

# Consenso de grupo *Ad-hoc* sobre recomendaciones para la evaluación y controles de calidad para el diagnóstico molecular y serológico de la infección humana por SARS CoV-2

Jorge E. Gomez Marin<sup>1,\*</sup>, Jaime Castellanos<sup>2</sup>, Alfonso J. Rodriguez-Morales<sup>3</sup>, Jaime A. Cardona-Ospina<sup>4</sup>, Jorge Eduardo Forero Duarte<sup>5</sup>, Salim Mattar<sup>6</sup>, Germán Esparza<sup>7</sup>

Grupo *Ad-hoc* de la Asociación Colombiana de Infectología y la Asociación Colombiana de Virología

## Resumen

Se formulan recomendaciones de un grupo de consenso de expertos sobre los criterios para evaluar el desempeño diagnóstico (tamaño y selección de muestras para sensibilidad y especificidad analíticas, criterios para establecer límites de detección, criterios para establecer el estándar de oro para las serologías) que deberían ser tenidos en cuenta al evaluar y validar las pruebas diagnósticas para SARS CoV-2. Con el propósito de asegurar la calidad de las pruebas serológicas a utilizar en el país, se recomienda la participación en un programa de control de calidad externo, que garantice la idoneidad y desempeño en la realización de las pruebas diagnósticas serológicas y moleculares durante esta pandemia, ya que su uso tiene profundas implicaciones para las medidas de intervención clínicas individuales y de seguimiento y control en salud pública.

**Palabras clave:** Pruebas diagnósticas; SARS CoV-2, COVID 19, control calidad laboratorio

## **Ad-hoc group for Consensus recommendations of the evaluation and quality control for molecular and serological diagnostics tests for SARS CoV-2 human infection**

## Abstract

We formulate recommendations from a consensus working group on the criteria to evaluate the diagnostic performance (size and criteria of selection of samples to determine sensitivity, analytical specificity, criteria for limit of detection, criteria for gold standard to evaluate serological assays) that should be taken into account during the evaluation and validation/verification of diagnostic tests for SARS CoV-2 infection. A national external quality control program should be established to guarantee the suitability and performance of these diagnostic serological and molecular tests during this pandemic, that will have deep implications for decisions on clinical and public health.

**Key words:** laboratory diagnosis; SARS CoV-2; COVID 19; laboratory quality control

1 Grupo de Investigación en Población Infantil (IPI), Hospital Universitario San Juan de Dios, Armenia, Quindío, Colombia.

2 Grupo de Estudio en Parasitología Molecular (GEPAMOL), Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Quindío, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-6472-3329>

3 Director Laboratorio de Virología, Universidad El Bosque, Bogotá - Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-7052-7938>

4 Grupo de Investigación Salud Pública e Infección, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Risaralda, Colombia.

Grupo de Investigación Biomedicina, Facultad de Medicina, Fundación Universitaria Autónoma de las Américas, Sede Pereira, Pereira, Risaralda, Colombia.

Grupo de Investigación Infección e Inmunidad, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Risaralda, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-9773-2192>

5 Grupo de Investigación Biomedicina, Facultad de Medicina, Fundación Universitaria Autónoma de las Américas, Sede Pereira, Pereira, Risaralda, Colombia.

Grupo de Investigación Salud Pública e Infección, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Risaralda, Colombia

Grupo de Investigación Infección e Inmunidad, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Risaralda, Colombia.

Grupo de Investigación Infecciones Emergentes y Medicina Tropical, Instituto para la Investigación en Ciencias Biomédicas - Sci-Help, Pereira, Risaralda, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-3996-2293>

6 Escuela de Microbiología. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-9289-2314>

7 Universidad de Cordoba, Instituto de Investigaciones Biologicas del Tropico, Monteria, Colombia. <https://orcid.org/0000-0003-0526-4630>

Programa de aseguramiento de Calidad, PROASECAL SAS Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-8395-6803>

\* Autor para correspondencia

Correo electrónico: [jegomez@uniquindio.edu.co](mailto:jegomez@uniquindio.edu.co)

Cómo citar este artículo: J.E. Gomez-Marin, *et al.* Consenso de grupo *Ad-hoc* sobre recomendaciones para la evaluación y controles de calidad para el diagnóstico molecular y serológico de la infección humana por SARS CoV-2. *Infectio* 2020; 24(3) Suplemento COVID 19: 5-10 <http://dx.doi.org/10.22354/in.v24i3.868>

## Introducción

La pandemia por SARS-CoV-2 corresponde a un agente viral nuevo para el hombre y por lo tanto ha sido necesario el desarrollo de pruebas diagnósticas de emergencia<sup>1</sup>. Las primeras que se desarrollaron, fueron las que detectaban el material genético del virus en muestras de secreciones respiratorias las cuales se convirtieron en el estándar de oro para el diagnóstico<sup>2</sup>. En la web de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se recogen los protocolos diagnósticos recomendados<sup>3</sup>. La oficina de medicamentos y alimentos de Estados Unidos (FDA) ha lanzado una serie de políticas no vinculantes, para autorizar la comercialización de emergencia de productos diagnósticos que sirven como guía para los laboratorios clínicos, industriales y el personal de la FDA<sup>4</sup>. La Sociedad Americana de Microbiología (ASM) también ha presentado unas recomendaciones para evaluación de pruebas diagnósticas<sup>5</sup>. Frente a esta situación de necesidades urgentes para contar con pruebas diagnósticas, es crucial contar con lineamientos claros que definan los estándares de oro frente a los cuales se deben establecer los valores de sensibilidad y especificidad de los productos diagnósticos que están siendo comercializados en Colombia y de esta manera evitar que se inviertan recursos escasos en pruebas que con desempeño subóptimo<sup>6</sup>. Por esta razón la Asociación Colombiana de Infectología (ACIN) y la Asociación Colombiana de Virología (ACV) crearon un grupo de trabajo con el fin de plantear lo que se considera una posición de expertos para la evaluación y el control de calidad de las pruebas diagnósticas serológicas y moleculares. Dichas pruebas diagnósticas incluyen tanto estuches comerciales como las recomendaciones de secuencias de iniciadores (*primers*) que se ofertan en paquete por algunos proveedores de reactivos para pruebas moleculares. También se discute el protocolo casero (*in-house*) del Instituto de Virología Charité de Berlín, el cual estandarizó en Colombia el Instituto Nacional de Salud (INS). Conocer la información adecuada en este aspecto, tiene profundas implicaciones dado que las medidas de salud pública, las decisiones de manejo de pacientes críticos, de la evolución de los casos en tratamiento y conductas de aislamiento tienen como base pruebas de diagnóstico que deben cumplir con los más altos estándares de calidad. El presente documento es un consenso informal de recomendaciones por expertos sobre cuáles deben ser los criterios de evaluación, validación y control externo para las pruebas diagnósticas de infección por SARS CoV-2 y está dirigido a los productores de pruebas, a los laboratorios que las realizan y a los evaluadores de organismos reguladores de los gobiernos a nivel nacional. En la sección 2 se precisan las indicaciones de los diferentes tipos de pruebas disponibles y en la sección 3 se plantean las recomendaciones de criterios de evaluación y control de calidad externo. Teniendo en cuenta que la pandemia por SARS CoV-2 es una situación dinámica y que la evidencia científica se está generando en forma permanente, este documento estará sujeto a actualizaciones y ajustes en la medida en que aparezca nueva información.

## Definición del ámbito de aplicación de las pruebas

Las pruebas de diagnóstico (Figura 1) para la infección por SARS-CoV-2 pueden tener como objetivo:

- Detección del ARN viral
- Detección de nucleoproteína viral (antígeno)
- Detección de anticuerpos específicos tipo IgM, IgG o IgA o pruebas que detectan simultáneamente anticuerpos IgG/IgM

Cada una tiene principios y detectan analitos diferentes (ácidos nucleicos o proteínas del virus o anticuerpos producidos por el hospedero como parte de su respuesta inmune) por lo tanto no es correcto realizar comparaciones de sensibilidad y especificidad entre ellas. Por esa misma razón su utilidad y aplicación debería tener lugar en contextos específicos de diagnóstico clínico, de tamizaje poblacional y de salud ocupacional. Adicionalmente las propiedades de sensibilidad y especificidad pueden variar de una prueba a otra, por lo tanto, cuando se desean hacer recomendaciones basadas en cinética de anticuerpos en diferentes estadios de la infección, es necesario tener en cuenta que la cinética varía de acuerdo a la prueba, algunas pueden tener mayor sensibilidad en determinados momentos y por lo tanto cualquier inferencia sobre aparición de anticuerpos en diferentes momentos de la infección, debe tener en cuenta el método de detección. En la Figura 2 se pueden observar las curvas de evolución de sensibilidad y los intervalos de confianza 95% (IC95%) calculados a partir de varios estudios<sup>7-10</sup> que han fundamentado indicaciones sobre el comportamiento y recomendaciones sobre la realización de pruebas en diferentes estadios de infección<sup>11-13</sup>. No obstante, estos estudios tienen estimados muy amplios de IC 95%. Sólo uno de ellos presentó intervalos de confianza que permiten estimar la incertidumbre de las recomendaciones. Esto hace urgente establecer tamaños de muestra suficientes para poder definir recomendaciones sobre qué pruebas y en qué momentos deben hacerse.

### **Aplicaciones para detección del genoma viral del SARS CoV-2 por reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa reversa (RT-PCR)**

La prueba de detección del ARN del SARS-CoV-2 requiere una prueba RT- qPCR y su interés es:

- a. Detectar contactos de casos confirmados sintomáticos o asintomáticos
- b. Realizar seguimiento a los casos positivos, y evaluar o confirmar casos sospechosos y definir conductas de aislamiento, o en la confirmación de casos negativos iniciales
- c. Diagnóstico diferencial con otras infecciones respiratorias o detectar coinfecciones usando paneles para múltiples patógenos respiratorios

En principio esta prueba debe tener especificidad del 100%, pero su sensibilidad varía dependiendo de factores críticos como el diseño de los genes diana en la amplificación, la duración del seguimiento de los casos negativos, y factores en el procesamiento de la muestra, por lo cual su negatividad no descarta una infección en inicio<sup>14-16</sup>.

### Pruebas que detectan antígeno viral

Existen pruebas inmunocromatográficas que detectan proteínas del virus, sus aplicaciones serían similares a las que detectan el ARN. Sin embargo, está por establecer en qué momento son positivas y las características operativas de estas pruebas. En este consenso no serán discutidas dada la escasa información existente sobre ellas.

### Aplicaciones de las pruebas serológicas para detección de anticuerpos IgG o de pruebas combinadas IgG/IgM

Existen diferentes métodos para la detección de IgG tales como la inmunocromatografía, la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA, esta última parece ser más sensible que las otras<sup>17,18</sup>. Las posibles aplicaciones de este tipo de pruebas son:

- Tamizaje poblacional para saber el porcentaje de población expuesto y tomar decisiones sobre levantamientos parciales o definitivos de cuarentena o medidas de contención
- Seleccionar población que puede regresar al trabajo al identificar aquellos con prueba de anticuerpos positivos. Sobre este punto es necesario esperar los resultados de evaluación basada en evidencia de la calidad de protección de los anticuerpos<sup>19</sup>.
- Estudios de seroprevalencia para determinar variables

epidemiológicas de interés en salud pública, especialmente en estudios de carga y costos de la enfermedad, como la tasa de ataque y el factor de expansión.

### Aplicaciones de las pruebas serológicas para detección de anticuerpos IgM

- Detección de pacientes con infección reciente
- Clasificación del estado de infección en conjunto con la medición de IgG específicos en agudo o convaleciente<sup>20</sup>.

### Recomendaciones de criterios para evaluación de pruebas

#### Para las pruebas de RT-qPCR SARS CoV 2

El grupo considera se pueden tomar como recomendaciones de base los criterios de FDA con las siguientes precisiones:

- Límite de detección (LoD):** Para establecer esta se debe inocular ARN artificial (sintetizado) o ARN de espécimen biológico, cuantificados, en una muestra de pacientes (lavado broncoalveolar o esputo) o en medio de transporte viral. Se recomienda realizar diluciones 1:2 seriadas con tres replicas por dilución y luego confirmar la amplificación final con 20 réplicas. La LoD es la concentración más baja en la cual el replicado 19/20 es positivo<sup>5</sup>.
- Sensibilidad analítica:** Se deben realizar análisis *in silico* de las secuencias de los cebadores y sondas

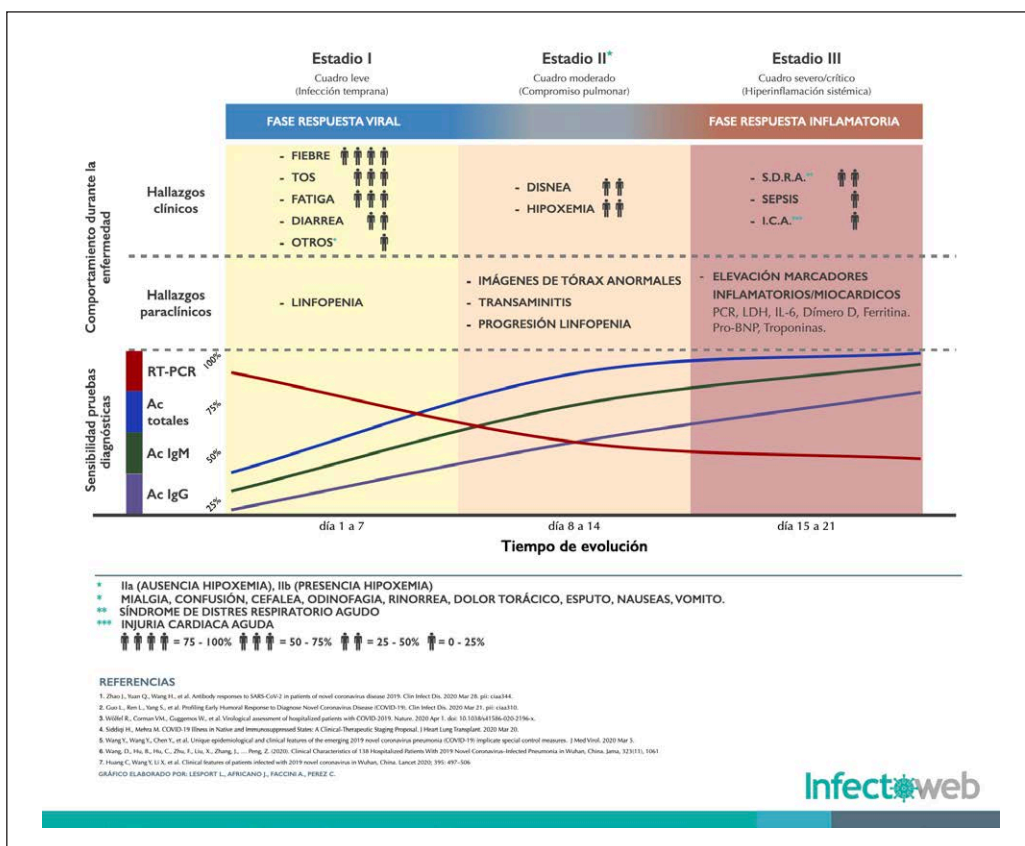


Figura 1. Comportamiento clínico, paraclínico y pruebas diagnósticas en COVID-19. Imagen cedida gentilmente por el grupo Infectoweb de Bogotá. Autores: Luis Pablo Lespors, Javier Africano, Álvaro A. Faccini-Martínez y Carlos Eduardo Pérez.

- **Reactividad cruzada (especificidad analítica):** Se debe verificar la lista de organismos según la Tabla 1, los cuales se deben analizar *in silico* y en lo posible *in vitro*.

**Tabla 1.** Lista de organismos recomendados para análisis de reactividad cruzada

Patógenos de la misma familia de virus	Organismos con alta probabilidad de circulación
Coronavirus humano 229E	Adenovirus (e.g. C1 Ad. 71)
Coronavirus humano OC43	Metapneumovirus humano (hMPV)
Coronavirus humano HKU1	Parainfluenza 1-4
Coronavirus humano NL63	Influenza A y B
SARS-coronavirus (no circula en Colombia)	Enterovirus (ejemplo: EV68)
MERS-coronavirus (no circula en Colombia)	Virus Sincitial Respiratorio
	Rinovirus
	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
	<i>Haemophilus influenzae</i>
	<i>Legionella pneumophila</i>
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
	<i>Streptococcus pyogenes</i>
	<i>Bordetella pertussis</i>
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
	<i>Pneumocystis jirovecii</i> (PJP)
	Pool de lavado nasal humano que represente microbiota tracto respiratorio
	<i>Candida albicans</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
	<i>Staphylococcus salivarius</i>

\* Para ensayos *in vitro* se recomiendan, concentraciones de 10<sup>6</sup> UFC/ml o mayores para bacterias y 10<sup>5</sup> UFP/ml o mayores para virus.

- **Análisis de interferencia microbiana:** Si el análisis *in silico* muestra homología  $\geq 80\%$  con otros microorganismos se deben realizar estudios de interferencia con sondas para el microorganismo con el cual hay homología. Se deben hacer mínimo tres replicados de un inóculo 3x de la concentración LoD de SARS-CoV-2 y con alto nivel de interferencia del microorganismo completo o ácido nucleico.
- **Análisis de interferencia con sustancias endógenas:** Se recomienda método de Boom y métodos de extracción basados en columna (21).
- **Utilización de muestras clínicas:** Se recomienda realizar pruebas con por lo menos 30 muestras clínicas reactivas y 30 no-reativas seleccionadas de manera aleatoria

enmascarada. Las muestras se pueden fabricar utilizando matrices clínicas limpias y contaminadas artificialmente con ARN sintético. Se deben informar los resultados de LoD con diluciones seriadas en base 2.

- **Estuches para extracción de ARN Viral.** La obtención de ARN viral de calidad es un paso crítico en la prueba de qRT-PCR. Existen diferentes métodos de extracción que pueden ser manuales o automatizados, con perlas magnéticas, diferentes tipos de columnas o con adición de tampón de lisis que libere el ácido nucleico. Cualquiera que sea el método de extracción, es recomendable que sean evaluados y optimizados para la extracción de SARS-CoV-2 en diferentes tipos de muestras.

### Recomendaciones para la evaluación de pruebas serológicas para IgG, IgM o IgA

Las pruebas de anticuerpos buscan detectar la respuesta inmune humoral de los pacientes cuyos títulos aumentan según avanza la infección<sup>9,17</sup>. Ofrecen la posibilidad de detectar enfermedad activa de varios días de evolución, pero no excluyen la posibilidad de continuar transmitiendo el virus<sup>17,22</sup>. Los datos sobre el curso de la infección, han mostrado que los anticuerpos comienzan a producirse a partir del 6<sup>o</sup> día del inicio de los síntomas y que simultáneamente se presenta un descenso en la carga viral<sup>9,23,24</sup>. Aunque la prueba estándar de oro debería llevarse a cabo con pruebas de reducción de placas por neutralización (PRNT) esta requiere del virus SARS CoV-2 aislado y cultivo viral<sup>17</sup>. Dada la limitación para cultivar este virus, este grupo considera que un estándar de oro alternativo sería realizar validación con los siguientes grupos de sueros y estimando tamaños de muestra suficientes para establecer la aplicabilidad de la prueba en diferentes condiciones:

- **Criterios de selección de sueros para establecer sensibilidad de la prueba:** Toda prueba debe tener una evaluación de sensibilidad utilizando muestras de sueros, en igual proporción de casos sintomáticos y asintomáticos y de rangos de edad y género, similares a lo que se encuentra en la población general. Los sueros deben corresponder a personas con infección confirmada por RT-qPCR y se deben especificar los días post exposición, según los siguientes grupos: día 1 a 8, día 9 a 15 y día 16 a 30, después de contacto estimado con caso positivo para SARS-CoV-2.
- **Criterios de selección de sueros para establecer especificidad:** Toda prueba debe establecer su especificidad con sueros de la misma población previos al informe de inicio de casos en el país. Los sueros deben corresponder a las características de la población en la cual se van a aplicar las pruebas.
- **Tamaño de muestra para establecer sensibilidad y especificidad:** Los ensayos se deben realizar con un número de muestras de verdaderos positivos y verdaderos negativos estimados a partir de una prueba unilateral, para lo cual se requeriría estimar los falsos positivos probables en esa prueba y la prevalencia esperada en la muestra estructurada por el investigador<sup>25-27</sup>. Se debe elegir un

valor de razones de verosimilitud o *likelihood ratios* (LR) positivo contemplando el nivel de errores alfa y beta que se considere adecuado<sup>25</sup>. Los reportes de sensibilidad y especificidad deben incluir los valores de IC95% de cada uno de ellos<sup>27</sup>.

## Programas de control de calidad para las pruebas diagnósticas de infección por SARS CoV-2

### Programa de control de calidad para las pruebas de detección de SARS CoV-2 por RT-PCR prueba detección de SARS-CoV-2

Se deben realizar controles de calidad internos y externos por el laboratorio nacional de referencia en las instituciones que están realizando pruebas de RT-PCR caseras, al menos cada 200 pruebas con un panel de muestras inoculadas artificialmente con plásmido control conteniendo inserto del producto a amplificar. Las matrices comerciales para control de calidad externo podrían utilizarse una vez estén validadas y disponibles.

### Programa de control de calidad para pruebas serológicas

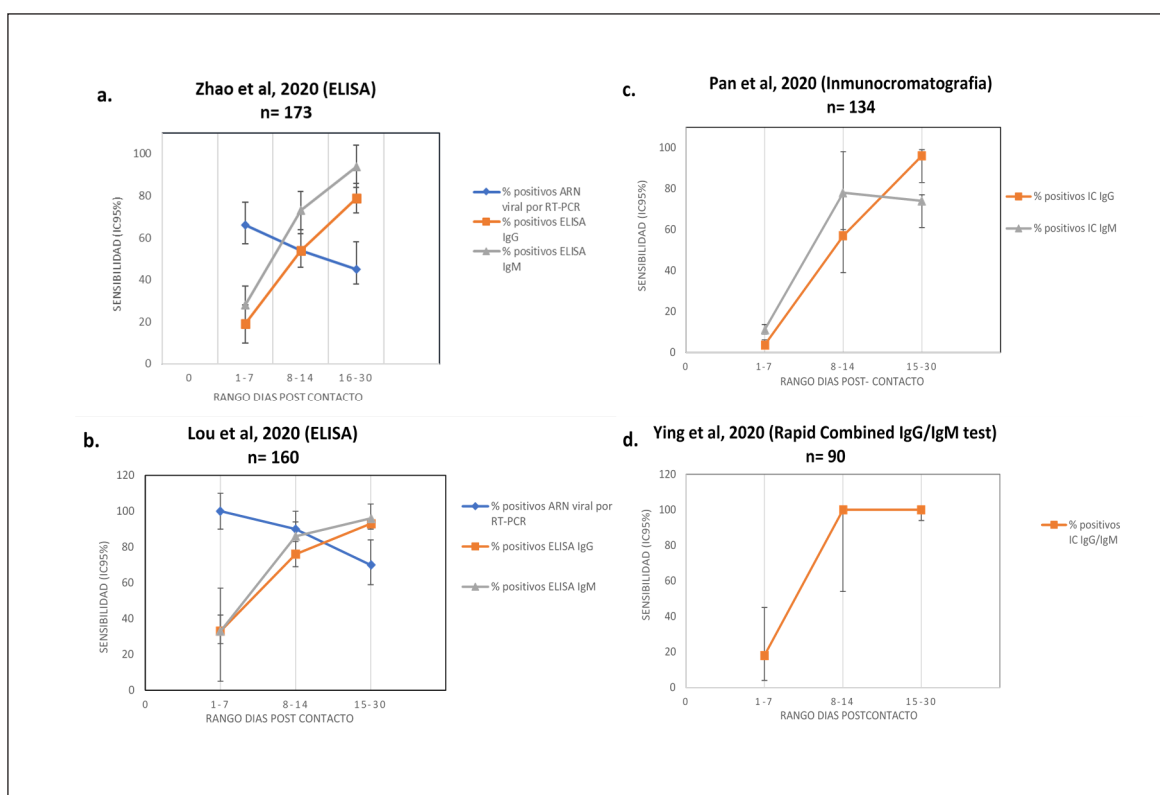
Todas las pruebas serológicas se deben realizar con controles internos, positivos y negativos en cada montaje. Se deben realizar controles de calidad externos con muestras positivas y negativas enviadas a cada laboratorio que realiza pruebas

de diagnóstico serológico. El control externo se puede hacer mensual si hay alto volumen, bimensual o trimestral si es bajo el volumen de muestras.

## Conclusiones

El diagnóstico de la infección por SARS CoV-2 es la piedra angular para la toma de decisiones adecuadas en el manejo y control de la pandemia. Las pruebas de amplificación de ARN viral (RT-qPCR) y detección de anticuerpos contra el virus, tienen diferentes alcances y su implementación e interpretación deberá estar ajustado al contexto clínico o epidemiológico. La validación, verificación y control de calidad de pruebas "in house" y pruebas diagnósticas comerciales, es mandatorio para garantizar resultados confiables y oportunos. Para pruebas de amplificación molecular deben seguirse las recomendaciones de la FDA y para las pruebas serológicas, las validaciones se realizarán con sueros que cumplan con criterios de sensibilidad, especificidad y un tamaño de muestra adecuado que permita calcular adecuadamente el rendimiento de la prueba.

La OMS el 8 de abril de 2020 realizó una declaración de posición, por su grupo de expertos, a la luz de la evidencia disponible en el momento, sobre las pruebas rápidas y las serológicas, incluyendo ELISA y estableció que estas pruebas



**Figura 2.** Se calcularon los intervalos de confianza 95% de los valores de sensibilidad de cuatro estudios<sup>7-10</sup> que han fundamentado la mayoría de descripciones de cinética de anticuerpos. Sólo el estudio de Zhao et al (a) calculó los intervalos de confianza, los demás valores (b, c, d) fueron calculados por los miembros de este consenso a partir de los datos presentados por los autores. Se observa que los valores de confianza son muy amplios y no permiten definir con certeza, por ejemplo, si la detección de IgM o IgG es más sensible una con respecto a otra en los primeros 8 días de la infección.



por ahora sólo se deben utilizar en contexto de investigación, según afirma esta declaración: “Estas pruebas no deben ser usadas para decisiones clínicas, hasta que exista una evidencia disponible para las indicaciones específicas”<sup>28</sup>. El 13 de abril el Ministerio de Salud de Colombia emitió lineamientos sobre el uso de pruebas diagnósticas en Colombia en el mismo sentido de la OMS, recomendando el uso de pruebas serológicas sólo para estudios epidemiológicos y no para decisiones clínicas<sup>29</sup>. Por ello, las recomendaciones que hemos hecho en este consenso buscan justamente dar orientación para que se pueda obtener la información requerida y tener pruebas de diagnóstico clínico de alta calidad.

## Referencias

- Patel R, Babady E, Theel ES, Storch GA, Pinsky BA, St. George K, et al. Report from the American Society for Microbiology COVID-19 International Summit, 23 March 2020: Value of Diagnostic Testing for SARS-CoV-2/COVID-19. *MBio* [Internet]. 2020 Apr 28 [cited 2020 Apr 3];11(2). Available from: <https://mbio.asm.org/lookup/doi/10.1128/mBio.00722-20>
- Corman V, Bleicker T, Brünink S, Drosten C, Landt O, Koopmans M, et al. Diagnostic detection of Wuhan coronavirus 2019 by real-time RTPCR [Internet]. 2020 [cited 2020 Apr 8]. Available from: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/wuhan-virus-assay-v1991527e5122341d99287a1b17c111902.pdf>
- World Health Organization. In-house developed molecular assays [Internet]. 2020 [cited 2020 Apr 11]. Available from: [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/whoinhouseassays.pdf?sfvrsn=de3a76aa\\_2](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/whoinhouseassays.pdf?sfvrsn=de3a76aa_2)
- FDA. Emergency Use Authorizations | FDA [Internet]. [cited 2020 Apr 8]. Available from: <https://www.fda.gov/medical-devices/emergency-situations-medical-devices/emergency-use-authorizations#coronavirus2019>
- Mitchell S, George KS, Rhoads D, Butler-Wu S, Dharmarha V, Miller M. Verification procedure for commercial tests with Emergency Use Authorization for the detection of SARS-CoV-2 RNA [Internet]. 2020 [cited 2020 Apr 8]. Available from: <https://www.fda.gov/medical-devices/emergency-situations-medical-devices/emergency-use-authorizations#coronavirus2019>
- Coronavirus: El Gobierno asegura que no compró los test rápidos defectuosos en China sino a través de un distribuidor español | Sociedad | EL PAÍS [Internet]. [cited 2020 Apr 8]. Available from: <https://elpais.com/sociedad/2020-03-26/el-gobierno-asegura-que-no-compro-los-test-rapidos-defectuosos-en-china-sino-a-traves-de-un-distribuidor-espanol-del-que-se-fio.html>
- Liu Y, Liu Y, Diao B, Ren F, Wang Y, Ding J, et al. Diagnostic Indexes of a Rapid IgG/IgM Combined Antibody Test for SARS-CoV-2. *medRxiv*. 2020;2020.03.26.20044883.
- Pan Y, Li X, Yang G, Fan J, Tang Y, Zhao J, et al. Serological immunochromatographic approach in diagnosis with SARS-CoV-2 infected COVID-19 patients. *medRxiv* [Internet]. 2020 [cited 2020 Apr 12];2020.03.13.20035428. Available from: <http://medrxiv.org/content/early/2020/03/17/2020.03.13.20035428.abstract>
- Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2020 Mar 28 [cited 2020 Mar 30]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32221519>
- Lou B, Li T-D, Zheng S-F, Su Y-Y, Li Z-Y, Liu W, et al. Serology characteristics of SARS-CoV-2 infection since the exposure and post symptoms onset. [cited 2020 Apr 12]; Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.03.23.20041707>
- Loeffelholz MJ, Tang Y-W. Laboratory Diagnosis of Emerging Human Coronavirus Infections — The State of the Art. *Emerg Microbes Infect*. 2020 Mar 20;1–26.
- Wang L, Wang Y, Ye D, Liu Q. A review of the 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) based on current evidence. *Int J Antimicrob Agents*. 2020 Mar;105948.
- Ahn D-G, Shin H-J, Kim M-H, Lee S, Kim H-S, Myoung J, et al. Current Status of Epidemiology, Diagnosis, Therapeutics, and Vaccines for Novel Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *J Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2020 Mar 28 [cited 2020 Apr 8];30(3):313–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32238757>
- Yu F, Yan L, Wang N, Yang S, Wang L, Tang Y, et al. Quantitative Detection and Viral Load Analysis of SARS-CoV-2 in Infected Patients. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2020 Mar 28 [cited 2020 Mar 30]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32221523>
- Zou L, Ruan F, Huang M, Liang L, Huang H, Hong Z, et al. SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients [Internet]. Vol. 382, *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society; 2020 [cited 2020 Apr 8]. p. 1177–9. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMc2001737>
- Nalla AK, Casto AM, Huang M-LW, Perchetti GA, Sampoleo R, Shrestha L, et al. Comparative Performance of SARS-CoV-2 Detection Assays using Seven Different Primer/Probe Sets and One Assay Kit. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2020 Apr 8 [cited 2020 Apr 11]; Available from: <http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.00557-20>
- Okba NMA, Müller MA, Li W, Wang C, GeurtsvanKessel CH, Corman VM, et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2–Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease 2019 Patients. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2020 Jul 8 [cited 2020 Apr 9];26(7). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32267220>
- Lin D, Liu L, Zhang M, Hu Y, Yang Q, Guo J, et al. Evaluations of serological test in the diagnosis of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) infections during the COVID-19 outbreak. *medRxiv*. 2020;2020.03.27.20045153.
- Cochrane Iberoamerica. ¿Cuál es el riesgo de reinfección por coronavirus SARS-CoV-2? | Cochrane Iberoamérica [Internet]. 2020 [cited 2020 Apr 11]. Available from: <https://es.cochrane.org/es/recursos/evidencias-covid-19/¿cuál-es-el-riesgo-de-reinfección-por-coronavirus-sars-cov-2>
- Du Z, Zhu F, Guo F, Yang B, Wang T. Detection of antibodies against SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *J Med Virol* [Internet]. 2020 Apr 10 [cited 2020 Apr 11]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32243608>
- Witt DJ, Kemper M. Techniques for the evaluation of nucleic acid amplification technology performance with specimens containing interfering substances: efficacy of Boom methodology for extraction of HIV-1 RNA. *J Virol Methods* [Internet]. 1999 Apr [cited 2020 Apr 12];79(1):97–111. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10328539>
- Lauer SA, Grantz KH, Bi Q, Jones FK, Zheng Q, Meredith HR, et al. The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. *Ann Intern Med*. 2020 Mar 10;
- Wang X, Fang J, Zhu Y, Chen L, Ding F, Zhou R, et al. Clinical characteristics of non-critically ill patients with novel coronavirus infection (COVID-19) in a Fangcang Hospital. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2020 Apr 3 [cited 2020 Apr 8]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32251842>
- Yang X, Yu Y, Xu J, Shu H, Xia J, Liu H, et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. *Lancet Respir Med*. 2020;
- Duffau T. G. Tamaño muestral en estudios sobre pruebas diagnósticas. *Rev Chil pediatría* [Internet]. 1998 May [cited 2020 Apr 11];69(3):122–5. Available from: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0370-4106199800300008&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-4106199800300008&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
- Hajian-Tilaki K. Sample size estimation in diagnostic test studies of biomedical informatics. Vol. 48, *Journal of Biomedical Informatics*. Academic Press Inc.; 2014. p. 193–204.
- Bujang MA, Adnan TH. Requirements for Minimum Sample Size for Sensitivity and Specificity Analysis. *J Clin DIAGNOSTIC Res*. 2016;10(10):YE01.
- World Health Organization. Advice on the use of point-of-care immunodiagnostic tests for COVID-19 [Internet]. 2020 [cited 2020 Apr 12]. Available from: <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/advice-on-the-use-of-point-of-care-immunodiagnostic-tests-for-covid-19>
- Ministerio de Salud y Protección social. PROCESO GESTIÓN DE LAS INTERVENCIONES INDIVIDUALES Y COLECTIVAS PARA LA PROMOCIÓN DE LA SALUD Y PREVENCIÓN DE LA ENFERMEDAD: Lineamientos para el uso de pruebas diagnósticas de laboratorio durante la pandemia del SARS-CoV-2 (COVID-19) en Colombia. [Internet]. Bogotá; 2020 [cited 2020 Apr 14]. Available from: [https://www.minsalud.gov.co/Ministerio/Institucional/Procesos\\_y\\_procedimientos/GIPS21.pdf](https://www.minsalud.gov.co/Ministerio/Institucional/Procesos_y_procedimientos/GIPS21.pdf)