 16 de diciembre 2020. [Citado 3 de enero de 2021]. Disponible en <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/resources/antigen-tests-guidelines.html>

4- Dinnes J, Deeks JJ, Adriano A, Berhane S, Davenport C, Dittrich S, et al. Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2020, Issue 8. Art. No.: CD013705. DOI: 10.1002/14651858.CD013705.

5- Suhandynata RT, Hoffman MA, Kelner MK, McLawhon RW, Reed SL, Fitzgerald RL. Longitudinal monitoring of SARS-CoV-2 IgM and IgG seropositivity to detect COVID-19. *J Appl Lab Med* 2020;jfaa079. <https://doi.org/10.1093/jalm/jfaa079>.

6- Watson J, Richter J, Deeks J. Testing for SARS-CoV-2 antibodies. *BMJ* 2020; 370: m3325. doi.org/10.1136/bmj.m3325

7- Deeks JJ, Dinnes J, Takwoingi Y, Davenport C, Spijker R, Taylor-Phillips S, et al. Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2020, Issue 6. Art. No.: CD013652. DOI: 10.1002/14651858.CD013652

8- Berber B, Aydin C, Kocabas F, Guney-Esken G, Yilancioglu K, Karadag-Alpaslan M, et al. Gene editing and RNAi approaches for COVID-19 diagnostics and therapeutics. *Gene Ther*. 2020; 14:1-16. doi: 10.1038/s41434-020-00209-7.

9- Li K, Huang B, Wu M, Zhong A, Li L, Cai Y, et al. Dynamic changes in anti-SARS-CoV-2 antibodies during SARS-CoV-2 infection and recovery from COVID-19. *Nature Communications* 2020; 11:6044 | <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19943-y>

10- Ejazi SA, Ghosh S, Ali N. Antibody detection assays for COVID-19 diagnosis: an early overview. *Immunol Cell Biol*. 2020 Aug 30. doi: 10.1111/imcb.12397

11- Phipps WS, SoRelle JA, Li QZ, Mahimainathan L, Araj E, Markantonis J, et al. SARS-CoV-2 Antibody Responses Do Not Predict COVID-19 Disease Severity. *Am J Clin Pathol* 2020;XX:0-0, DOI: 10.1093/AJCP/AQAA123

12- Iyer AS, Jones FK, Nodoushani A, Kelly M, Becker M, Slater D, et al. Persistence and decay of human antibody responses to the receptor binding domain of SARS-CoV-2 spike protein in COVID-19 patients. *Sci Immunol*. 2020 Oct 8;5(52):eabe0367. doi: 10.1126/sciimmunol.abe0367.

13- Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social-Paraguay. Protocolo para categorización de riesgo y manejo del Personal de Salud expuesto y contacto de caso positivo para SAR-COV-2. 2020. (Internet). Citado el 30 diciembre 2020. Disponible en <https://www.msps.gov.py/dependencias/portal/adjunto/6190c8-20200721CategorizacionriesgoPNIAASFinal.pdf>

14- Pan American World Health Organization. Laboratory Guidelines for the Detection and Diagnosis

of COVID-19 Virus Infection [Internet]. Washington DC: PAHO/WHO; 2020 [citado 8 abril 2020]. Disponible en: <https://www.paho.org/En/Documents/Laboratory-Guidelines-Detection-And-Diagnosis-Covid-19-Virus-Infection>

15- Namekar M, Ellis EM, O'Connell M, Elm J, Gurary A, Park SY, et al. Development and Validation of the Elecsys Anti-SARS-CoV-2 Immunoassay as a Highly Specific Tool for Determining Past Exposure to SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol* 58:e01694-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.01694-20>.

16- Food and Drugs Administration (FDA) Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S – FDA: (21 U.S.C. §360bbb-3). (Internet) EEUU; 2020. (Citado 30 de diciembre de 2020). Disponible en <https://www.fda.gov/media/144034/download>

17- National SARS-CoV-2 Serology Assay Evaluation Group. Performance characteristics of five immunoassays for SARS-CoV-2: a head-to-head benchmark comparison. *Lancet Infect Dis*. 2020 Dec;20(12):1390-1400. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30634-4.

15- Namekar M, Ellis EM, O'Connell M, Elm J, Gurary A, Park SY, et al. Development and Validation of the Elecsys Anti-SARS-CoV-2 Immunoassay as a Highly Specific Tool for Determining Past Exposure to SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol* 58:e01694-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.01694-20>.

16- Food and Drugs Administration (FDA) Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S – FDA: (21 U.S.C. §360bbb-3). (Internet) EEUU; 2020. (Citado 30 de diciembre de 2020). Disponible en <https://www.fda.gov/media/144034/download>

17- National SARS-CoV-2 Serology Assay Evaluation Group. Performance characteristics of five immunoassays for SARS-CoV-2: a head-to-head benchmark comparison. *Lancet Infect Dis*. 2020 Dec;20(12):1390-1400. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30634-4.

18- Gudbjartsson DF, Norddahl GL, Melsted P, Gunnarsdottir K, Holm H, Eythorsson E, et al. Humoral Immune Response to SARS-CoV-2 in Iceland. *N Engl J Med* 2020; 383: 1724-34. DOI: 10.1056/NEJMoa2026116

19- Food and Drug Administration (FDA). Elecsys Anti-SARS-CoV-2 – FDA. (Internet). EEUU; 2020 (Citado 30 diciembre 2020). Disponible en <https://www.fda.gov/media/137605/download>

20- Razali NM, Wah YB. Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics* 2011; ; 2(1): 21-33.

21- Organización Panamericana de la Salud (OPS). Reporte de situación N°31 OPS/OMS Paraguay. 23 de octubre 2020. (Internet). Citado el 3 de enero 2021.

Disponible en <https://www.paho.org/es/file/77516/download?token=P7coQQ2d>

22- Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et al. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis*. 2020;71(16):2027-2034. doi:10.1093/cid/ciaa344

23- Watson J, Whiting PF, Brush JE. Interpreting a covid-19 test result. *BMJ*. 2020 May 12;369:m1808. doi: 10.1136/bmj.m1808.

24- Galanis P, Vraka I, Fragkou D, Bilali A, Kaitelidou D. Seroprevalence of SARS-CoV-2 antibodies and associated factors in health care workers: a systematic review and meta-analysis. *J Hosp Infect*. 2020; 108:120-134. doi:10.1016/j.jhin.2020.11.008

25- Ariza B, Torres X, Salgado D, Cepeda M, Restrepo CG, Castellanos JC, et al. Seroprevalence and seroconversion rates to SARS-COV-2 I interns, residents, and medical doctors in a University Hospital in Bogotá, Colombia. *MedRxiv* 2020; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.09.15.20195313>

26- Silva VO, de Oliveira EL, Castejon MJ, Yamashiro R, Ahagon CM, López-Lopes GI, et al. Prevalence of antibodies against SSARS-COV-2 in professionals of a public health laboratory at Sao Paulo, SP-Brazil. *MedRxiv* 2020; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.10.19.20213421>

27- Algaissi A, Alfaleh MA, Hala S, Abujamel TS, Alamri SS, Almahboub SA, et al. SARS-CoV-2 S1 and N-based serological assays reveal rapid seroconversion and induction of specific antibody response in COVID-19 patients. *Sci Rep*. 2020 Oct 6;10(1):16561. doi: 10.1038/s41598-020-73491-5

28- Brión M, Cecatiello V, Diaz-Basabe A, Lattanzi G, Mileti E, Monzani S, et al. Persistence of Anti-SARS-CoV-2 Antibodies in Non-Hospitalized COVID-19 Convalescent Health Care Workers. *J. Clin. Med*. 2020, 9, 3188; doi:10.3390/jcm9103188

29- Montesinos I, Gruson D, Kabamba B y cols. Evaluation of two automated and three rapid lateral flow immunoassays for the detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies. *Journal of Clinical Virology* 128 (2020) 104413. doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104413

30- Isabel M, Damien G, Benoit K, Hafid D, Soleimani R, Vincenzo C, et al. Performance characteristics of five immunoassays for SARS-CoV-2: a head-to-head benchmark comparison. *Lancet Infect Dis* 2020; doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30634-4

31-Rijkers G, Murk JL, Wintermans B, van Looy B, van den Berge M, Veenemans J, et al. Differences in Antibody Kinetics and Functionality between Severe and Mild Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infections. *J Infect Dis*. 2020 Sep 14; 222(8):1265-1269. doi: 10.1093/infdis/jiaa463.

32- Schwarzkop S, Krawczyk A, Knop D y cols. Cellular Immunity in COVID-19 Convalescents with PCR-

- Confirmed Infection but with Undetectable SARS-CoV-2-Specific IgG. *Emerging Infectious Diseases* 2021; 27(1): 122-129. doi: <https://doi.org/10.3201/eid2701.203772>
- 33- Agarwal A, Mukherjee A, Kumar G, Chatterjee P, Bhatnagar T, Malhotra P; PLACID Trial Collaborators. Convalescent plasma in the management of moderate covid-19 in adults in India: open label phase II multicentre randomised controlled trial (PLACID Trial). *BMJ*. 2020; 371:m3939. DOI: 10.1136/bmj.m3939
- 34- Wang J, Chen C, Li Q y cols. COVID-19 confirmed patients with negative antibodies results. *BMC Infectious Diseases* (2020) 20:698; doi.org/10.1186/s12879-020-05419-3
- 35- Buckland M, Galloway J, Fhogartaigh C y cols. Treatment of COVID-19 with remdesivir in the absence of humoral immunity: a case report. doi: 10.1038/s41467-020-19761-2
- 36- Hausmann O, Warnatz K. Immunodeficiency in adults: a practical guide for the allergist. *Allergo J Int* 2014;23:261-8. doi: 10.1007/s40629-014-0030-4
- 37- Lippi G, Simundic AM, Plebani M. Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Clin Chem Lab Med*. 2020 Jun 25;58(7):1070-1076. doi: 10.1515/ccm-2020-0285.
- 38- Li D, Wang D, Dong J y cols. False-Negative Results of Real-Time Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2: Role of Deep-Learning-Based CT Diagnosis and Insights from Two Cases. *Korean J Radiol*. 2020 Apr;21(4):505-508. doi: 10.3348/kjr.2020.0146
- 39- Wikramaratna Paul S, Paton Robert S, Ghafari Mahan y cols. Estimating the false-negative test probability of SARS-CoV-2 by RT-PCR. *Euro Surveill*. 2020; 25(50): pii = 2000568. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.50.2000568>
- 40- World Health Organization (WHO). Diagnostic testing for SARS-CoV-2: Interim Guidance. 11 de setiembre 2020. (Internet). Citado el 5 de enero 2021. Disponible en <https://www.who.int/publications/i/item/diagnostic-testing-for-sars-cov-2>
- 41- Hanson K, Caliendo A, Arias C y cols. The Infectious Diseases Society of America Guidelines on the Diagnosis of COVID-19: Molecular Diagnostic Testing (Internet). Last updated December 23, 2020. (Citado el 3 de enero 2021). Disponible en [www.idsociety.org/COVID19guidelines/dx](http://www.idsociety.org/COVID19guidelines/dx).
- 42- Chou R, Dana T, Buckley DI y cols. Epidemiology and Risk Factors for Coronavirus Infection in Health Care Workers: A Living Rapid Review. *Ann Intern Med*. 2020 Jul 21;173(2):120-136. doi: 10.7326/M20-1632.
- 43- Kim R, Nachman S, Fernandes R y cols. Comparison of COVID-19 infections among healthcare workers and non-healthcare workers. *PLoS ONE* 2020; 15(12): e0241956. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241956>
- 44- Hamiel U, Kozer E, Youngster I. SARS-CoV-2 Rates in BCG-Vaccinated and Unvaccinated Young Adults. *JAMA*. 2020;323(22):2340-2341. doi:10.1001/jama.2020.8189
- 45- Escobar LE, Molina-Cruz A, Barillas-Mury C. BCG vaccine protection from severe coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 Jul 28; 117(30): 17720-17726. doi: 10.1073/pnas.2008410117
- 46- Junqueira-Kipnis, A.P., dos Anjos, L.R.B., Barbosa, L.C.d. y cols. BCG revaccination of health workers in Brazil to improve innate immune responses against COVID-19: A structured summary of a study protocol for a randomised controlled trial. *Trials*2020; 21, 881. doi: <https://doi.org/10.1186/s13063-020-04822-0>
- 47- Rosendahl A, Schaltz-Buchholzer F, Benfield T y cols. Using BCG vaccine to enhance non-specific protection of health care workers during the COVID-19 pandemic: A structured summary of a study protocol for a randomised controlled trial in Denmark. *Trials* 2020; 21:799. doi: 10.1186/s13063-020-04714-3
- 48- Ly S, Fortas C, Duong V, y cols. Asymptomatic Dengue Virus Infections, Cambodia, 2012-2013. *Emerg Infect Dis*. 2019; 25(7): 1354-1362. doi:10.3201/eid2507.181794
- 49- Nicolelis M, Raimundo R, Peixoto P y col. How superspreader cities, highways, hospital bed availability and dengue fever influenced the COVID-19 epidemic in Brazil. *MedRxiv* 2020; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.09.19.20197749>
- 50- Birger R, Morita H, Comito D, et al. Asymptomatic Shedding of Respiratory Virus among an Ambulatory Population across Seasons [published correction appears in mSphere. 2018 Dec 12;3(6):]. *mSphere*. 2018;3(4):e00249-18. doi:10.1128/mSphere.00249-18
- 51- CDC COVID-19 Response Team. Characteristics of Health Care Personnel with COVID-19 - United States, February 12-April 9, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2020 Apr 17;69(15):477-481. doi: 10.15585/mmwr.mm6915e6. PMID: 32298247.
- 52- Mutambudzi M, Niedwiedz C, Macdonald EB y cols. Occupation and risk of severe COVID-19: prospective cohort study of 120 075 UK Biobank participants. *Occup Environ Med* 2020;0:1-8. doi:10.1136/oemed-2020-106731
- 53- Bandyopadhyay S, Baticulon RE, Kadhum M, et al. Infection and mortality of healthcare workers worldwide from COVID-19: a systematic review. *BMJ*

Global Health 2020;5:e003097. doi:10.1136/bmjgh-2020-003097

54- Wolff F, Dahma H, Duterme C y cols. Monitoring antibody response following SARS-CoV-2 infection: diagnostic efficiency of 4 automated immunoassays. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2020 Nov;98(3):115140. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2020.115140.

55- Long Q, Deng H, Chen J, y cols. Antibody responses to SARS-CoV-2 in COVID-19 patients: the perspective application of serological tests in clinical practice. *MedRxiv* 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.03.18.20038018>.

56- Röltgen K, Powell AE, Wirz OF y cols. Defining the features and duration of antibody responses to SARS-CoV-2 infection associated with disease severity and outcome. *Sci Immunol.* 2020 Dec 7;5(54):eabe0240. doi: 10.1126/sciimmunol.abe0240.

57- Ibarrondo F, Fulcher J, Goodman D y cols. Rapid Decay of Anti-SARS-CoV-2 Antibodies in Persons with Mild Covid-19. *N Engl J Med* 2020; 383(11). doi: 10.1056/NEJMc2025179

58- Choe PG, Kim KH, Kang CK y cols. Antibody Responses 8 Months after Asymptomatic or Mild SARS-CoV-2 Infection. *Emerg Infect Dis.* 2020 Dec 22;27(3). doi: 10.3201/eid2703.204543

59- Callow K, Parry H, Sergeant M y cols. The time course of the immune response to experimental coronavirus infection of man. *Epidemiol. Infect.* 1990; 105, 435–446. doi: 10.1017/s0950268800048019

60- Chen Y, Zuiani A, Fischinger S, y cols. Quick COVID-19 Healers Sustain Anti-SARS-CoV-2 Antibody Production. *Cell.* 2020; 183(6):1496-1507.e16. doi:10.1016/j.cell.2020.10.051

61- Frasca D, Reidy I, Cray C y cols. Effects of obesity on serum levels of SARS-CoV-2-specific antibodies in COVID-19 patients. *MedRxiv* 2020; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.12.18.20248483>

62- Hotamisligil GS. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature.* 2017; 542(7640): 177-85. doi: 10.1038/nature21363.

63- Rebello, C.J., Kirwan, J.P. Greenway, F.L. Obesity, the most common comorbidity in SARS-CoV-2: is leptin the link?. *Int J Obes* 44, 1810–1817 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41366-020-0640-5>

64- Shields AM, Faustini SE, Perez-Toledo M, y cols. Serological responses to SARS-CoV-2 following non-hospitalised infection: clinical and ethnodemographic features associated with the magnitude of the antibody response. *MedRxiv.* 2020;2020.11.12.20230763. doi:10.1101/2020.11.12.20230763

65- Leentjens J, Kox M, Stokman R y cols. BCG Vaccination Enhances the Immunogenicity of Subsequent Influenza Vaccination in Healthy Volunteers: A Randomized, Placebo-Controlled Pilot Study. *J Infect Dis.* 2015;212(12):1930-8.

66- Kleinnijenhuis J, Quintin J, Preijers F y cols. Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Oct 23;109(43):17537-42. doi: 10.1073/pnas.1210007109

67- Sharma A, Sharma S, Shi Y y cols. BCG vaccination policy and preventive chloroquine usage: do they have an impact on COVID-19 pandemic?. *Cell Death and Disease* 2020; 11:516

68- Kembuan GJ. Dengue serology in Indonesian COVID-19 patients: Coinfection or serological overlap? *IDC Cases.* 2020;22:e00927. doi: 10.1016/j.idcr.2020.e00927.

69- Yan G, Lee CK, Lam LTM y cols. Covert COVID-19 and false-positive dengue serology in Singapore. *Lancet Infect Dis.* 2020;20(5):536. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30158-4.

70- Katzelnick LC, Gresh L, Halloran ME y cols. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science.* 2017 Nov 17;358(6365):929-932. doi: 10.1126/science.aan6836.

71- Arvin AM, Fink K, Schmid MA y cols. A perspective on potential antibody-dependent enhancement of SARS-CoV-2. *Nature.* 2020 Aug;584(7821):353-363. doi: 10.1038/s41586-020-2538-8

72- Long QX, Tang XJ, Shi QL y cols. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med.* 2020; 26(8):1200-1204. doi: 10.1038/s41591-020-0965-6.

73- Wang P, Liu L, Nair M y cols. SARS-CoV-2 neutralizing antibody responses are more robust in patients with severe disease. *Emerging Microbes & Infections* 2020; 9:1, 2091-2093, DOI: 10.1080/22221751.2020.1823890

74- Bastard P, Rosen LB, Zhang Q y cols. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science.* 2020 ;370(6515):eabd4585. doi: 10.1126/science.abd4585.

75- Lumley SF, O'Donnell D, Stoesser NE y cols. Antibody Status and Incidence of SARS-CoV-2 Infection in Health Care Workers. *N Engl J Med.* 2020; *NEJMoa2034545*. doi: 10.1056/NEJMoa2034545. 2012 Oct 23;109(43):17537-42.