

Estudio
Seroprevalencia

Seroprevalencia de SARS-CoV-2

durante la epidemia en Colombia:

estudio país

Seroprevalencia de SARS-CoV-2 durante la epidemia en Colombia: estudio país

Investigadoras principales y función dentro del proyecto

Marcela Mercado: Coordinación científica, técnica, administrativa y financiera.

Bacterióloga, Master en Epidemiología Clínica. Responsable del diseño del protocolo, estará a cargo de la selección de los grupos de estudio, recolección de la información y análisis de datos. Participara en la redacción de documentos científicos. CVLac: https://scienti.minciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0000158534 Afiliación: Instituto Nacional de Salud, Bogotá DC

Martha Ospina: Coordinación científica, técnica, administrativa y financiera.

Medica, Master en Epidemiologia, Mater en Salud Pública y Master en Economía de la salud y candidata a doctor en Políticas Públicas. Responsable de diseño de protocolo y escritura de documentos científicos. CV: <https://co.linkedin.com/in/martha-lucia-ospina-martinez-0810661a> Afiliación: Instituto Nacional de Salud, Bogotá DC

Entidades participantes

- Instituto Nacional de Salud
- Ministerio de Salud y Protección Social
- Departamento Administrativo nacional de Estadísticas DANE
- Universidad del Norte
- Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas CIDEIM
- Universidad El Bosque
- Colombia/Wisconsin One-Health Consortium, Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín
- Universidad de Córdoba
- Centro de Atención y Diagnóstico de Enfermedades Infecciosas CDI
- Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria AGROSAVIA
- Universidad de San Francisco, California
- Imperial College London
- Secretarías Departamentales, Distritales y Municipales de Salud de las 10 ciudades participantes.

Objetivos

General

Determinar la seroprevalencia de SARS-CoV-2 por grupo de edad para comprender el comportamiento de la infección en la población colombiana.

Específicos:

1. Detectar anticuerpos antivirales IgM e IgG contra SARS-CoV-2 en población nacional.
2. Determinar la prevalencia específica por edad de infecciones asintomáticas o subclínicas por SARS-Cov-2.
3. Estimar la seroconversión (fuerza de infección) en la población de estudio.
4. Determinar los factores de riesgo de infección con base en las características identificadas en la población de estudio.
5. Establecer el desempeño de las pruebas diagnósticas “in house” y comerciales, para la detección de anticuerpos IgG e IgM anti-SARS-CoV-2 en muestras de suero humano.

Presentación y justificación de la propuesta en función de su aporte al problema planteado en la invitación

El nuevo coronavirus, SARS-CoV-2, que causa la enfermedad conocida como COVID-19, se ha propagado a nivel mundial de forma rápida, convirtiéndose en el tercer coronavirus altamente patógeno y transmisible en humanos, después del SARS-CoV y MERS-CoV (Zhu *et al.*, 2020). En Colombia, el panorama no es diferente, ya que desde el reporte del primer caso de COVID-19 el 06 de marzo de 2020, el número va en aumento, sumándose a la lista de países con reporte de casos. Las características clínicas y epidemiológicas del COVID-19 continúan siendo investigadas a medida que el virus se transmite en la población (Xu *et al.*, 2020) (Shi *et al.*, 2020). Además del número reproductivo básico y el riesgo de muerte conocer la proporción de infección asintomática en la población es necesario para guiar políticas públicas (Roth *et al.*, 2020).

El conocimiento de este nuevo patógeno se ha ido construyendo entre la comunidad científica, y la realización de estudios serológicos contribuirá con información valiosa acerca de la epidemiología de la infección y sobre la historia natural de la enfermedad, convirtiéndose en recomendaciones útiles para la toma de decisiones relacionadas con modelos de transmisión y estrategias de inmunización en la población.

Se sabe que los anticuerpos IgM anti-virus proveen la línea base de defensa durante las infecciones virales, antes de la generación de la respuesta adaptativa IgG, importante para la inmunidad a largo plazo y la memoria inmunológica. Se ha reportado que en el caso de la infección por SARS-CoV, IgM podía ser detectado en sangre después del día 3-6, mientras que la IgG puede ser detectada después de 8 días. Debido a que el SARS-CoV-2 pertenece a la misma familia de virus que han causado los brotes de SARS y MERS, se asume que el proceso de generación de anticuerpos es similar y por lo tanto, la detección de anticuerpos específicos para SARS-CoV-2 será un indicativo de infección. La detec-

ción tanto de anticuerpos IgG como de IgM proveerá información sobre la línea de tiempo de la infección, la proporción de infectados asintomáticos y sintomáticos en diferentes grupos poblacionales, así como brindar un valor agregado al diagnóstico y tratamiento de la enfermedad por COVID-19. Al indicar qué cantidad y proporción de la población ya es inmune debido a infecciones leves, los datos de anticuerpos podrían ofrecer una clave de la rapidez con que el virus continuará propagándose.

La seroprevalencia de la población se determina mediante la detección de anticuerpos IgG e IgM anti-SARS-CoV-2. A la fecha, no existen pruebas serodiagnósticas avaladas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), por lo que Colombia realizará el estudio con una prueba serodiagnóstica desarrollada "in house" y con pruebas comerciales que presenten sensibilidad mayor al 85% y especificidad igual o mayor al 90%. El desarrollo de la prueba "in house" es un valor agregado de la investigación para el país, permitirá afianzar las tecnologías nacionales de producción de proteínas recombinantes y péptidos sintéticos, así como tener disponible una prueba diagnóstica de buen desempeño que no dependa del mercado internacional.

Antecedentes técnicos

Para el desarrollo del proyecto se cuenta con la alianza de 9 instituciones de excelencia científica y académica en el país, cada una de ellas en conjunto o de manera individual tienen antecedentes del aporte de recomendaciones para las políticas de salud pública y de la participación en estudios de seroprevalencia para virus, parásitos, o bacterias. Los profesionales vinculados tienen la suficiente formación académica y experticia técnico científica y las instituciones la infraestructura necesaria y suficiente que permitirá la culminación exitosa de la propuesta.

Resultados de CTel obtenidos por las entidades participantes:

En este listado se incluyen algunas entidades participantes.

Entidad	Título del producto	Enlace de consulta
CIDEIM	Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia a longitudinal study of the natural history, prevalence and Incidence of infection and clinical manifestations	https://academic.oup.com/jid/article-abstract/168/3/699/870353?redirectedFrom=fulltext
	Recurrent Lesions in Human <i>L. braziliensis</i> infection: Reactivation or Reinfection	https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140-6736(90)91945-7
	Epidemiology of <i>Trypanosoma cruzi</i> in the oriental plains of Colombia	http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.1984.33.1084
Universidad del Norte	Dengue, chikungunya and zika virus coinfection: results of the national surveillance during the zika epidemic in Colombia	https://www.cambridge.org/core/journals/epidemiology-and-infection/article/dengue-chikungunya-and-zika-virus-coinfection-results-of-the-national-surveillance-during-the-zika-epidemic-in-colombia/CBDD5E564D17C3EC8347E134F71B4FCB
	Zika virus disease-associated Guillain-Barré syndrome—Barranquilla, Colombia 2015–2016	https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022510X1733767X
	Spatial distribution of the relative risk of Zika virus disease in Colombia during the 2015–2016 epidemic from a Bayesian approach	https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ijgo.13048
INS	Dengue, chikungunya and zika virus coinfection: results of the national surveillance during the zika epidemic in Colombia	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6518562/
	Pregnancy and Birth Outcomes Among Colombian Women with Zika Virus Disease in 3 Surveillance Sites, Proyecto Vigilancia de Embarazadas con Zika.	https://europepmc.org/article/PMC/6808833
	Beginning of the end of Onchocerciasis in the Americas	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4002041/
Colombia Wisconsin One-health consortium	S. Zhou, S. Goldstein, M. Place, M. Bechner, D. Patiño, K. Potomousis, P. Ravindran, L. Pape, J.P. Hernandez-Ortiz, J. Medrano and D.C. Schwartz, "A Clone-free, Single Molecule Map of the Domestic Cow (<i>Bos taurus</i>) Genome," BMC Genomics, vol. 16:664, pp. 1–19 (2015)	[DOI: 10.1186/s12864-015-1823-7]
	K.L. Kounovsky-Shafer, J.P. Hernandez-Ortiz, J.J. de Pablo and D.C. Schwartz "Electrostatic Confinement and Manipulation of DNA Molecules for Genome Analysis," PNAS, vol. 114(51), pp. 13400–13405 (2017)	[DOI: 10.1073/pnas.1711069114]
	Samuel J.W. Krerowicz, Juan P. Hernandez-Ortiz and David C. Schwartz, "Microscale Objects via Re-structuring of Large, Double-Stranded DNA Molecules," ACS Applied Materials and Interfaces, vol. 10, pp 41215–41223 (2018)	[DOI: 10.1021/acsami.8b18157]
Centro de Atención y Diagnóstico de Enfermedades Infecciosas DCI – Grupo Infóvida	Estupiñán MI, Rodríguez I, Herrera VM, Moncayo ZM, Villar LA. Seroprevalence study to identify age of groups that are most at risk of dengue infection in Piedecuesta, an endemic municipality of Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2015; 93: 322.	https://www.astmh.org/ASTMH/media/Documents/ASTMH-2015-Abstract-Book-Final.pdf
	Estupiñán MI, Rodríguez I, Gelves RM, Lozano AY, Mauricio Herrera Victor, Salje H, et al. Endemicity and emergence of arboviruses in Piedecuesta, Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2018;99: 512.	https://www.astmh.org/ASTMH/media/Documents/2018-Abstract-Book-FINAL-11-13.pdf
	Nouvellet P, Cucunuba ZM, Jessica RIV, Montoya MC, Trujillo A, Camacho E, et al. Characterization of population exposure (seroprevalence) to arboviruses after recent outbreak in Colombia: dengue, chikungunya and Zika. Am J Trop Med Hyg. 2018;99: 296.	https://www.astmh.org/ASTMH/media/Documents/2018-Abstract-Book-FINAL-11-13.pdf

Metodología

Diseño: Estudio transversal de seroprevalencia de base poblacional.

Diseño estadístico: Universo: está conformado por la población civil no institucional mayor de 5 años residentes en la cabecera municipal de Bogotá, Barranquilla, Bucaramanga, Cali, Cúcuta, Medellín, Villavicencio, Leticia, Ipiales y Guapi.

Marco muestral: constituido por el listado de viviendas, hogares, personas y el inventario cartográfico de las ciudades seleccionadas, obtenidos de la información producida por el Censo General del DANE, así como las actualizaciones que se hacen en el período intercensal.

Unidades Estadísticas

- Unidades de observación: corresponden a las viviendas, los hogares y las personas.
- Unidades de análisis: corresponden a las viviendas, los hogares y las personas.
- Unidades de muestreo: existen unidades de muestreo primarias relacionadas con la primera etapa y secundarias con la segunda.

Para esta encuesta se definen 2 etapas, y sus unidades de muestreo son las siguientes:

- Unidades primarias de Muestreo (UPM): son las manzanas en las cabeceras municipales.
- Unidades secundarias de Muestreo (USM): son los segmentos o medidas de tamaño MT (áreas de 5 viviendas en promedio) con límites naturales fácilmente identificables en los que se encuestan todos los hogares.

Diseño muestral

Tipo de muestreo: muestreo probabilístico multietápico de conglomerados.

Probabilístico: cada unidad de muestreo tiene una probabilidad de selección conocida y superior a cero. Esta información permite determinar a priori la precisión deseada en las estimaciones y posteriormente, calcular la precisión de los resultados obtenidos a partir de la información recolectada.

Multietápico: para lograr la selección de las unidades de observación (viviendas, hogares o personas) se seleccionaron secuencialmente las unidades de muestreo en tres etapas (UPM, USM) con probabilidades de selección en función del número de viviendas.

- En una primera etapa, la UPM, selecciona la manzana. Para la selección de manzanas, se utiliza una selección de muestra proporcional al tamaño sistemática (PPT-SIS) de manzanas.
- En la segunda etapa se selecciona el segmento o USM con un muestreo aleatorio simple de conglomerados de cinco viviendas.

En este proceso de selección por etapas sólo se requiere una actualización cartográfica detallada de las áreas seleccionadas.

De conglomerados: están definidos por la unidad secundaria de muestreo y corresponde a 5 viviendas (contiguas) en promedio donde se encuestan todas las viviendas, hogares y personas que lo conforman.

Definición de tamaño de la muestra

Los tamaños de muestra se calcularon para una prevalencia del 30% con error de muestreo marginal de 3% y 3.5% que equivalen a un error relativo de 5.10% y 6% respectivamente. Varía su tamaño según la población de cada ciudad. Los cálculos se realizan con las fórmulas correspondientes al tipo de diseño muestral. Se ajustan con base en el efecto de los conglomerados en el diseño $d_{eff}=2$ resultante de la de la experiencia de las encuestas de hogares realizadas por el DANE (Tabla 1).

Tamaño total de la muestra: 18.472 individuos.

Tabla 1. Tamaño de muestra según municipio.

Tipo	Error relativo	Error marginal	# de encuestas
Bogotá, D.C.	5,10%	3,00%	4500
Barranquilla	6,00%	3,50%	1448
Bucaramanga	6,00%	3,50%	1447
Cali	5,10%	3,00%	1971
Cúcuta	6,00%	3,50%	1447
Medellín	5,10%	3,00%	1971
Villavicencio	6,00%	3,50%	1447
Leticia	6,00%	3,50%	1421
Ipiales	6,00%	3,50%	1437
Guapi	6,00%	3,50%	1383
Total			18.472

Ajustes de cobertura

El ajuste de cobertura se realiza cuando se pierden segmentos u hogares. Cuando hay pérdida de segmentos se ajusta a nivel de UPM, calculando la razón entre el número de segmentos seleccionados y el número de segmentos efectivamente encuestados. Si hay pérdida de hogares el ajuste se realiza a nivel de segmento, se calcula la razón entre número de hogares encontrados en el segmento y el número de hogares efectivos completos.

Criterios de inclusión

- Personas residentes en los principales centros urbanos del país que representan las cinco regiones (Bogotá, Barranquilla, Bucaramanga, Cali, Cúcuta, Medellín, Villavicencio, Leticia, Ipiales y Guapi)
- Personas entre 5 y 80 años de edad.
- Pueden participar personas con diagnóstico previo confirmado y caso relacionado de COVID-19, según lo definido en el instructivo de vigilancia del INS.
- Pueden participar en el estudio trabajadores de la salud.
- Participación voluntaria y firma del consentimiento informado. Para mayores de 7 años firma de asentimiento informado.

Criterios de exclusión

- Personas que tengan contraindicación para punción venosa.

Coordinación y duración del estudio

El estudio será coordinado por los investigadores del Instituto Nacional de Salud. La duración será de 9 meses. Se realizará un muestreo en cada ciudad, después del pico epidemiológico de la enfermedad, estimado entre septiembre y noviembre de 2020. Se incluirá una submuestra de trabajadores de la salud en cada ciudad de acuerdo con la definición establecida en el protocolo de vigilancia de COVID-19 (Cualquier trabajador en triaje, consulta, central de muestras, laboratorio, salas de procedimientos, observación, hospitalización o vigilancia en salud pública con exposición no protegido).

Todas las instituciones participantes contarán con el protocolo armonizado y todo el equipo de personal que participará en el estudio recibirá capacitación para el desarrollo de la técnica, diligenciamiento de formatos, digitación de la base de datos y demás aspectos relacionados, para la unificación de criterios, conceptos y metodologías.

Procedimiento

Una vez se haya identificado la elegibilidad de los habitantes del hogar para la participación en el estudio, se procederá a realizar el proceso de consentimiento y asentimiento informado.

Recolección de la información:

La información se recolectará a través de una encuesta de formato estandarizado que recoge datos demográficos epidemiológicos y clínicos de los participantes (Anexo 1). La encuesta será aplicada casa a casa por el personal de salud contratado para el estudio. El contacto de las personas para invitarlas a participar en el estudio se realizará por visita domiciliaria o por vía telefónica. La recolección de la información será presencial.

Toma de muestras

Las muestras deben ser tomadas por personal capacitado, teniendo en cuenta todas las instrucciones de bioseguridad y el uso de los elementos de protección personal para virus respiratorios que se mencionan a continuación

- Respirador N95
- Bata antifluido
- Guantes de látex o de nitrilo
- Protección para los ojos (careta de cara completa o gafas protectoras)
- Gorro
- Polainas

Recolección de la muestra de sangre

Una vez firmado el consentimiento informado el personal y los pacientes que cumplan con los criterios de inclusión se invitarán a participar en el estudio. Posteriormente se recolectarán muestras de sangre venosa envolviendo una banda elástica alrededor de la parte superior del brazo para aplicar presión en el área para extraer entre 6 y 7 ml de la parte interior del codo o del dorso de la mano previa limpieza del sitio de punción con un desinfectante (antiséptico) en tubo estéril con ácido cítrico dextrosa y gel separador, el cual debe rotularse adecuadamente con nombre y apellidos del paciente, documento de identificación, fecha y hora de recolección de la muestra, lugar de toma de muestras y almacenar. Posterior al llenado del tubo se retira la banda elástica, se retira la aguja y se cubre el sitio de punción para detener el sangrado.

Una vez recolectada la muestra de sangre será centrifugada para separar el suero o plasma, el cual será almacenado a -30°C o -80°C hasta su procesamiento para la determinación de inmunoglobulinas IgG e IgM anti SARS-CoV-2.

En caso de que al participante se le soliciten pruebas de rutina se utilizarán esas muestras para el almacenamiento.

Recolección de muestra de Hisopado Nasofaríngeo

En caso de que el participante tenga síntomas relacionados con la enfermedad COVID-19, se procederá a tomar muestra nasofaríngea mediante la toma de hisopado nasofaríngeo (el hisopo debe colocarse y transportarse en un mismo tubo con medio de transporte viral mínimo en un volumen de 1,5ml) hasta su remisión a Bogotá donde serán congeladas a -30 o -70 grados centígrados hasta su procesamiento por RT-PCR mediante el protocolo Berlín estandarizado en el INS (Corman *et al.*, 2020). Para la toma de muestras respiratorias se seguirán los lineamientos para la vigilancia por laboratorio de virus respiratorios del Instituto Nacional de Salud.

Conservación y transporte de Muestras

Para hisopados nasofaríngeos el transporte debe realizarse con pilas congeladas, debidamente cerradas, marcadas y soportadas en una gradilla, en neveras aptas para tal fin. Es importante asegurar la cadena de frío ya que temperaturas superiores a 8°C degradan la partícula viral, obteniéndose falsos negativos. Las muestras de sangre deben transportarse en nevera.

La conservación del hisopado puede hacerse de -2 a 8°C hasta su procesamiento el mismo día o entre -20°C por una semana y -70°C por un mes.

Las muestras de sangre deberán ser centrifugadas para la obtención del suero, este puede ser conservado entre -2 a 8°C en tubos estériles, o congelado a -20°C

Remisión de Muestras al INS

Una alícuota de las muestras de suero procesadas en cada ciudad participante en el estudio, serán enviadas al Instituto Nacional de Salud, debidamente marcadas y cerradas, asegurando la cadena de frío a 4°C con pilas congeladas y garantizando el triple empaque, cumpliendo las normas internacionales relativas al transporte aéreo de sustancias infecciosas: sustancias biológicas, Categoría B.

Intervención

- Aplicación de consentimientos informados y asentimientos informados a niños de 7 años o más
- Aplicación de encuesta al participante
- Toma de muestra de sangre al participante
- Toma de muestra de hisopado nasofaríngeo en caso que el participante presente sintomatología asociada a Covid
- Todos los participantes serán contactados vía telefónica para explicar el resultado de los ensayos y los mismos serán enviados vía correo electrónico, en un plazo de hasta tres meses después de la toma de la muestra.

Procesamiento de muestras de suero

1. Montaje y estandarización de técnicas “in house”

Metodología 1: Diseño de péptidos para identificación de SARS-CoV-2 y generación de anticuerpos.

Se sintetizarán cuatro péptidos sintéticos diseñados con base en la información del genoma de referencia del coronavirus SARS-CoV-2 (MN908947.3) y de las secuencias de los genomas virales de pacientes colombianos confirmados para COVID-19. Los péptidos tendrán una extensión entre 25-30 aminoácidos y serán derivados de la secuencia de las proteínas Spike (S gene) y nucleocápside (N gene) de acuerdo con lo reportado en la literatura (Cai et al., 2020) (Li et al., 2020)

Prueba de Elisa

Se realizará detección de IgG e IgM anti SARS-CoV-2 en los pacientes incluidos en el estudio mediante ELISA utilizando como antígenos de captura péptidos sintéticos diseñados con base en la información del genoma de referencia de SARS-CoV-2 (MN908947.3).

Se realizará la determinación de anticuerpos totales IgM e IgG, mediante la prueba ensayo in house por inmunoadsorción ligado a enzimas-ELISA para la detección de anticuerpos utilizando como antígeno los péptidos sintetizados. Se estandarizará la concentración óptima de antígeno de SARS-CoV-2 realizando un “pool” de los péptidos sintéticos, la dilución óptima de suero y de conjugado (anti IgG ó IgM humana unida a fosfatasa alcalina). Se adicionarán 100 µl de antígeno sintético de SARS-CoV-2, por triplicado a microplacas de poliestireno Combiplate®-Labsystems en diferentes concentraciones entre 1 y 30 µg/ml disueltas en solución reguladora de carbonato (0.05M, pH 9.6) para su posterior confrontación con anticuerpos IgG e IgM, respectivamente y se determinará así la concentración óptima de antígeno. Se realizará la incubación en cámara húmeda a temperatura ambiente (20°C) durante tres horas con posteriores lavados con PBS 0.15M, pH 7.4 más Tween 20 al 0.05% (PBS-T) tres veces consecutivas durante cinco minutos cada vez. Se agregarán 100 µl de suero y se incubará en cámara húmeda a temperatura ambiente (20°C) durante dos horas, seguida de tres lavados como se describió anteriormente. Se adicionarán 100 µl, por triplicado, de anti-IgG e anti-IgM humana, independientemente, a diferentes diluciones para determinar la dilución óptima de cada uno de los conjugados (entre 1:250 y 1:4000) con posterior incubación en cámara húmeda a 4°C durante 18 horas seguida de lavados con PBS-T tres veces consecutivas durante cinco minutos cada vez. Finalmente se agregará 100 µl, a cada pozo de las microplacas, de p-nitro-fenil-fosfato (1 mg) por 1 ml de solución reguladora de dietanolamina y se permitirá reacción de la enzima (fosfatasa alcalina) con el sustrato (p-nitro-fenil-fosfato) a temperatura ambiente 20°C durante 30 minutos seguida de inactivación de la reacción adicionando 25 µl de NaOH 3M a cada pozo de la microplaca. Finalmente se realizará lectura de cada uno de los pozos de la microplaca con un colorímetro Multiskan MS.

Diseño de péptidos para identificación de SARS-CoV-2 y generación de anticuerpos.

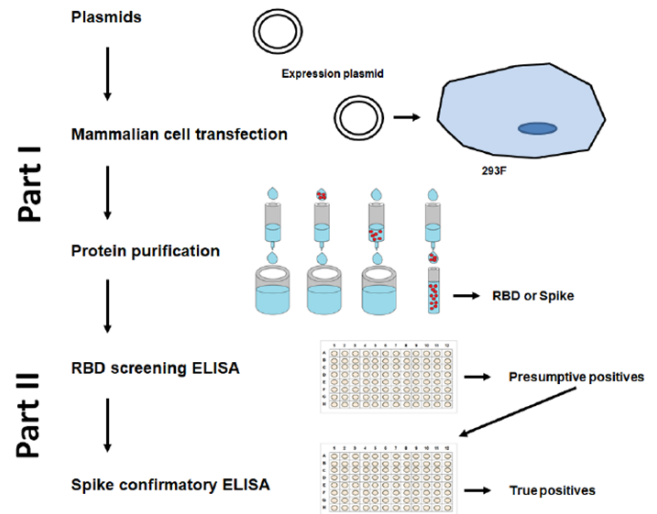
Se sintetizarán cuatro péptidos sintéticos diseñados con base en la información del genoma de referencia del coronavirus SARS-CoV-2 (MN908947.3) y de las secuencias de los genomas virales de pacientes colombianos confirmados para COVID-19. Los péptidos tendrán una extensión entre 25-30 aminoácidos y serán derivados de la secuencia de las proteínas Spike (S gene) y nucleocápside (N gene) de acuerdo con lo reportado en la literatura (Cai *et al.*, 2020) (Li *et al.*, 2020).

Metodología 2: Producción recombinante de antígenos en células HEK 293F utilizando vectores de expresión para la proteína RBD secretada, y una versión trimérica soluble del spike protein del SARS-CoV-2.

La glicoproteína superficial del virus, denominada spike protein (S), media la unión del virus a las células humanas a través de su dominio de unión al receptor (RBD) y se ha demostrado que los anticuerpos que son capaces de unirse a la proteína S, específicamente a la región RBD, son neutralizantes. Asimismo, se conoce que las personas no expuestas al SARS-CoV-2 no presentan reactividad alguna contra la proteína S. La producción recombinante de este antígeno para ser acoplado a una prueba de ELISA permite, por ende, por distinguir entre personas expuestas / inmunes e ingenuas.

Se utilizará la línea celular HEK 293F (human embryonic kidney 293) utilizando vectores de expresión para la proteína RBD secretada, así como una versión trimérica soluble del spike protein del SARS-CoV-2. Para tal fin, se utilizarán los constructos disponibles a través del Krammer Laboratory, Icahn School of Medicine, Mount Sinai, por medio del Oxford Protein Production Facility UK at the Research Complex at Harwell: Soluble SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain and Soluble SARS-CoV-2 Spike cloned in mammalian expression vectors. Una vez se estandarice la producción recombinante de los antígenos, se procederá a implementar una validación por medio de ELISA de dos pasos para evaluación a

gran escala de muestras de suero humano para detectar anticuerpos (IgG e IgM) que se unan a la proteína S.



Tomado de: Stadbauer & Amanat 2020

Prueba de ELISA

Se desarrollará una ELISA de dos pasos en donde el primer paso incluye el screening de muestras de suero de pacientes en una sola dilución contra la proteína RBD, la cual, tiene un rendimiento óptimo de producción en la línea celular y generalmente puede obtenerse en una mayor cantidad. El segundo paso consistirá en la evaluación de muestras positivas a RBD, por medio de una ELISA confirmatoria con curva de dilución de suero contra la proteína SPIKE, la cual, presenta un rendimiento menor en la línea celular y por ende, generalmente se encuentra en una menor cantidad.

Detección de anticuerpos anti SARS-CoV-2 por métodos comerciales

Detección de anticuerpos totales contra la proteína S1 RBD de la espícula por medio de la técnica de quimioluminiscencia. Esta prueba se seleccionó siguiendo recomendaciones internacionales y después de múltiples ensayos de validación realizados por el grupo de investigación en muestras de población colombiana que incluyen sueros pre-pandemia así como muestras durante la pandemia.

Recolección de la información y plan de análisis

Recolección de la información

La información será recolectada en un formato diseñado específicamente para este fin, precodificado con los siguientes componentes:

- a) Módulo de vivienda
 - Segmento
 - Vivienda
 - Acceso a la vivienda
- b) Módulo de censo
 - Datos
 - Criterios de selección
- c) Módulo de individuo
 - Sociodemográfica
 - Contactos
 - Información relacionada con salud
 - Información relacionada con síntomas
 - Actitudes y practicas
 - Percepción de vacunación

Los resultados serán analizados utilizando el programa estadístico SPSS (versión 22.0, SPSS Inc, Chicago, Illinois). Con los datos obtenidos se realizará inicialmente un análisis descriptivo. Las variables continuas se presentarán como media y desviación estándar (DS) o mediana y rango intercuartílico (IQR) todas las proporciones se calcularán como porcentajes de los pacientes con datos disponibles.

Para detectar diferencias significativas entre grupos, se utilizará la prueba de chi-cuadrado o exacta de Fisher para variables categóricas y prueba t o de Mann-Whitney para variables continuas, según sea el caso y el análisis de tendencia lineal para múltiples comparaciones. El punto de corte óptimo de los predictores continuos para predecir las variables de desenlace se establecerá mediante el índice Youden.

Finalmente, se realizará un análisis multivariante en el que se incluirán todos los factores potencialmente relacionados con enfermedad grave (ingreso en UCI y/o mortalidad global) detectados en el estudio univariante y aquellos con importancia clínica. Los resultados del análisis multivariante se informarán como odds ratios (OR) e intervalos de confianza del 95%. Cada modelo de regresión se evaluará con la prueba de bondad de ajuste de Hosmer-Lemeshow, y el poder discriminatorio se evaluará utilizando el área bajo la curva ROC.

El umbral para la significación estadística se definirá a una p de dos colas $<0,05$.

Los parámetros epidemiológicos que se medirán son los siguientes:

Parámetro	Definición
Porcentaje de ataque específico por edad	Proporción de individuos por edad que muestran seroconversión para infección por COVID-19.
Incidencia acumulativa por edad específica	La proporción de los individuos por grupo de edad que muestren seroconversión para la infección por COVID-19.
Proporción de casos sintomáticos	La proporción de los individuos que muestren síntomas o signos de infección por COVID-19.
Respuesta serológica para la infección	El cambio en el nivel de anticuerpos específicos para COVID-19. Proporción de individuos asintomáticos por edad.
Grupos de población con mayor riesgo	Identificación de grupos más vulnerables a la infección por COVID-19 (edad, género).

Resultados Esperados

El desarrollo de este proyecto de investigación permitirá obtener una comprensión detallada de la evolución de la prevalencia del COVID-19 en el país y estimar la rapidez con la que se alcanza un 70% de personas po-

sitivas a la infección. Se busca conocer el alcance de la infección y la dinámica de transmisión, así como el porcentaje portadores asintomáticos. Esta información se utilizará para refinar/actualizar las recomendaciones de la vigilancia (por ejemplo, definición de caso, periodo de incubación), para determinar las características clave de la transmisión del virus, comprender la dispersión geográfica, la gravedad y el impacto en la comunidad. El conocimiento generado permitirá orientar acciones de respuesta en salud pública para gestionar casos y reducir el potencial de propagación y el impacto de la infección por SARS-CoV-2 en el país, así como la adecuada utilización de pruebas diagnósticas en el seguimiento del paciente. Teniendo en cuenta que se utilizarán las variables de protocolos estándar establecidos por la OMS los datos anonimizados de exposición epidemiológica se podrán compartir sistemáticamente de forma rápida con OMS para obtener estimaciones oportunas sobre la evolución de la enfermedad. Esto es muy importante teniendo en cuenta que SARS-CoV-2 es un nuevo patógeno respiratorio en humanos. Se obtendrá una prueba inmunoenzimática para detectar anticuerpos anti- SARS-CoV-2 en suero humano utilizando péptidos sintéticos para su utilización en cualquier laboratorio y especialmente, en estudios sero-epidemiológicos en el país. Adicionalmente los resultados tendrán impactos en la utilización en estudios sero-epidemiológicos para detectar infección o inmunidad protectora.

Impactos potenciales

El COVID-19 tiene un alto impacto social sobre la salud mental de la población en general, afectando tanto a quienes padecen la enfermedad como a quienes buscan protegerse de ella, como consecuencia de una percepción acelerada del riesgo y de cambios en la vida social, conducentes a generar comportamientos colectivos relacionados con la discriminación, la violencia y la depresión.

Con el fin de determinar de forma exploratoria el impacto social de la enfermedad, el cuestionario incluirá los datos socio-demográficos y algunos comportamentales.

Los datos serán recolectados y analizados en conjunto y serán interpretados como hallazgos referidos a la descripción de la dimensión psicosocial de la enfermedad. Los resultados de los datos cuantificados y analizados serán presentados a través de un informe sobre el impacto psicosocial del COVID-19, sugiriendo algunas recomendaciones con el fin de mitigar el impacto social causado por el SARS-CoV-2, que, a su vez, pueden ser útiles en general para la atención psicosocial ante emergencias sanitarias causadas por epidemias.

Consideraciones éticas

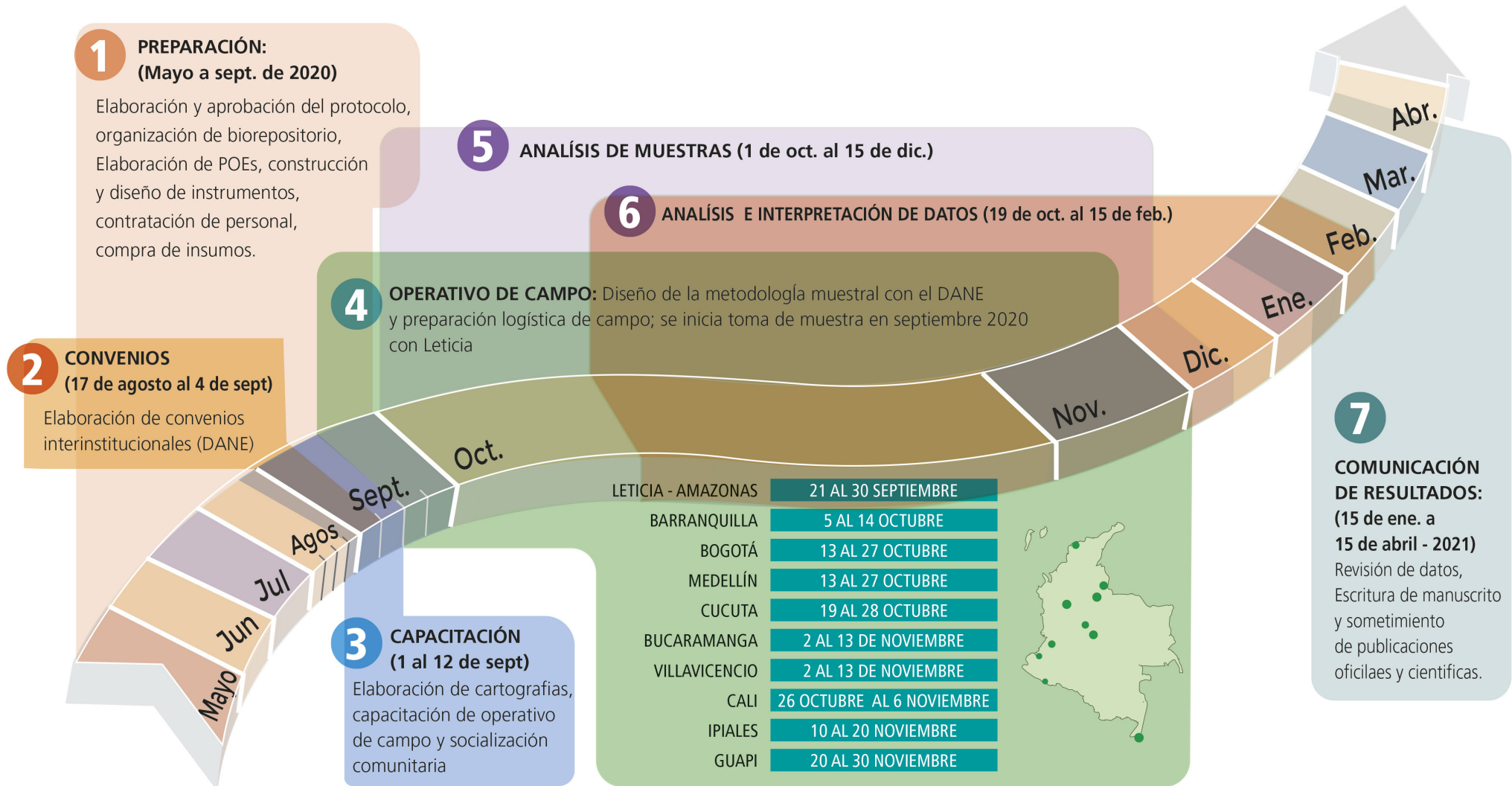
Estudio aprobado por el Comité de Ética y Comité Científico del Instituto Nacional de Salud, así como por los comités de ética de varias de las instituciones participantes. La participación de los individuos es voluntaria y sigue un proceso de consentimiento informado con asentimiento para menores de 18 años.

Referencias.

- Beck, J.R., and Shultz, E.K. (1986) The use of relative operating characteristic (ROC) curves in test performance evaluation. *Arch. Pathol. Lab. Med* **110**: 13-20.
- Cai, X., Chen, J., Hu, J., Long, Q., Deng, H., Fan, K., Liao, P., Liu, B., Wu, G., Chen, Y., Li, Z., Wang, K., Zhang, X., Tian, W., Xiang, J., Du, H., Wang, J., Hu, Y., Tang, N., Lin, Y., Ren, J., Huang, L., Wei, J., Gan, C., Chen, Y., Gao, Q., Chen, A., He, C., Wang, D., Hu, P., Zhou, F., Huang, A., Liu, P., and Wang, D. (2020) A Peptide-based Magnetic Chemiluminescence Enzyme Immunoassay for Serological Diagnosis of Corona Virus Disease 2019 (COVID-19). *medRxiv*: 2020.2002.2022.20026617.
- Corman, V.M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D.K.W., Bleicker, T., Brunink, S., Schneider, J., Schmidt, M.L., Mulders, D., Haagmans, B.L., van der Veer, B., van den Brink, S., Wijsman, L., Goderski, G., Romette, J.L., Ellis, J., Zambon, M., Peiris, M., Goossens, H., Reusken, C., Koopmans, M.P.G., and Drosten, C. (2020) Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* **25**.
- Griner, P.F., Mayewski, R.J., Mushlin, A.I., and Greenland, P. (1981) Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures. Principles and applications. *Ann. Intern. Med* **94**: 557-592.
- Li, M., Jin, R., Peng, Y., Wang, C., Ren, W., Lv, F., Gong, S., Fang, F., Wang, Q., Li, J., Shen, T., Sun, H., Zhou, L., Cui, Y., Song, H., and Sun, L. (2020) Generation of antibodies against COVID-19 virus for development of diagnostic tools. *medRxiv*: 2020.2002.2020.20025999.
- McLaren, M.L., Lillywhite, J.E., and Au, A.C. (1981) Indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): practical aspects of standardization and quality control. *Med. Lab. Sci* **38**: 245-251.
- Rothe, C., Schunk, M., Sothmann, P., Bretzel, G., Froeschl, G., Wallrauch, C., Zimmer, T., Thiel, V., Janke, C., Guggemos, W., Seilmaier, M., Drosten, C., Vollmar, P., Zwirgmaier, K., Zange, S., Wolfel, R., and Hoelscher, M. (2020) Transmission of 2019-nCoV Infection from an Asymptomatic Contact in Germany. *N. Engl. J. Med* **382**: 970-971.
- Shi, Y., Wang, Y., Shao, C., Huang, J., Gan, J., Huang, X., Bucci, E., Piacentini, M., Ippolito, G., and Melino, G. (2020) COVID-19 infection: the perspectives on immune responses. *Cell Death & Differentiation*.
- Voller, A., Bidwell, D.E., and Bartlett, A. (1976) Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull World Health Organ* **53**: 55-65.
- Xu, Z., Shi, L., Wang, Y., Zhang, J., Huang, L., Zhang, C., Liu, S., Zhao, P., Liu, H., Zhu, L., Tai, Y., Bai, C., Gao, T., Song, J., Xia, P., Dong, J., Zhao, J., and Wang, F.S. (2020) Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir. Med*.
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G.F., Tan, W., China Novel Coronavirus, I., and Research, T. (2020) A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med* **382**: 727-733.
- Collett D. Modelling Binary Data. London: Chapman and Hall; 1991.

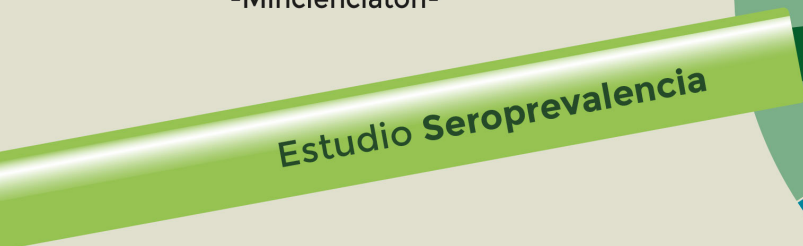
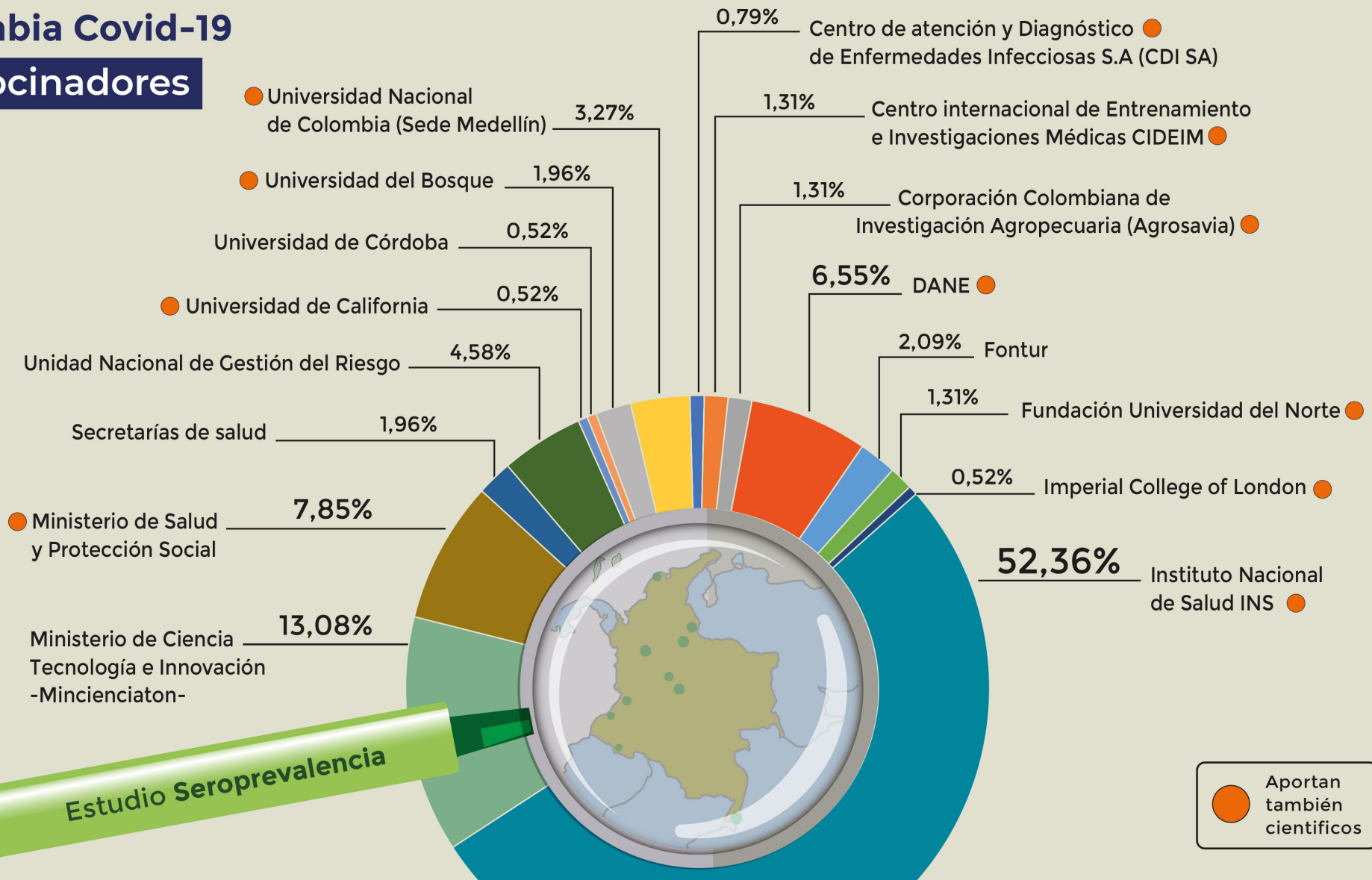
Financiación

Entidades participantes, Ministerio de Ciencia y Tecnología, DANE, Secretarías de Salud, Unidad Nacional de Gestión del Riesgo y FONTUR.



Estudio de Seroprevalencia Colombia Covid-19

Patrocinadores



 Aportan también científicos