

**GENERALIDADES DE
PRUEBAS SEROLÓGICAS
PARA DETECCIÓN DE
ANTICUERPOS CONTRA
SARS-CoV-2**

GENERALIDADES DE PRUEBAS SEROLÓGICAS PARA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA SARS-CoV-2

1. Introducción

Existen diversidad de pruebas y metodologías en el laboratorio que en conjunto con la definición de caso, sintomatología y antecedentes epidemiológicos sirven en la detección y diagnóstico de la enfermedad causada por el nuevo Coronavirus SARS-CoV-2 del 2019 (COVID-19). Las pruebas de laboratorio pueden estar basadas en la detección directa de la presencia del virus o en la detección indirecta mediante métodos serológicos detectando producción de anticuerpos como respuesta a la infección. Para detectar la presencia del virus se usa principalmente la RT-PCR en tiempo real que identifica ARN viral específico de SARS-CoV-2 y para la detección de anticuerpos se registra el uso de tres metodologías: i) quimioluminiscencia (CLIA), ii) inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y iii) inmunocromatografía (pruebas rápidas en casete). Sin embargo aún no es totalmente claro el debido uso de estas últimas, por consiguiente el presente documento pretende resumir parte de la información disponible a la fecha que sirva como evidencia para un mejor uso de estas.

2. Consideraciones

Es cada vez mayor la información sobre la naturaleza y comportamiento de la enfermedad de COVID-19, uno de los principales objetivos es poder dar un diagnóstico temprano de los infectados para limitar su propagación. El diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 comienza por la sospecha de caso mediante antecedente epidemiológico o por la aparición de síntomas, estos pueden ser variables entre la población, presentando diferentes grados de severidad. Los casos más graves normalmente se han asociado a comorbilidades y personas mayores de 60 años (1), de igual forma también se presentan casos asintomáticos

lo cual dificulta su diagnóstico. Luego de identificar la posibilidad de un caso positivo se realiza el diagnóstico mediante prueba RT-PCR identificando la presencia de ARN del virus en tracto respiratorio y se puede complementar con el uso de pruebas serológicas sirviendo como apoyo en el diagnóstico (2) (3).

Ha sido reportado y comprobado que la prueba diagnóstica RT-PCR puede dar falsos negativos, pues si bien tiene una alta sensibilidad de detectar el virus cuando se encuentra presente en la muestra, el curso de la enfermedad evidencia que no todos los pacientes excretan el virus de la misma forma ni en los mismos tiempos, los registros más frecuentes han evidenciado resultados positivos en la detección de ARN dos días antes del inicio de síntomas y hasta por 20 días después luego de su comienzo, influye el lugar anatómico muestreado, detectando mayor sensibilidad en muestras del tracto respiratorio bajo a diferencia del alto (4) (5). Por esta razón para mejorar el rendimiento diagnóstico de la RT-PCR se debería combinar con los resultados de pruebas serológicas detectando la producción de anticuerpos; diferentes estudios muestran que su uso integrado aumenta la probabilidad de lograr un diagnóstico (6) (7), pero no deben ser utilizadas como la única base para diagnosticar COVID-19.

3. Características estructurales del virus y respuesta inmune

La estructura del coronavirus está compuesta principalmente por cuatro tipos de proteínas estructurales unas más conservadas que otras entre diferentes tipos de coronavirus. Las proteínas estructurales principales son la de membrana (M), la envoltura (E), la espiga (S) y la nucleocápside (N) (Figura 1); esta última recubre el ARN del virus y lo

protege al interior de la envoltura (8) (9), las proteínas N y S hacen parte de los péptidos estructurales más inmunogénicos de este tipo de virus (10) y por tal razón son las más usadas en pruebas serológicas. Sin embargo la proteína N es más conservada entre diferentes coronavirus lo que puede generar mayor reactividad cruzada dando falsos positivos (11). La proteína S se encuentra compuesta por dos dominios el primero S1 que es responsable de la unión al receptor (RBD) de la célula a infectar que es el ACE2, y el segundo dominio es el S2 responsable de la fusión del virus al interior de la célula a infectar, esta estructura S1 es variable entre diferentes coronavirus a diferencia de la S2 la cual se conserva un poco más (12).

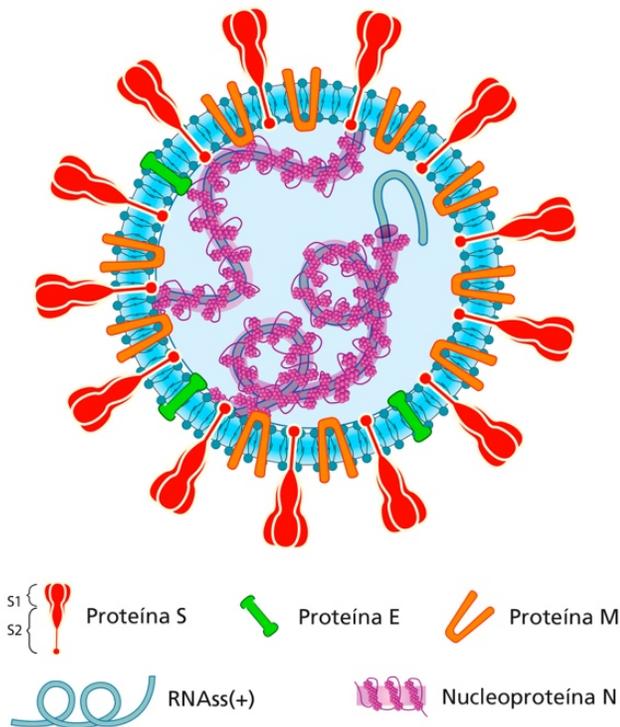


Figura 1. Esquema de las proteínas estructurales del coronavirus SARS-CoV-2

Se conoce que la primera línea de defensa durante las infecciones virales es la inmunoglobulina M (IgM) antes de la generación de inmunoglobulina (IgG) como respuesta adaptativa que son de mayor afinidad y son importantes para la inmunidad a largo plazo y la memoria inmunológica (6), por esta razón la metodología a utilizar para la detección de anticuerpos

debería permitir la discriminación entre IgM e IgG para lograr una mejor diferenciación entre los estadios de la enfermedad y lograr detectar una mayor cantidad de casos (13). Conocer la cinética de la respuesta inmune contra el COVID-19 es determinante en la evolución de la enfermedad y un gran apoyo para su diagnóstico, cada vez se conoce más al respecto pero aún faltan más estudios que detallen esta información (9), pues se ha observado una variabilidad en el comportamiento de la generación de anticuerpos en diferentes poblaciones de asintomáticos y sintomáticos, entre estos últimos varía su comportamiento dependiendo de la severidad, comorbilidades, edad, historial de infección entre otros factores muchos aún desconocidos.

En casos asintomáticos de lo poco reportado se observa que la producción de anticuerpos es bajamente detectable en la mayoría de pacientes obteniendo pruebas negativas para IgM tanto para IgG, estudios publicados en este tipo de población refieren no detección de IgM, y la IgG se detectó entre los días 12 y 35 luego de una RT-PCR positiva (14) lo que podría dificultar su uso para este tipo de población. A diferencia los casos sintomáticos presentan producción de anticuerpos detectables en promedio alrededor del día 7 o 14 después del inicio de los síntomas, esto puede variar entre pacientes sintomáticos, se han reportado casos con producción de anticuerpos desde el primer día de síntomas y en algunos casos severos se presenta producción de anticuerpos semanas después; y entre los estudios realizados la diferencia entre la producción de IgM seguida de IgG va de 1 a 9 días e incluso se ha detectado como se desarrollan al mismo tiempo (Figura 2) (4) (6) (7) (15) (16) (17) (18). Como se conocen hay estructuras semejantes entre algunos coronavirus algunos anticuerpos desarrollados en personas con infecciones pasadas con otros coronavirus pueden identificar parte de las estructuras del SARS-CoV-2 los cuales pueden ser identificados por pruebas rápidas serológicas produciendo falsos positivos (19).

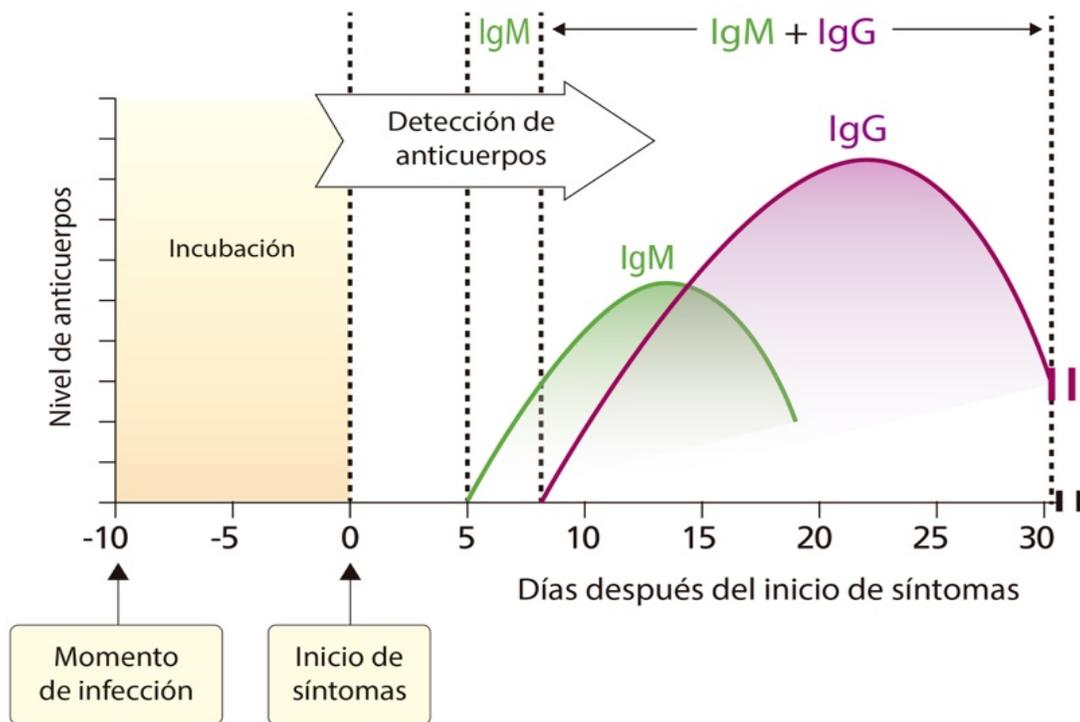


Figura 2. Representación de la cinética de producción de anticuerpos IgM e IgG contra SARS-CoV-2. El momento de infección en promedio es de 5 días antes del inicio de síntomas pero puede ser mucho antes. Los tiempos de inicio de la producción de anticuerpos se establecieron tomando en cuenta los promedios reportados en diferentes estudios citados en el texto. Según el análisis de los datos reportados la producción de anticuerpos es detectable en la mayoría de individuos al día 11 luego de aparición de síntomas.

4. Métodos en la detección de anticuerpos

Como ya fue mencionado anteriormente entre las metodologías utilizadas para la detección de anticuerpos en sangre de COVID-19 se encuentran la quimioluminiscencia (CLIA), inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) e inmunocromatografía (pruebas rápidas).

4.1 Ensayos de flujo lateral inmunocromatográfico (pruebas rápidas):

Es un ensayo cualitativo. Se desarrolla en un dispositivo portátil al cual se le coloca un volumen de muestra aproximado entre $10 \pm 5 \mu\text{L}$, esta es absorbida por una almohadilla y posteriormente con ayuda de buffer tampón de corrida es transportada mediante flujo lateral cromatográfico a través de una tira de nitrocelulosa. En

el extremo principal de la tira se encuentra dispuesto un conjugado formado por un reactivo colorimétrico (usualmente oro coloidal) que se conjuga, dependiendo el método de fábrica, ya sea con antígenos virales o con anticuerpos anti IgG o IgM humano, si la muestra analizada contiene anticuerpos contra el virus estos reconocerán el antígeno viral uniéndose a este, o si se parte de anticuerpos anti IgG o IgM humano los anticuerpos de la muestra serán reconocidos por estos, este conjugado seguirá transportándose por la tira hasta llegar a una zona donde los conjugados son capturados por antígenos virales o anticuerpos anti IgG o IgM humano dependiendo la nominación del kit o el tipo de conjugado, al retener estos se vuelven visibles al ojo humano formando una banda de color. El resto de partículas sigue transportándose por la tira hasta la zona de control en el borde inferior de la membrana, alcanzada esta, será visible una banda de color la cual

indica que la muestra se desplazó hasta el final del dispositivo indicando ser una prueba válida, si esta banda no es visible la prueba queda invalidada (Figura 3).

Se Se ha evidenciado que estas pruebas pueden dar falsos negativos y falsos positivos, esto debido a diferentes factores, los falsos negativos están mayormente asociados al curso natural de la enfermedad dependiendo la respuesta inmune individual, si la prueba se realiza antes de los primeros

11 días luego del inicio de los síntomas es muy probable arroje falsos negativos por que las concentraciones de anticuerpos en sangre no alcanzan a ser detectados, de igual forma se ha observado que hay diferencia significativa en la producción de anticuerpos en personas sintomáticas dependiendo su gravedad y personas asintomáticas como ya se nombró anteriormente (5). Los falsos positivos se presentan por reacciones cruzadas de anticuerpos que reconocen antígenos virales similares debido a las regiones conservadas entre coronavirus.

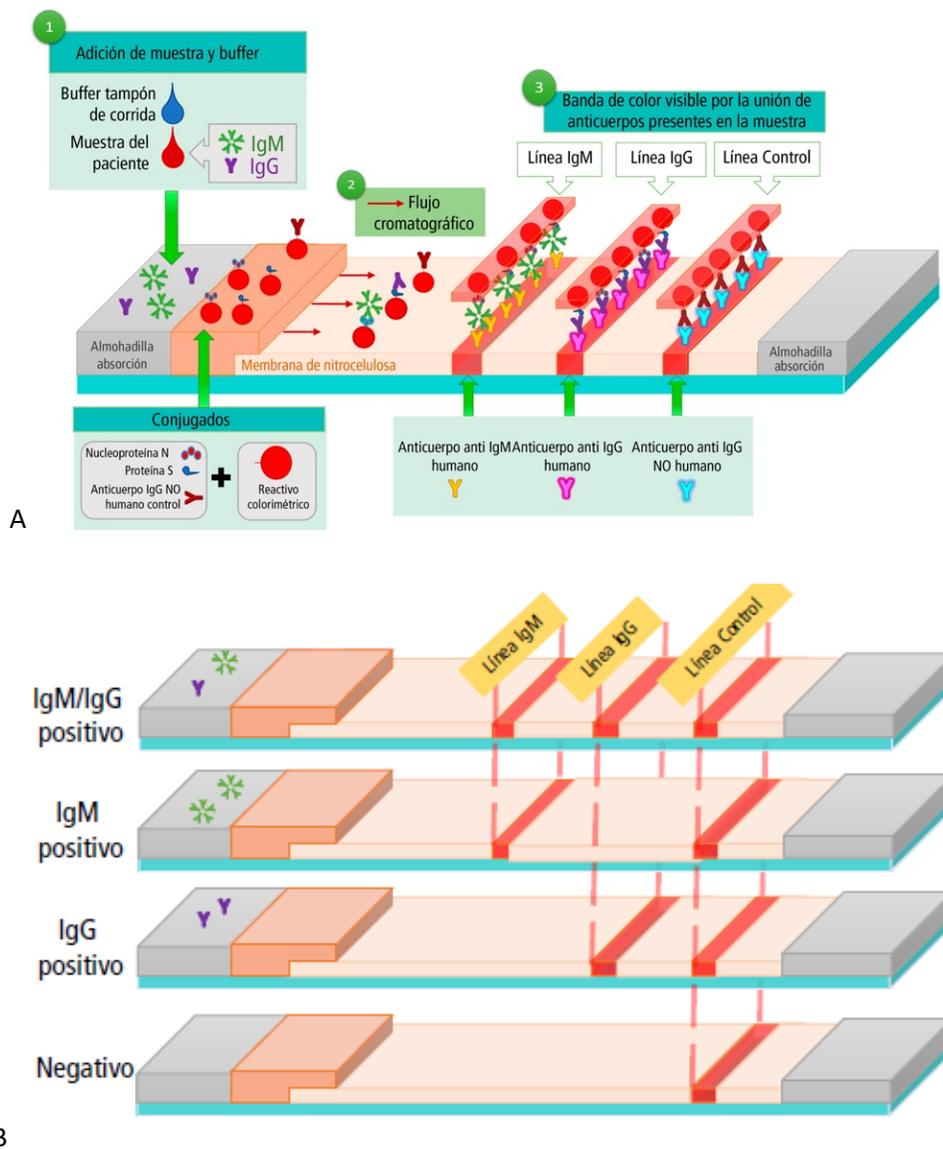


Figura 3. Esquematización de prueba rápida de flujo lateral inmunocromatográfico para la detección de anticuerpos IgM e IgG. A) Fundamento del método. B) lectura de resultados prueba rápida.

4.2 ELISA

Es un ensayo cuantitativo, al permitir dar un resultado relativo de la concentración de anticuerpos mediante dilución de la muestra (titulación de anticuerpos). Existen tres diferentes tipos de ELISA directo, indirecto y tipo sándwich, para la detección de anticuerpos los utilizados son los dos últimos. Esta técnica se realiza en placas de microtitulación. Para el ELISA indirecto los pozos de la placa se recubren con antígeno del virus, posteriormente se adiciona la muestra del paciente, si los anticuerpos están presentes en la muestra se unirán a los antígenos fijados previamente, luego de esto se añade un conjugado conformado por una enzima (Ej. peroxidasa) unida de forma covalente a un anticuerpo que reconoce la inmunoglobulina que de estar presente se unirá, y finalmente se adiciona al pozo un sustrato cromógeno el cual reacciona con la enzima del conjugado y produce un cambio de color, el cual es

medible con un equipo específico de lectura (espectrofotómetro) (Figura 4). El ELISA tipo sándwich es una variación del ELISA directo, los antígenos del virus no están directamente fijados a la superficie de la placa de microtitulación sino que se encuentran unidos a anticuerpos específicos del virus fijados con anterioridad a la placa. Estas pruebas permiten dar un resultado relativo de la concentración de anticuerpos mediante dilución de la muestra dando un resultado de titulación. Para cada montaje se colocan controles positivos y negativos para validar que el montaje fue adecuado.

La mayoría de estudios que evalúan la cinética de producción de anticuerpos frente a COVID-19 han utilizado esta metodología, usando antígenos recombinantes de la proteína S del virus dominio de unión al receptor (RBD) y proteína N (4), observando una mayor sensibilidad mediante esta técnica.

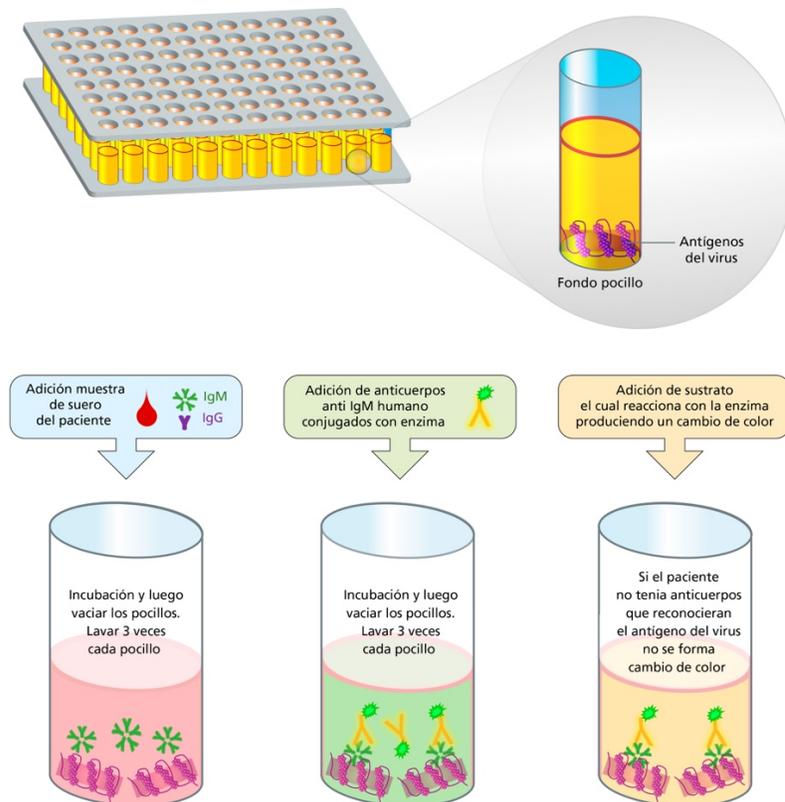


Figura 4. Esquematización de los pasos del ELISA indirecto.

4.3 CLIA

Este ensayo tiene como base el mismo fundamento de la prueba ELISA anteriormente explicada, estas dos se diferencian principalmente por el método usado en la detección de la reacción final, la enzima usada en el ELISA reacciona con un sustrato cromógeno y produce un cambio de color visible, a diferencia la enzima usada en el CLIA produce una reacción quimioluminiscente (sustrato luminiscente) emitiendo fotones produciendo luz en vez de un cambio de color. Esta tiene más ventajas siendo mucho más sensible pues permite la detección de concentraciones de anticuerpo más bajas, los sustratos utilizados tienen una vida útil mayor y los tiempos de incubación son más reducidos que en los métodos de ELISA. Su lectura solo puede realizarse con un lector de quimioluminiscencia.

5. Validación secundaria de pruebas rápidas

La validación secundaria de los ensayos diagnósticos evalúa el desempeño del método y establece que estos cumplan los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas. Debido a la emergencia sanitaria por COVID-19 hay una gran oferta de pruebas rápidas en el mercado, antes de ser utilizadas dentro del país estas deben ser validadas y demostrar su correspondencia frente a la prueba de referencia. Estas deben cumplir con el proceso de validación y evaluación donde se evidencie sus características de desempeño sensibilidad, especificidad, exactitud, precisión, límite de detección, entre otros (20).

Para realizar la validación de pruebas rápidas se debe establecer como prueba de referencia o Gold estándar la RT-PCR específica para ARN de SARS-CoV-2, la cual para su introducción en la Región de las Américas fue validada por el Centro para el Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC). Esta prueba muestra una sensibilidad para el gen E de 3,2 copias de ARN / reacción (IC del 95%: 2,2 –6.8) y para el gen RdRP 3.7 copias de ARN / reacción (IC 95%: 2.8–8.0), y también

se evidencio buena especificidad según el diseño realizado (21).

Según el lineamiento para el uso de pruebas diagnósticas de SARS-CoV-2 (COVID-19) en Colombia realizado por el Ministerio de Salud y Protección Social en su última versión (3), las pruebas rápidas deben ser validadas con base en el protocolo del Instituto Nacional de Salud (INS) documento realizado en conjunto con el Instituto de Evaluación de Tecnologías en Salud (IETS). Este protocolo de validación secundaria para pruebas rápidas de COVID-19 se encuentra disponible en la página web del INS (http://www.ins.gov.co/Pruebas_Rapidas/Forms/AllItems.aspx).

6. Adquisición de pruebas rápidas en Colombia

Al adquirir una prueba rápida se debe verificar que cuente con registro específico en INVIMA y tenga un buen desempeño luego de la validación secundaria correspondiente realizada por las instituciones avaladas para tal fin. Posteriormente su uso deberá definirse de acuerdo con el escenario epidemiológico en el que se requiera utilizar, todo esto de acuerdo a los resultados obtenidos de tal validación. Al usar pruebas rápidas se debe tener en cuenta lo estipulado en el lineamiento para el uso de pruebas diagnósticas de SARS-CoV-2 (COVID-19) en Colombia realizado por el Ministerio de Salud y Protección Social en su última versión (3).

7. Aplicaciones o posibles usos

El uso de las pruebas rápidas que ha sido registrado y comprobado por diferentes autores es principalmente como apoyo diagnóstico de SARS-CoV-2 junto con RT-PCR para fortalecer el resultado de forma eficiente cuando el paciente presente síntomas y el inicio del mismo esté por encima de 11 días. Las pruebas rápidas no se deben usar como única prueba en el diagnóstico. Su uso individual debe ser efectuado cuando se sospecha de un caso positivo, basado en antecedentes

epidemiológicos o de forma racional junto con datos clínicos, bajo condiciones de bioseguridad al momento de tomar la muestra y la necesidad de acompañamiento de pruebas moleculares que permitan determinar de forma general el curso de la enfermedad de acuerdo a la cinética de anticuerpos y el estado de infectividad del individuo.

En pacientes SARS-CoV-2 positivos por RT-PCR que son asintomáticos se presenta una baja sensibilidad en el uso de pruebas rápidas como ya fue nombrado en este documento pudiendo obtener falsos negativos, por tal motivo su uso como prueba única para la clasificación de un paciente no es recomendable en este tipo de población. En la Tabla 1 se puede observar interpretaciones diferentes para resultados en el uso de RT-PCR y pruebas de anticuerpos IgM e IgG para SARS-Cov-2.

RESULTADO DE LABORATORIO			SIGNIFICADO CLÍNICO COVID-19
RT-PCR	IgM	IgG	
-	-	-	Negativo
+	-	-	Positivo (fase aguda)
+	+	-	Positivo (infección reciente)
+	-	+	Positivo
+	+	+	
	+	-	Probable positivo (infección reciente)^
	+	+	
	-	+	Probable positivo^ o infección resuelta*
-	-	+	Recuperado infección resuelta*

Tabla 1. Interpretación de los posibles resultados por laboratorio en la detección de ARN y/o anticuerpos SARS-Cov-2.

*No se puede asegurar producción de anticuerpos neutralizantes contra SARS-Cov-2. ^Se puede presentar reactividad cruzada.

En el momento que se determine que una prueba serológica tenga la capacidad de medir la presencia de anticuerpos neutralizantes contra SARS-CoV-2 que

confieran protección y mediante su uso se pueda inferir una inmunidad, adicionalmente de alta sensibilidad y especificidad dichas pruebas podrían ser útiles en los siguiente escenarios (15) (22) (23):

- Para realizar un tamizaje en la población identificando el porcentaje de personas ya inmunes, y poder usar esta información como insumo para planificar las necesidades futuras de atención médica, teniendo en cuenta los recursos que fueron necesarios para atender este porcentaje.
- Para determinar si el plasma de una persona tiene anticuerpos específicos contra el virus que se pueda emplear para tratamiento terapéutico contra COVID-19, de esta forma determinar quienes pueden ser potenciales donantes de plasma.
- Otro uso del que se habla es de los llamados "pasaportes inmunes", al inferir si el individuo presenta anticuerpos contra el virus se puede habilitar su regreso a la vida laboral mitigando el riesgo de infección debido a la aparente protección inmune que evidencia.

A futuro cuando se vaya a implementar una vacuna, estas pruebas pueden ser usadas en la evaluación individual del estado serológico de la persona indicando la necesidad de dosificar o no la vacuna, optimizando recursos al establecer la verdadera población no inmune, de igual forma para evaluar si la vacuna es efectiva o si tiene efectividad en su entorno se podría implementar su uso.

8. Estudios futuros

Es necesario identificar los antígenos que reconozcan anticuerpos con poder neutralizante del virus, de igual forma antígenos que no produzcan reactividad cruzada o que esta sea mínima y aplicar su uso en pruebas rápidas para obtener mejor especificidad y sensibilidad. Así mismo evaluar o evidenciar si se produce inmunidad protectora en individuos sintomáticos como asintomáticos e identificar qué diferencias se pueden presentar entre estas poblaciones y por cuánto tiempo pueden tener inmunidad.

Referencias

- (1). Trujillo, C. H. S. (2020). Consenso colombiano de atención, diagnóstico y manejo de la infección por SARS-COV-2/COVID-19 en establecimientos de atención de la salud-Recomendaciones basadas en consenso de expertos e informadas en la evidencia. *Infectio*, 24(3).
- (2). Centro para el Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC). (2020) GUIDANCE ON INTERPRETING COVID-19 TEST RESULTS. Recuperado de <https://www.whitehouse.gov/wp-content/uploads/2020/05/Testing-Guidance.pdf>.
- (3). Ministerio de salud y protección social. (2020) Lineamientos para el uso de pruebas diagnósticas de SARS-cov-2 (COVID-19) en Colombia (Versión 3) Recuperado de <https://www.minsalud.gov.co/Ministerio/Institucional/Procesos%20y%20procedimientos/GIPS21.pdf>
- (4). Zhao, J., Yuan, Q., Wang, H., Liu, W., Liao, X., Su, Y., ... & Qian, S. (2020). Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019.
- (5). Lee, Y. L., Liao, C. H., Liu, P. Y., Cheng, C. Y., Chung, M. Y., Liu, C. E., ... & Hsueh, P. R. (2020). Dynamics of anti-SARS-Cov-2 IgM and IgG antibodies among COVID-19 patients. *Journal of Infection*.
- (6). Li Z, Yi Y, Luo X, Xiong N, Liu Y, Li S, et al. Development and Clinical Application of A Rapid IgM-IgG Combined Antibody Test for SARS-CoV-2 Infection Diagnosis. *J Med Virol* [Internet]. 2020 Feb 27; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32104917>
- (7). Guo, L., Ren, L., Yang, S., Xiao, M., Chang, D., Yang, F., ... & Zhang, L. (2020). Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19). *Clinical Infectious Diseases*.
- (8). Rota, P. A., Oberste, M. S., Monroe, S. S., Nix, W. A., Campagnoli, R., Icenogle, J. P., ... & Tong, S. (2003). Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *science*, 300(5624), 1394-1399.
- (9). Infantino, M., Damiani, A., Gobbi, F. L., Grossi, V., Lari, B., Macchia, D., ... & Cappelletti, P. (2020). Serological assays for SARS-CoV-2 infectious disease: benefits, limitations and perspectives. *Isr Med Assoc J*, 22, 203-210.
- (10). Qiu, M., Shi, Y., Guo, Z., Chen, Z., He, R., Chen, R., ... & Song, Y. (2005). Antibody responses to individual proteins of SARS coronavirus and their neutralization activities. *Microbes and infection*, 7(5-6), 882-889.
- (11). Gralinski, L. E., & Menachery, V. D. (2020). Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses*, 12(2), 135.
- (12). Belouzard, S., Millet, J. K., Licitra, B. N., & Whittaker, G. R. (2012). Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses*, 4(6), 1011-1033.
- (13). Trujillo, C. H. S. (2020). Resumen: Consenso colombiano de atención, diagnóstico y manejo de la infección por SARS-COV-2/COVID-19 en establecimientos de atención de la salud. *Infectio*, 24(3).
- (14). Lee, Y. L., Liao, C. H., Liu, P. Y., Cheng, C. Y., Chung, M. Y., Liu, C. E., ... & Hsueh, P. R. (2020). Dynamics of anti-SARS-Cov-2 IgM and IgG antibodies among COVID-19 patients. *Journal of Infection*
- (15). Organización Mundial de la Salud-OMS. (2020). Interpretación de resultados de laboratorio para diagnóstico de COVID-19, Mayo 06 de 2020.
- (16). Sun, B., Feng, Y., Mo, X., Zheng, P., Wang, Q., Li, P., ... & Zhang, F. (2020). Kinetics of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG responses in COVID-19 patients. *Emerging Microbes & Infections*, (just-accepted), 1-36.
- (17). Huang, A. T., Garcia-Carreras, B., Hitchings, M. D., Yang, B., Katzelnick, L., Rattigan, S. M., ... & Lessler, J. (2020). A systematic review of antibody mediated immunity to coronaviruses: antibody kinetics, correlates of protection, and association of antibody responses with severity of disease. *medRxiv*.
- (18). Wölfel, R., Corman, V. M., Guggemos, W., Seilmaier, M., Zange, S., Müller, M. A., ... & Hoelscher, M. (2020). Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*, 581(7809), 465-469.
- (19). Wan, W. Y., Lim, S. H., & Seng, E. H. (2020). Cross-reaction of sera from COVID-19 patients with SARS-CoV assays. *medRxiv*
- (20). Organización Mundial de la Salud-OMS. (2020). Advice on the use of point-of-care immunodiagnostic tests for COVID-19. 8 April 2020.
- (21). Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K., ... & Mulders, D. G. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*, 25(3), 2000045.
- (22). Casadevall, A. & Pirofski, L.-A. The convalescent sera option for containing COVID-19. *J. Clin. Invest.* 130, 1545–1548 (2020)
- (23). Bryant, J. E., Azman, A. S., Ferrari, M. J., Arnold, B. F., Boni, M. F., Boum, Y., ... & Wu, J. T. (2020). Serology for SARS-CoV-2: Apprehensions, opportunities, and the path forward. *Science Immunology*, 5(47).

Elaborado por:

Marcela Mercado Reyes. Bac, MS Epidemiología Clínica. Directora de Investigación en Salud Pública (E) Instituto Nacional de Salud.

Gabriela Zabaleta. Bac, Micro Ind, MS(c) Epidemiología. Grupo de Microbiología. Subdirección de Investigación Científica y Tecnológica INS

Diseño e ilustración: Alexander Casas Castro.