

I-ISSN 2590-7379 (Electrónico)

Biomédica

Revista del Instituto Nacional de Salud

Volumen 42, Suplemento No. 2 - COVID-19
Octubre de 2022, Bogotá, D.C., Colombia, S.A.



Portada: Primer puesto, categoría de medioambiente o históricas, Concurso Fotografía Biomédica 2021

Diafanidad

Diego Castresana-Díaz, Hospital del Norte, Barranquilla, Colombia

Biomédica Instituto Nacional de Salud

Volumen 42, Suplemento No. 2 - Bogotá, D.C., Colombia - Octubre de 2022

Comité Editorial

EDITORES	LUIS ALBERTO GÓMEZ Instituto Nacional de Salud Bogotá, D.C., Colombia	CARLOS ARTURO HERNÁNDEZ Instituto Nacional de Salud Bogotá, D.C., Colombia	RUBÉN SANTIAGO NICHOLLS Organización Panamericana de la Salud Washington, D.C., Estados Unidos
EDITORES ASOCIADOS	ENRIQUE ÁRDILA Academia Nacional de Medicina Bogotá, D.C., Colombia	JULIÁN ALFREDO FERNÁNDEZ-NIÑO Bloomberg School of Public Health Johns Hopkins University Baltimore, MD, Estados Unidos	ERIKA SANTAMARÍA Instituto Nacional de Salud Bogotá, D.C., Colombia
	JOSÉ MORENO-MONTOYA Fundación Santa Fe de Bogotá Bogotá, D.C., Colombia	OMAR SEGURA Federación Médica Colombiana Bogotá, D.C., Colombia	ORLANDO TORRES-FERNÁNDEZ Instituto Nacional de Salud Bogotá, D.C., Colombia
	LEONARD MUNSTERMANN Yale University School of Medicine New Haven, CT, Estados Unidos	MAGDALENA WIESNER Instituto Nacional de Salud Bogotá, D.C., Colombia	

Comité Científico

ARNOLDO BARBOSA Universidad del Tolima Ibagué, Colombia	ANDRÉS DE FRANCISCO Organización Panamericana de la Salud Washington, D.C., Estados Unidos	JOHN MARIO GONZÁLEZ Universidad de los Andes Bogotá, D.C., Colombia
ANTONIO BERMÚDEZ Instituto Nacional de Salud Bogotá, D.C., Colombia	FERNANDO DE LA HOZ Universidad Nacional de Colombia Bogotá, D.C., Colombia	FELIPE GUHL Universidad de los Andes Bogotá, D.C., Colombia
JORGE H. BOTERO Universidad de Antioquia Medellín, Colombia	JOSÉ LUIS DI FABIO Organización Panamericana de la Salud Washington, D.C., Estados Unidos	ANTONIO IGLESIAS Universidad Nacional de Colombia Bogotá, D.C., Colombia
GUSTAVO ALONSO CABRERA Universidad de Antioquia Medellín, Colombia	JORGE HERNANDO DONADO Universidad Pontificia Bolivariana Medellín, Colombia	JORGE JARA Organización Panamericana de la Salud Washington, D.C., Estados Unidos
VÍCTOR CÁRDENAS University of Arkansas Little Rock, AK, Estados Unidos	CARLOS ANDRÉS FANDIÑO Universidad del Valle Cali, Colombia	ERNESTO JARAMILLO Organización Mundial de la Salud Ginebra, Suiza
ALBERTO CONCHA-EASTMAN Guatapé, Colombia	JOSÉ FIGUEROA World Health Organization Ginebra, Suiza	MARCELO LABRUNA Universidade de São Paulo São Paulo, Brasil
ZOILO CUÉLLAR Academia Nacional de Medicina Bogotá, D.C., Colombia	LUIS FERNANDO GARCÍA Universidad de Antioquia Medellín, Colombia	JAIRO LIZARAZO Hospital Universitario Erasmo Meoz Cúcuta, Colombia
LUIS GABRIEL CUERVO Organización Panamericana de la Salud Washington, D.C., Estados Unidos	ALBERTO GÓMEZ Pontificia Universidad Javeriana Bogotá, D.C., Colombia	JUAN GUILLERMO McEWEN Corporación para Investigaciones Biológicas Medellín, Colombia
PATRICIA DEL PORTILLO Corpogén Bogotá, D.C., Colombia	ENRIQUE GONZÁLEZ University of Texas Health Science Center at San Antonio San Antonio, TX, Estados Unidos	ROBERTO MENDOZA The Hospital for Sick Children Toronto, Ontario, Canada

RICARDO NEGRONI
Hospital de Infecciosas
Francisco Javier Muñiz
Buenos Aires, Argentina

MARÍA TERESA OCHOA
University of California Los Ángeles
Los Ángeles, CA, Estados Unidos

JUAN P. OLANO
University of Texas Medical Branch
Galveston, TX, Estados Unidos

BLANCA RESTREPO
University of Texas
Brownsville, TX, Estados Unidos

GERZAÍN RODRÍGUEZ
Investigador Emérito
Instituto Nacional de Salud
Universidad de La Sabana
Bogotá, D.C., Colombia

VÍCTOR E. REYES
University of Texas Medical Branch
Galveston, TX, Estados Unidos

GUSTAVO C. ROMÁN
Methodist Neurological Institute
Houston, TX, Estados Unidos

PEDRO ROMERO
Ludwig Center for Cancer Research
University of Lausanne
Lausana, Suiza

ÁLVARO RUIZ
Pontificia Universidad Javeriana
Bogotá, D.C., Colombia

GIOCONDA SAN BLAS
Instituto Venezolano de
Investigaciones Científicas
Caracas, Venezuela

ÁLVARO SANABRIA
Hospital Pablo Tobón Uribe
Medellín, Colombia
Universidad de La Sabana
Chía, Colombia

RICARDO SÁNCHEZ
Universidad Nacional de Colombia
Bogotá, D.C., Colombia

NANCY GORE SARAVIA
Centro Internacional de Entrenamiento
e Investigaciones Médicas
Cali, Colombia

ROBERT TESH
University of Texas
Galveston, TX, ESTADOS UNIDOS

BRUNO TRAVI
University of Texas
Galveston, TX, Estados Unidos

GUSTAVO VALBUENA
University of Texas
Galveston, TX, Estados Unidos

JUAN MIGUEL VILLALOBOS
Universidade Federal de Rondônia
Porto Velho, Brasil

MOISÉS WASSERMAN
Investigador Emérito
Instituto Nacional de Salud
Universidad Nacional de Colombia
Bogotá, D.C., Colombia

CARLOS ARTURO HERNÁNDEZ
Edición y corrección de estilo

LINDA GRACE MOLANO
Asistencia editorial

ANA MARÍA PAÉZ
Corrección de estilo

ELIZABETH GUZMÁN
Mercadeo digital

LUZ ÁNGELA SALGADO
Diagramación

© Instituto Nacional de Salud

La revista *Biomédica* del Instituto Nacional de Salud es una publicación trimestral, eminentemente científica. Está amparada por la resolución número 003768 de 1981, emanada del Ministerio de Gobierno, y con tarifa postal reducida según resolución número 1128 del 5 de mayo de 1982.

Ninguna publicación, nacional o extranjera, podrá reproducir ni traducir sus artículos ni sus resúmenes sin previa autorización escrita del editor. Ni la revista, ni el Instituto asumen responsabilidad alguna por los puntos de vista expresados por los autores. La revista no publicará ningún tipo de propaganda comercial. Los nombres de equipos, materiales y productos manufacturados que eventualmente puedan mencionarse, no implican recomendación ni propaganda para su uso y sólo se mencionan como identificación genérica.

La revista *Biomédica* aparece reseñada en *Index Medicus/Medline de la National Library of Medicine*, en el *Science Citation Index Expanded (also known as SciSearch®)* y *Journal Citation Reports/Science Edition de Thomson Scientific*, en *SciELO Colombia (Scientific Electronic Library Online)*, en el índice de la *Literatura Latinoamericana en Ciencias de la Salud (LILACS)*, en la Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal (RedAlyC), en el *Índice Mexicano de Revistas Biomédicas Latinoamericanas (Imbiomed)*, en *Scopus* de Elsevier B.V., en el *Sistema de Información Bibliográfica Regional Andina (SIBRA)*, en *CAB Abstracts, Review of Medical and Veterinary Entomology*, y forma parte del *Índice Nacional de Publicaciones Seriadadas Científicas y Tecnológicas Colombianas* de Colciencias y del *Índice Latinoamericano de Revistas Científicas y Tecnológicas (LATINDEX)*.

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
Avenida Calle 26 No. 51-20
Apartado aéreo 80334 y 80080
Bogotá, D.C., Colombia, S.A.

URL: <http://www.ins.gov.co>
biomedica@ins.gov.co

Contenido

Editorial

Lecciones aprendidas en salud pública frente a la COVID-19: una mirada hacia futuras epidemias y pandemias <i>Claudia Milena Cuéllar-Segura</i>	5
--	---

Imágenes en biomedicina

Detección inmunohistoquímica de antígenos de SARS-CoV-2 en tejido pulmonar <i>Jorge Rivera, Sheryll Corchuelo, Edgar Parra, Eugenio Aladino Meek, Marcela Mercado, Orlando Torres-Fernández</i>	9
--	---

Comentario

Llamado a la implementación de la Ley 2120 de 2021 contra la comida chatarra en los tiempos del COVID-19 en Colombia <i>Lina María García, Adolfo Contreras</i>	14
--	----

Artículo original

Eficacia y seguridad de cuatro vacunas COVID-19 para prevenir la infección por SARS-CoV-2: una revisión rápida <i>Lina Sofía Morón-Duarte, Kelly Rocío Chacón, María Paula Gutiérrez, Ilich Herbert De La Hoz, Nancy Yomayusa</i>	19
--	----

Medidas preventivas centradas en la interfaz urbano-rural protegen a las comunidades rurales productoras de alimentos del SARS-CoV-2 <i>Gina Polo, Diego Soler-Tovar, Luis Carlos Villamil-Jiménez, Carlos Mera</i>	32
--	----

Infección natural por SARS-CoV-2 en gatos y perros domésticos de personas con diagnóstico de COVID-19 en el Valle de Aburrá, Antioquia <i>Azucena Cabrera, Dubán González-Álvarez, Luz A. Gutiérrez, Francisco J Díaz, Diego Forero, Juan David Rodas</i>	48
--	----

Validación clínica de la prueba RT-LAMP para el diagnóstico rápido del SARS-CoV-2 <i>Leidy Hurtado, Diana Díaz, Katherine Escorcia, Laura Flórez, Yesit Bello, Yirys Díaz, Elkin Navarro, Leonardo C. Pacheco, Nataly Galán, Ronald Maestre, Antonio Acosta, Lisandro A. Pacheco</i>	59
---	----

Comunicación breve

Incidencia de síntomas respiratorios agudos y COVID-19 en niños de escuelas públicas de Bogotá, Colombia, entre julio y noviembre de 2020 <i>José Moreno-Montoya, Diana Benavides-Arias, Luz Amparo Pérez, Jennifer Ruiz, Deidamia García, Iván Osejo, Edwin A. Ussa, Camilo Pino, Fernando Pío de La Hoz</i>	73
--	----

Revisión de tema

Controversias en neuroinmunología: esclerosis múltiple, vacunación, SARS-CoV-2 y otros dilemas <i>Saúl Reyes-Niño, Jaime Eduardo Rodríguez-Orozco, Habib Georges Moutran-Barroso, Hellen Kreinter-Rosembaun, Mariana Gaviria-Carrillo, Vanessa Salej-Durán, Julián Mancera-Charry, Ana Claudia Villegas, David Cuéllar-Giraldo, Juan Sebastián Torres-Sandoval, Ángela Gómez-Mazuera, Aristides Duque-Samper, Jaime Toro-Gómez</i>	78
---	----

Contents

Editorial

Lessons learned in public health from COVID-19: A look towards future epidemics and pandemics <i>Claudia Milena Cuéllar-Segura</i>	5
---	---

Images in biomedicine

Inmunohistochemical detection of pandemic SARSCoV-2 antigens in lung tissue <i>Jorge Rivera, Sheryll Corchuelo, Edgar Parra, Eugenio Aladino Meek, Marcela Mercado, Orlando Torres-Fernández</i>	9
---	---

Commentary

A call for implementation of the Law 2120 against junk food during pandemic times in Colombia <i>Lina María García, Adolfo Contreras</i>	14
---	----

Original article

Efficacy and safety of four COVID-19 vaccines in preventing SARS-CoV-2 infection: A rapid review <i>Lina Sofía Morón-Duarte, Kelly Rocío Chacón, María Paula Gutiérrez, Ilich Herbert De La Hoz, Nancy Yomayusa</i>	19
--	----

Preventive measures focused on the urban-rural interface protect rural food-producing communities from SARS-CoV-2 <i>Gina Polo, Diego Soler-Tovar, Luis Carlos Villamil-Jiménez, Carlos Mera</i>	32
---	----

Natural SARS-CoV-2 infection in domestic cats and dogs of humans diagnosed with COVID-19 in Valle de Aburrá, Antioquia <i>Azucena Cabrera, Dubán González-Álvarez, Luz A. Gutiérrez, Francisco J Díaz, Diego Forero, Juan David Rodas</i>	48
--	----

Clinical validation of the isothermal RT-LAMP test for rapid diagnosis of SARS-CoV-2 <i>Leidy Hurtado, Diana Díaz, Katherine Escorcía, Laura Flórez, Yesit Bello, Yirys Díaz, Elkin Navarro, Leonardo C. Pacheco, Nataly Galán, Ronald Maestre, Antonio Acosta, Lisandro A. Pacheco</i>	59
--	----

Brief communication

Incidence of acute respiratory symptoms and COVID-19 infection in children in public schools in Bogotá, Colombia, from July to November, 2020 <i>José Moreno-Montoya, Diana Benavides-Arias, Luz Amparo Pérez, Jennifer Ruiz, Deidamia García, Iván Osejo, Edwin A. Ussa, Camilo Pino, Fernando Pío de La Hoz</i>	73
--	----

Topic review

Controversies in neuroimmunology: multiple sclerosis, vaccination, SARS-CoV-2 and other dilemmas <i>Saúl Reyes-Niño, Jaime Eduardo Rodríguez-Orozco, Habib Georges Moutran-Barroso, Hellen Kreinter-Rosembaun, Mariana Gaviria-Carrillo, Vanessa Salej-Durán, Julián Mancera-Charry, Ana Claudia Villegas, David Cuéllar-Giraldo, Juan Sebastián Torres-Sandoval, Ángela Gómez-Mazuera, Aristides Duque-Samper, Jaime Toro-Gómez</i>	78
---	----

Editorial

Lecciones aprendidas en salud pública frente a la COVID-19: una mirada hacia futuras epidemias y pandemias

La pandemia desencadenada por el virus SARS-CoV-2 que produce la COVID-19 –declarada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) el 11 de marzo de 2020– es, sin duda, una de las crisis sanitarias más graves que ha afectado al mundo actual, solo equiparable a la devastadora pandemia del siglo XX, la gripe española, que cobró entre 40 y 50 millones de vidas¹. Según la OMS, a corte de 13 de septiembre de 2022, en el mundo se han presentado 606'459.140 casos confirmados de COVID-19 y 6'495.110 fallecidos². En Colombia, según el Sistema de Vigilancia en Salud Pública (Sivigila), se han registrado 6'304.317 de casos confirmados de COVID-19 y 141.708 fallecidos³. Sin embargo, estas cifras de morbilidad y mortalidad no son comparables con las de la gripe española, teniendo en cuenta los avances en el conocimiento científico, las nuevas tecnologías y las medidas de control de que se dispone actualmente, que se han podido usar en otras pandemias más recientes (influenza AH1N1, MERS-CoV, sarampión, virus de chikunguña y virus de Zika).

Desde el inicio de la pandemia por COVID-19, se han adquirido diferentes aprendizajes en cuanto a su aparición, ecología, geografía y población afectada. No obstante, sí se presentan similitudes con eventos pasados en cuanto a las consecuencias en temas como la gobernanza y la gobernabilidad, la salud pública, la economía y el impacto social, entre otros aspectos. Los efectos y las secuelas solo se pueden constatar a mediano y largo plazo.

Es así que cuando la OMS/OPS emite las primeras alertas epidemiológicas sobre el coronavirus, los Estados Miembro –bajo el Reglamento Sanitario Internacional (RSI, 2005)– ya estaban llevando a cabo las evaluaciones del riesgo que les permitieran establecer la posible afectación de la población del país⁴. Con base en lo anterior y bajo este análisis, es que los países, incluido Colombia, revisan las capacidades básicas en materia de salud y gestión pública para establecer la primera fase de preparación en respuesta ante una situación que, según su magnitud, el director de la OMS la clasifica como un evento de salud pública de importancia internacional. Esto significa que, de esta manera, se exhorta e insta a todos los Estados Miembro a tener una respuesta internacional coordinada y proporcionada para evitar o mitigar su propagación.

Citación:

Cuéllar-Segura CM. Lecciones aprendidas en salud pública frente a la COVID-19: una mirada hacia futuras epidemias y pandemias. *Biomédica*. 2022;42(Supl.2):5-8.

¹ <https://www.paho.org/es/quienes-somos/historia-ops/muerte-purpura-gran-gripe-1918>

² https://covid19.who.int/?gclid=EAlaIqobChMIs8WdMkWT-gIV14RaBR0iXgvuEAAAYASABEgIO3_D_BwE

³ <http://www.ins.gov.co/Noticias/Paginas/Coronavirus.aspx>

⁴ <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/INEC/INTOR/reglamento-sanitario-internacional.pdf>

Esta pandemia ya preveía un enorme impacto en la salud pública: era un virus nuevo que producía una enfermedad infecciosa, de fácil transmisión de persona a persona, con la particularidad de que individuos asintomáticos podían contagiar a otros. Asimismo, el 100 % de la población era vulnerable en menor o mayor grado de compromiso en las manifestaciones clínicas, según la edad, enfermedades de base, inmunogenicidad y capacidad infecciosa. Además, las nuevas variantes y sublinajes que el virus sigue presentando, son cada vez más transmisibles, aunque con un componente de menor gravedad. Es de resaltar que los grupos poblacionales como los adultos mayores y las personas con inmunosupresión a causa de enfermedades de base, siguen teniendo el mayor riesgo de enfermar, de ingresar a las unidades de cuidado intensivo y de morir.

Las medidas no farmacológicas (lavado frecuente e higiene de manos, uso de tapabocas, ventilación de espacios cerrados, distanciamiento físico) junto con las cuarentenas, fueron los principales pilares de contención, con los cuales se buscaba mitigar la transmisión del virus y disminuir la presión sobre los servicios de salud.

En la fase de mitigación se necesitaron otras medidas, por lo que el país buscó participar en las primeras pruebas de vacunas contra el SARS-CoV-2. Los laboratorios productores de vacunas (los reconocidos y otros nuevos), junto con las universidades y científicos del mundo, se aliaron para probar diferentes plataformas; en tiempo récord, generaron la información para determinar la producción de varias vacunas, para que los países pudieran acceder a ellas estableciendo negociaciones bilaterales y que, los que no tuvieran recursos, las pudieran adquirir por los mecanismos que la OMS había dispuesto para ello.

Por medio del Fondo de Mitigación de Emergencias (FOME) creado por el gobierno nacional para financiar la emergencia sanitaria, Colombia logró adquirir dichas vacunas e iniciar una de las estrategias más complejas del último tiempo: el Plan Nacional de Vacunación, desarrollado en dos fases. Los objetivos de la primera fase fueron reducir la mortalidad y la incidencia de casos graves por este virus y proteger a los trabajadores de la salud de la exposición; la segunda tuvo como objetivo reducir el contagio para generar inmunidad de rebaño, siempre manteniendo las medidas de bioseguridad y autocuidado.

Estos desafíos significaron para el país una respuesta que sobrepasaba la capacidad institucional inicial frente a la vigilancia epidemiológica y de laboratorio, la respuesta operativa de los servicios de salud, el suficiente personal en salud para abordarla, así como los recursos y los insumos necesarios para atender la emergencia. Se requería que el gobierno nacional estableciera una estrategia articulada con sus respectivos responsables y, además, la comprensión del comportamiento de la epidemia por parte de los integrantes del Sistema General de Seguridad Social en Salud, los demás sectores y la comunidad en general.

Para fortalecer la estrategia gubernamental, se tuvieron en cuenta las experiencias del país durante los últimos 14 años al abordar otras pandemias y epidemias. No obstante, haciendo un balance de estos dos años y seis meses desde el inicio de esta pandemia, se observa que hubo aprendizajes específicos que aumentaron las capacidades, las cuales deben potencializarse para futuras emergencias en salud pública, en los siguientes aspectos.

1. Red pública nacional de laboratorios. Se debe establecer una red con personal entrenado, y con insumos y reactivos necesarios para practicar las pruebas que se requieran según el evento; en este caso en particular, fueron las moleculares, específicamente la PCR como prueba de referencia. Además, hay que ampliar esta red hacia laboratorios colaboradores, privados o universitarios.
2. Aumento de la capacidad de atención de los servicios de salud. Para la COVID-19, se hizo principalmente en las unidades de cuidados intensivos debido a la gravedad de la enfermedad. Se pasó de tener 5.000 a más de 13.000 camas disponibles y se pudieron adquirir los equipos necesarios, tener la infraestructura adecuada y habilitarla para resolver la demanda generada. Esta capacidad de expandir los servicios es la manera de responder si se llega a presentar una situación similar a la que ya hemos atravesado.
3. Contar con uno de los sistemas de vigilancia en salud pública más avanzados y apropiados para las entidades territoriales. La vigilancia genómica, considerada por la OPS como referente regional, y el desarrollo de modelos matemáticos para predecir el comportamiento de la pandemia, permitieron actuar con anticipación, establecer las políticas públicas y hacer los abordajes específicos en algunas de las regiones del país y durante los picos más complejos que se presentaron.
4. Medidas de autocuidado y bioseguridad. Este fue uno de los aprendizajes que más ayudó durante la pandemia, pues había ansiedad e incertidumbre, y no se avanzaba en el conocimiento sobre el comportamiento del virus. Las medidas adoptadas permitieron contener y mitigar la infección en sus picos con alta transmisibilidad debido a las diferentes variantes circulantes. Los programas de protección social tuvieron un reconocimiento internacional, porque protegieron y apoyaron a la población más vulnerable en los aspectos financieros para ayudar a reducir la desigualdad y la pobreza.
5. Reacción y toma de decisiones. El adquirir conocimiento científico, apoyarse en las asociaciones científicas y compartir evidencia con los demás países, incluso por medios virtuales y con el apoyo de quienes estaban afrontando la pandemia mediante cooperación internacional, fueron y serán a futuro formas de articular una respuesta para tomar decisiones.
6. Vacunación. En conjunto con las demás medidas no farmacológicas, esta fue una intervención costo-efectiva que nos permitió disminuir el impacto negativo de la COVID-19. El país alcanzó las metas propuestas, con base en la experiencia adquirida con un programa ampliado de inmunización fortalecido y reconocido internacionalmente. Se aprendió sobre las condiciones de la cadena de frío y el transporte de las vacunas ultracongeladas, que nunca se habían puesto en práctica en el mundo. La aplicación de cuatro veces más vacunas de las que en Colombia se aplican regularmente en un año, era uno de los mayores retos para lograr los objetivos propuestos, mientras transcurría la epidemia, aumentaban los casos y fallecían las personas.

Por otra parte, están las siguientes capacidades existentes y que, insisto, han sido un claro ejemplo de respuesta.

1. La articulación entre entidades nacionales, subnacionales y locales, mediante el reconocimiento de las condiciones geográficas, poblacionales y culturales, y los recursos físicos, financieros y humanos, para ejecutar la estrategia de manera coordinada, aplicando la normatividad, las directrices y los protocolos.
2. Capacitar permanentemente al personal de vigilancia epidemiológica, el cual debe detectar cualquier situación sospechosa para generar una alerta nacional sobre las diferentes vías de ingreso (aérea, marítima o terrestre) o cualquier evento poblacional para generar acciones inmediatas como notificación, análisis, control y seguimiento.
3. La comunicación del riesgo genera un cambio sustancial en el abordaje de la respuesta. En nuestro país, permitió llegar a la comunidad, los sectores y las entidades del Estado, generando cambios en su comportamiento. Se logró controlar la infodemia producida por diferentes medios y redes sociales; además, transmitir las decisiones que cambiaban de un momento a otro, y hacerlo en un lenguaje claro y apropiado para cada público. La comunicación es una de las intervenciones que no solo es útil en situaciones de emergencia, es una medida primordial para la salud pública en general.

Aunque no tenemos certeza sobre la duración de esta pandemia, ojalá su fin sea cada vez más próximo. Por lo pronto, se debe tener presente que estamos enfrentando situaciones de salud pública cada vez complejas, pero, que lo podemos hacer de manera simultánea y coordinada. Aplicar lo aprendido permitirá mejorar la expectativa de vida de las personas, y afrontar cambios demográficos y de indicadores de salud, porque, como lo expresé anteriormente, las secuelas de una pandemia o de una epidemia pueden llegar a ser catastróficas y de larga duración. Esperemos que lo aprendido se incorpore en el acervo de la salud pública, como práctica regular en instituciones públicas y privadas, tanto en la atención como en la gestión y la investigación.

Claudia Milena Cuéllar-Segura

Médica epidemióloga, magíster en Ciencias Médicas; directora de Epidemiología y Demografía, Ministerio de Salud y Protección Social, Colombia (abril a agosto de 2022)

Images in biomedicine

Inmunohistochemical detection of pandemic SARS-CoV-2 antigens in lung tissue

Jorge Rivera¹, Sheryll Corchuelo¹, Edgar Parra², Eugenio Aladino Meek², Marcela Mercado³, Orlando Torres-Fernández¹

¹ Grupo de Morfología Celular, Dirección de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

² Grupo de Patología, Dirección de Redes en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

³ Dirección de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

The COVID-19 pandemic caused by the SARS-CoV-2 virus has generated globally more than 110.7 million infections and 2.4 million deaths. The severity of this infection can range from asymptomatic, mild to severe.

To know the possible associations between the presence of the virus and histopathological alterations found in tissues of fatal cases of COVID-19, the presence of the virus in the lung tissue of a patient with a clinical history of SARS-CoV-2 infection was evaluated.

Lung tissue was histologically processed for immunohistochemical detection of SARS-CoV-2. In the histopathological study, morphological changes associated with pneumonitis of viral origin were observed. Likewise, the location of the SARS-CoV-2 virus was observed mainly in the cytoplasm of the cells of the inflammatory infiltrate.

Keywords: COVID-19; lung; immunohistochemistry; antigens, viral

Detección inmunohistoquímica de antígenos de SARS-CoV-2 en tejido pulmonar

La pandemia de COVID-19 causada por el virus SARS-CoV-2 ha generado más de 110,7 millones de infecciones y 2,4 millones de muertes a nivel mundial. Esta infección puede ser asintomática y sus manifestaciones clínicas pueden variar entre leves y graves.

Para conocer las posibles asociaciones entre la presencia del virus y las alteraciones histopatológicas encontradas en los tejidos de casos fatales de COVID-19, se evaluó la presencia del virus en el tejido pulmonar de un paciente con antecedentes clínicos de infección por SARS-CoV-2. La muestra se procesó para la detección inmunohistoquímica del virus.

En el estudio histopatológico, se observaron cambios morfológicos asociados con neumonitis de origen viral. Asimismo, el virus se localizó principalmente en el citoplasma de las células del infiltrado inflamatorio.

Palabras clave: COVID-19; pulmón; inmunohistoquímica; antígenos virales

In December 2019, a group of patients with pneumonia of unknown origin was identified in Wuhan, Hubei Province, China. The etiological agent responsible for this condition was isolated in lower respiratory tract samples from these patients, identified as a novel coronavirus called SARS-CoV-2, an acronym for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. The World Health Organization (WHO) named this infection coronavirus disease 2019 (COVID-19).

Despite efforts to stop its transmission, the infection spread throughout China, and by January 2020, cases had already been recorded in Thailand, Japan and South Korea. In less than three months, this virus rapidly expanded to, at least, 114 countries, causing more than 4,000 deaths. Finally, by March 11, the WHO declared the COVID-19 outbreak a global pandemic (1). By the end of February 2021, 110,7 million infections had been reported, leading to 2,4 million deaths worldwide (2).

In Colombia, the first case of COVID-19 was recorded on March 6, 2020, shortly before the WHO declared the pandemic. This case was imported from Italy, the country that at that time had the highest epidemic peak in Europe. Soon after, cases of COVID-19 were diagnosed in travelers from different origins, as well as in many of their close contacts (3). By February 2021,

Received: 31/05/2021

Accepted: 03/03/2022

Published: 08/03/2022

Citation:

Rivera J, Corchuelo S, Parra E, Meek EA, Mercado M, Torres-Fernández O. Inmunohistochemical detection of pandemic SARS-CoV-2 antigens in lung tissue. *Biomédica*. 2022;42(Supl.2):9-13. <https://doi.org/10.7705/biomedica.6132>

Corresponding author:

Sheryll Corchuelo, Grupo de Morfología Celular, Dirección de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Avenida calle 26 N° 51-20, Zona 6 CAN, Bogotá, D.C., Colombia
Phone: 601 220 7700, extensión 1262
scorchuelo@ins.gov.co

Author contributions:

Jorge Rivera: Case selection for immunohistochemistry processing, image digitization, analysis of results and manuscript writing
Sheryll Corchuelo: Search and selection of cases for immunohistochemical analysis, analysis of results
Edgar Parra and Eugenio Aladino Meek: Histopathological analysis
Marcela Mercado and Orlando Torres-Fernández: Analysis of results
All authors participated in the review of the paper.

Funding:

This study was supported by the *Instituto Nacional de Salud, Colombia* (Project code CEMIN: 23-2020).

Conflicts of interest:

The authors have no conflict of interest to declare.

there were 2,233,589 cases and 59,118 deaths distributed among the 32 departments of Colombia. A total of 48,6% of infections has been recorded in men, with 63.7% of deaths in this same sex (4).

Coronaviruses are positive-sense single-stranded RNA viruses, ranging in diameter from 80 to 220 nm, with a viral envelope that shows 20-nm long projections that resemble a crown.

Coronaviruses have five essential genes, of which four encode structural proteins (N, E, M and S) and one is involved in viral transcription and replication (RNA dependent RNA polymerase, RdRp) (1). Within the viral particle, a nucleoprotein (N) wraps the RNA genome to form a tubular structure and the envelope protein (E) surrounds this helical nucleocapsid. Two structural proteins are associated with this viral envelope: the matrix protein (M), which is embedded in the envelope, and the structural protein (S), which is anchored to this structure and is the main target of neutralizing antibodies.

SARS-CoV enters its host cell through the binding S protein to cellular receptors, determining viral tropism and pathogenesis (5). It has been suggested that SARS-CoV-2 may share a cellular receptor with SARS-CoV because these two viral strains have similar receptor-binding structural proteins. Different studies have shown that SARS-CoV-2 binds to angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), similar to SARS-CoV (6).

Among all currently known RNA viruses, coronaviruses have the largest known genome, capable of causing disease in both animals and humans. Taxonomically, coronaviruses belong to the order Nidovirales, family Coronaviridae and the subfamily Coronavirinae, which is divided into four genera: *alphacoronavirus*, *betacoronavirus*, *gammacoronavirus* and *deltacoronavirus*. Currently, six coronaviruses are known to cause disease in humans, including four that are endemic – HCoV-229E, OC43, NL63 and HKU1 – and two that have caused epidemics, SARS-CoV and MERS-CoV. Of these, HCoV-229E and NL63 are part of the genus *alphacoronavirus*, and OC43, HKU1, SARS-CoV and MERS-CoV are part of the genus *betacoronavirus* (1).

The disease caused by the SARS-CoV-2 has been recorded in patients of different ages, and the severity of the infection can range from asymptomatic to severe. In the latter case, patients present severe acute respiratory syndrome (SARS) or respiratory failure, shock, and multiorgan dysfunction (7,8).

SARS is mainly characterized by pneumonia-like symptoms, being the lung the pathologically most affected organ. However, studies have suggested that SARS is a systemic disease with broad extrapulmonary spread, which results in viral dispersion through respiratory secretions, feces, urine and possibly sweat (7,8).

Immunohistochemical and *in situ* hybridization assays using organs of patients who died from SARS-CoV have shown its presence in the lungs, intestine, liver, distal renal tubules, sweat glands, parathyroid gland, pituitary gland, pancreas, adrenal glands and brain. Through real-time PCR assays, SARS-CoV RNA has been detected in the lungs, intestine, lymphoid nodes, spleen, liver, heart, kidney and skeletal muscle (7,9). However, for SARS-CoV-2, the presence of viral antigens has been described mainly in the upper airways, with abundant immunoreaction in the bronchial epithelium, submucosal glandular epithelium, type I and type II pneumocytes, alveolar macrophages and hyaline membranes in the lung (10).

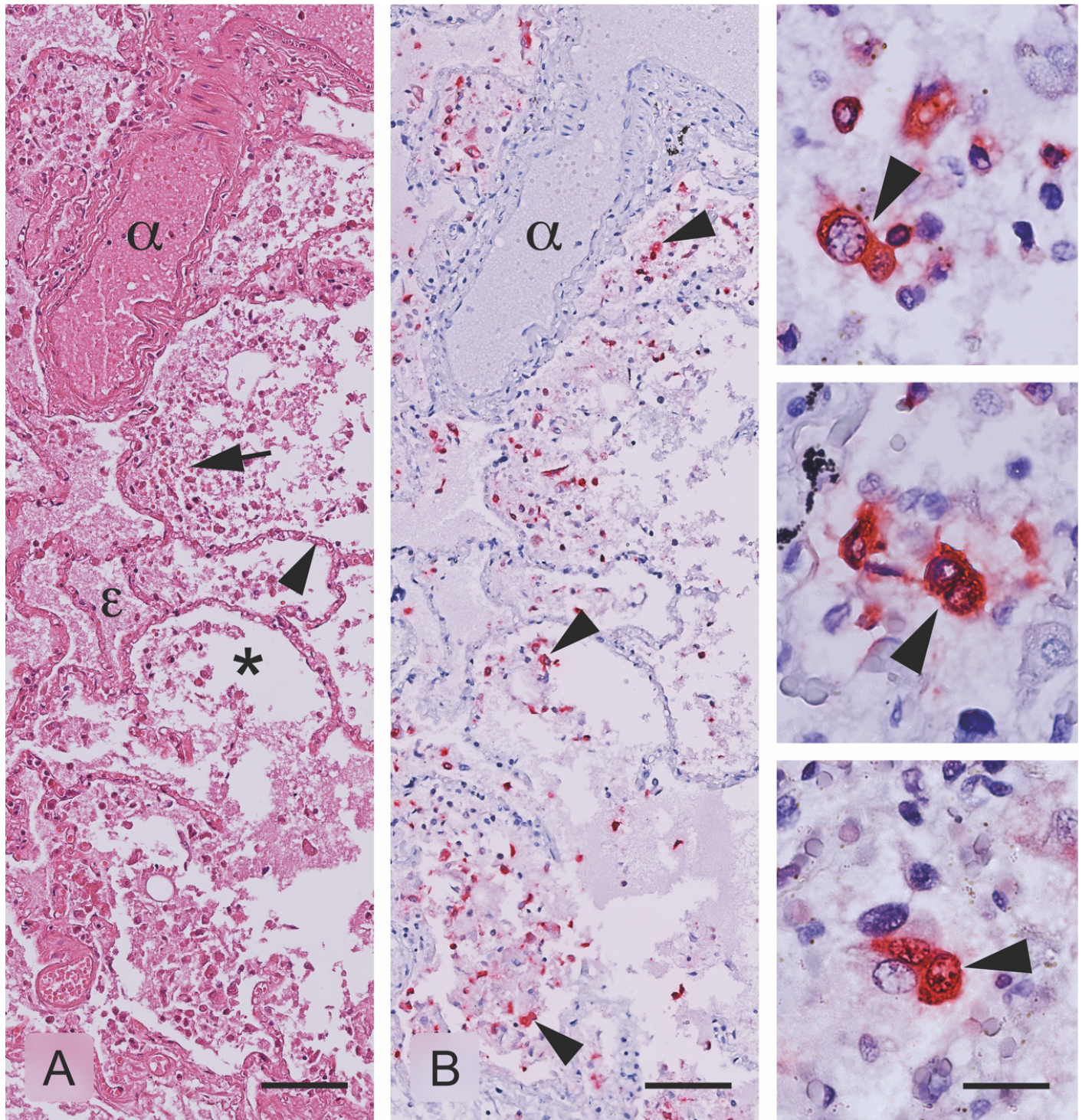


Figure 1. Detection of SARS-CoV-2 antigens in lung tissue of a fatal case with exudative fibrinous pneumonitis and diffuse pulmonary edema. A) Lung tissue in which the alveolus (*), artery (α), and pulmonary edema (ϵ) are observed. The arrow indicates inflammatory cellular infiltrate in the alveolar space. The arrowhead indicates the interalveolar septum where gas exchange takes place, HE stain. B) Arrowheads indicate immunoreaction to SARS-CoV-2 antigens. Images at the right column show viral antigens mainly located in the cytoplasm of inflammatory infiltrate cells, likely macrophages and immune response cells. Immunohistochemistry was performed using the MACH4 Universal AP Polymer Kit™ and visualized with Warp Red. For the detection, a preparation of rabbit anti-SARS nucleocapsid protein antibody (Novus Biologicals-NB100-56576, 1:100 dilution in DaVinci green diluent - Biocare Medical) was used.

Scales in A and B = 50 μ m; scales in the enlarged right column images = 10 μ m

No viral antigens have been observed in the heart, liver, kidney, spleen or intestine. However, in a study that evaluated the tropism profile of SARS-CoV-2 in human cell lines derived from different organs such as lungs (A549, Calu-3, HFL), intestine (Caco2), liver (Huh7), kidney (293T), and muscle (RD), glioblastoma cell lines (U251) and cervical tissue (HeLa), it was found that five of these were susceptible to this infection with significant viral replication. Calu3 and Caco2 cell lines, followed by Huh7 and 293T, showed robust replication while U251 showed modest replication (11). This last finding may correlate with the observation that up to 9% of patients with COVID-19 developed confusion or dizziness and some have presented loss of smell and loss of taste (12,13).

The histopathological findings in cases of SARS-CoV-2 are nonspecific alterations. The presence of diffuse alveolar damage in the acute (exudative) and proliferative (fibroproliferative) phases is prominent, including in patients without ventilatory support requirement (14,15). Other alterations in pulmonary morphology have also been observed, including suppurative pneumonia (14), hyaline membranes, capillary congestion (14), inflammatory infiltrate (acute bronchopneumonia) (15), thrombosis (16), and chronic inflammation of the trachea, bronchi, and bronchioles (17).

Figure 1 shows lung tissue of a fatal case corresponding to a 61-year-old man who presented sudden respiratory distress and was positive for COVID-19 by real-time RT-PCR using lung tissue samples obtained during the postmortem tissue biopsy. In routine histopathological analysis, acute fibrinous exudative pneumonitis with diffuse alveolar edema suggestive of viral origin was observed. SARS-CoV-2 antigen localization assays via chromogenic immunohistochemistry was observed mainly in inflammatory infiltrate cells and in alveolar areas, confirming SARS-CoV-2 infection of the lungs.

References

1. Park SE. Epidemiology, virology, and clinical features of severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 (SARS-CoV-2; Coronavirus Disease-19). *Clin Exp Pediatr*. 2020;63:119-24. <https://doi.org/10.3345/cep.2020.00493>
2. World Health Organization. COVID-19 Weekly Epidemiological Update 2021. Accessed: February 23, 2021. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update---23-february-2021>
3. Álvarez-Díaz DA, Franco-Muñoz C, Laiton-Donato K, Usme-Ciro JA, Franco-Sierra ND, Flórez-Sánchez AC, *et al.* Molecular analysis of several in-house rRT-PCR protocols for SARS-CoV-2 detection in the context of genetic variability of the virus in Colombia. *Infect Genet Evol*. 2020;84. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104390>
4. Instituto Nacional de Salud. COVID-19 en Colombia. Accessed: February 25, 2021. Available at: <https://www.ins.gov.co/Noticias/Paginas/coronavirus-casos.aspx>
5. Belouzard S, Millet JK, Licitra BN, Whittaker GR. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses*. 2012;4:1011-33. <https://doi.org/10.3390/v4061011>
6. Zhang H, Penninger JM, Li Y, Zhong N, Slutsky AS. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: Molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Med*. 2020;46:586-90. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-05985-9>
7. Ding Y, He L, Zhang Q, Huang Z, Che X, Hou J, *et al.* Organ distribution of severe acute respiratory syndrome (SARS) associated coronavirus (SARS-CoV) in SARS patients: Implications for pathogenesis and virus transmission pathways. *J Pathol*. 2004;203:622-30. <https://doi.org/10.1002/path.1560>
8. Farcas GA, Poutanen SM, Mazzulli T, Willey BM, Butany J, Asa SL, *et al.* Fatal severe acute respiratory syndrome is associated with multiorgan involvement by coronavirus. *J Infect Dis*. 2005;191:193-7. <https://doi.org/10.1086/426870>
9. Satija N, Lal SK. The molecular biology of SARS coronavirus. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1102:26-38. <https://doi.org/10.1196/annals.1408.002>

10. Martines R, Ritter J, Matkovic E, Gary J, Bollweg B, Bullock H, *et al.* Pathology and pathogenesis of SARS-CoV-2 associated with fatal coronavirus disease, United States. *Emerg Infect Dis.* 2020;26:2005. <https://doi.org/10.3201/eid2609.202095>
11. Chu H, Chan JF-W, Yuen TT-T, Shuai H, Yuan S, Wang Y, *et al.* Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: An observational study. *Lancet Microbe.* 2020;1:e14-e23. [https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(20\)30004-5](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(20)30004-5)
12. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, *et al.* Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA.* 2020;323:1061-9. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1585>
13. Vaira LA, Salzano G, Deiana G, De Riu G. Anosmia and ageusia: Common findings in COVID-19 patients. *Laryngoscope.* 2020;130:1787. <https://doi.org/10.1002/lary.28692>
14. Menter T, Haslbauer JD, Nienhold R, Savic S, Hopfer H, Deigendesch N, *et al.* Postmortem examination of COVID-19 patients reveals diffuse alveolar damage with severe capillary congestion and variegated findings in lungs and other organs suggesting vascular dysfunction. *Histopathology.* 2020;77:198-209. <https://doi.org/10.1111/his.14134>
15. Tian S, Xiong Y, Liu H, Niu L, Guo J, Liao M, *et al.* Pathological study of the 2019 novel coronavirus disease (COVID-19) through postmortem core biopsies. *Mod Pathol.* 2020;33:1007-14. <https://doi.org/10.1038/s41379-020-0536-x>
16. Griffin DO, Jensen A, Khan M, Chin J, Chin K, Saad J, *et al.* Pulmonary embolism and increased levels of d-Dimer in patients with coronavirus disease. *Emerg Infect Dis.* 2020;26:1941-3. <https://doi.org/10.3201/eid2608.201477>
17. Mohanty SK, Satapathy A, Naidu MM, Mukhopadhyay S, Sharma S, Barton LM, *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease 19 (COVID-19) - anatomic pathology perspective on current knowledge. *Diagn Pathol.* 2020;15:103. <https://doi.org/10.1186/s13000-020-01017-8>

Comentario

Llamado a la implementación de la Ley 2120 de 2021 contra la comida chatarra en los tiempos del COVID-19 en Colombia

Lina María García¹, Adolfo Contreras²

¹ Grupo Pacífico Siglo XXI y CEDETES, Escuela de Odontología, Universidad del Valle, Cali, Colombia

² Grupo Medicina Periodontal, Escuela de Odontología, Universidad del Valle, Cali, Colombia

Durante dos años y medio, tanto en Colombia como en el resto del mundo, hemos enfrentado la pandemia generada por el SARS-CoV-2, agudizando los múltiples problemas de salud pública que venían cursando a manera de sindemias. Tal es el caso de las enfermedades crónicas no transmisibles asociadas, entre otros factores, a los malos hábitos alimenticios, especialmente por el gran consumo de alimentos ultraprocesados y bebidas azucaradas. En julio del 2021, se aprobó la Ley 2120, por medio de la cual se adoptaron medidas para fomentar entornos alimentarios saludables.

Entre estas medidas, también se promueve que los alimentos empacados, procesados y que afectan negativamente la salud humana, tengan un sello que identifique sus componentes y valor nutricional para informar a los consumidores sobre el producto que están comprando o consumiendo.

Entre las enfermedades más prevalentes en Colombia que afectan la salud bucal, se encuentran las caries y las periodontitis, ambas con factores de riesgo comunes con las enfermedades crónicas no transmisibles. Dados sus costos y prevalencia, dichas enfermedades crónicas no transmisibles resultan primordiales desde un enfoque de gestión del riesgo en salud pública, siendo, quizá, su gravedad mayor durante la pandemia generada por el SARS CoV-2.

Asimismo, se especula que la población confinada pudo llegar a consumir más comida chatarra durante la pandemia del COVID-19 en comparación con otros periodos, además, porque en aquellos con enfermedades crónicas no transmisibles, el confinamiento obligado se asocia con mayor sedentarismo y con un menor número de controles médicos regulares, asuntos que se han reportado previamente.

La promulgación de la ley de comida chatarra no va a cambiar los hábitos de alimentación de los colombianos “de la noche a la mañana” y, por esto, se necesita con urgencia implementar procesos de educación y sensibilización frente a los efectos adversos de los alimentos procesados y ultraprocesados en la salud.

Palabras clave: infecciones por coronavirus; pandemias; alimentos; desnutrición; enfermedades no transmisibles; salud pública.

A call for implementation of the Law 2120 against junk food during pandemic times in Colombia

For more than one year and a half, Colombia and the world have been facing the effects caused by the pandemics of SARS CoV-2 with concomitant and aggravating deterioration of multiple public health problems such as noncommunicable diseases. Noncommunicable diseases are frequently associated with poor eating habits and regular consumption of processed and ultra-processed foods, among other important risk factors related to culture, genetics, and sedentarism.

In July, 2021, Colombia ratified the Law 2120 that promotes healthy food habits and recreational environments, by forcing food producers to include nutritional advertisement seals on processed food packages, with explanatory guidelines for consumers about calories and nutritional value.

This editorial note highlights the importance in Odontology of promoting and implementing this Law through education and sensitization of populations, in order to cope with some of the adverse risk factors of the hypercaloric diet.

Keywords: Coronavirus infections; pandemics; food; malnutrition; noncommunicable diseases; public health.

Recibido: 28/08/2021

Aceptado: 11/07/2022

Publicado: 25/07/2022

Citación:

García LM, Contreras A. Llamado a la implementación de la Ley 2120 de 2021 contra la comida chatarra en los tiempos del COVID-19 en Colombia. *Biomédica*. 2022;42(Supl.2):14-8. <https://doi.org/10.7705/biomedica.6303>

Correspondencia:

Lina María García, Escuela de Odontología, Universidad del Valle, sede San Fernando, Calle 3A N° 36B-00, Cali, Colombia
lina.garcia.z@correounivalle.edu.co

Contribución de los autores:

Lina María García: concepción y escritura
Adolfo Contreras: escritura del manuscrito

Financiación:

Para la realización de este artículo, los autores contaron con el apoyo financiero de la Universidad del Valle.

Conflicto de intereses:

Los autores del artículo declaran no tener ningún conflicto de interés.

En la última semana de julio del 2021, en Colombia se aprobó la Ley 2120 contra la comida chatarra, que promueve que los alimentos empacados, procesados y que afectan la salud humana, tengan sellos que identifiquen sus componentes y que revelen su valor nutricional para ilustrar a los consumidores sobre el producto que están comprando o consumiendo (1). Estos alimentos procesados y ultraprocesados normalmente aportan muchas calorías por su gran contenido de azúcares, grasas saturadas y sodio, y su contenido en fibra y en micronutrientes es poco o nulo. Además, estos supuestos alimentos procesados y ultraprocesados incorporan conservantes y saborizantes, como las sales de nitro y nitritos, y reforzadores del sabor, que inducen un consumo frecuente y desmesurado, lo cual incrementa el riesgo de sufrir sobrepeso y obesidad, así como de enfermedades crónicas no transmisibles (2).

En Colombia, la industria de alimentos informa en los empaques la cantidad de grasa, azúcar, sodio y calorías que contienen los productos, pero este etiquetado es insuficiente, puesto que la mayoría de los compradores desconocen cuál porcentaje de estos componentes es dañino, y cuál es el valor nutricional según las porciones (1). Desde mediados de marzo del 2020, el país se ha enfrentado a la emergencia sanitaria debida al virus SARS CoV-2, generándose un relativo confinamiento por ciudades y regiones, en el cual se especula que ha habido un incremento de hábitos de mala alimentación y de sedentarismo que preocupan a las autoridades de salud pública (2-4). En el estudio ENSIN-2020 realizado en el país, se reportó que el 56 % de los adultos en Colombia presenta sobrepeso y obesidad, y, además, que el sedentarismo ha venido aumentando entre los niños, los jóvenes y las mujeres (5). Esta situación puede haberse agravado con las medidas restrictivas interpuestas, y por el acceso restringido a los sitios de educación y trabajo, así como a gimnasios, piscinas, vías, parques y otros sitios para hacer deporte y recreación.

La comida chatarra más consumida en Colombia incluye: productos empacados –como papa, plátano y yuca fritos–, galletas, helados, chocolates y caramelos, productos de panadería y repostería, cereales, barras “energizantes”, mermeladas y jaleas, bebidas maltosas, gaseosas y azucaradas, y bebidas de chocolate; además, productos procesados y ultraprocesados listos para calentar o comer, tanto en el hogar como en locales de comida rápida, en donde es fácil encontrar preparaciones como pizzas, hamburguesas, mazorcadas y perros calientes, productos cárnicos apanados, pastas y postres en polvo o envasados, entre otros (6).

Uno de los problemas asociados con la comida chatarra es que se ingiere a cualquier hora del día, sin importar los horarios usuales de alimentación, al estar disponible para los consumidores las 24 horas de los 7 días de la semana. Asimismo, estos productos incorporan saborizantes que los hacen adictivos. Estos dañinos atributos de la comida chatarra predisponen a su consumo exagerado y promueve una dieta hipercalórica por alimentos procesados y ultraprocesados, por lo cual se asocian con la pandemia de las enfermedades crónicas no trasmisibles (7).

La situación puede agravarse aún más con las medidas de control sanitario que pretenden limitar la propagación del SARS CoV-2, que favorecen un mayor consumo de comida chatarra a causa del sedentarismo y el encierro, y mayores niveles de tensión emocional, que se asocian con una menor disponibilidad de espacios para disfrutar al aire libre.

Finalmente, los comerciantes de la comida chatarra utilizan la televisión, la radio, la prensa y los mensajes de texto por medio de teléfonos y otras aplicaciones digitales, para promover dicho consumo en todos los segmentos de la población, impactando, asimismo, en niños y jóvenes. Por el contrario, aquellos segmentos publicitarios asociados con las políticas del gobierno y del Ministerio de Salud que promueven una sana alimentación acompañada de actividad física, poseen canales de distribución y tiempos limitados en comparación con los que promueven alimentos procesados (8).

Consumo en Latinoamérica y en Colombia

En Latinoamérica, el consumo de azúcar es el doble de lo recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), con una media de 99,4 g al día, cuando la recomendación es de 52 g en este mismo lapso (9,10). La ingestión media de bebidas azucaradas en adultos en el mundo fue de 226 ml al día, siendo Latinoamérica la región con mayor consumo. México es el líder del consumo de gaseosas azucaradas a nivel global y posee, también, la más elevada tasa mundial de prediabetes y diabetes, a pesar de tener un impuesto destinado a controlar el consumo de estas bebidas. Esto se explica por la complejidad de los cambios de hábitos asociados con los valores sociales y las costumbres alimenticias, y a la cultura de las diferentes poblaciones. Es así como, en contraste, en Suecia se consume más agua y leche (10).

Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), debido al alto consumo de productos ultraprocesados y dañinos para la salud en Colombia, una dieta poco saludable es el segundo factor de riesgo asociado con el incremento de la morbilidad y mortalidad (4). Nueve de cada diez escolares no cumplen con la frecuencia de consumo de frutas y verduras recomendado por la OMS. Asimismo, el 82,4 % de estos niños consume productos de paquete, por lo menos, en uno de los siete días de la semana, y uno de cada dos consume comidas rápidas (11,12).

Enfermedades asociadas

Diversas enfermedades se han asociado con el excesivo consumo de alimentos y bebidas azucaradas tales como la diabetes, la obesidad mórbida, la enfermedad cardiovascular, el cáncer, el síndrome metabólico, la enfermedad renal crónica, asimismo, diversos problemas musculoesqueléticos y la caries (13).

En Colombia en los últimos 10 años, el sobrepeso y la obesidad se han incrementado en un 10 %, porcentaje similar al de consumo de bebidas gaseosas azucaradas (10). El exceso de peso en niños en edad escolar (5 a 12 años) se incrementó anualmente en un 1 % entre el 2010 y el 2015. El consumo de dos o más vasos diarios de bebidas ultraprocesadas, puede incrementar en 52 % el riesgo de morir a causa de infarto cardiaco, hipertensión arterial sistémica o derrame cerebral, entre otras condiciones.

Estos efectos acumulativos se hacen más evidentes entre la quinta y la sexta décadas de la vida (5,14). El consumo de productos procesados y ultraprocesados por niños en edad escolar se ha asociado con menor calidad nutricional y bajos niveles de ácidos grasos omega 3, vitaminas A, B12, C y E, así como de calcio y cinc (15). El consumo de este tipo de productos incrementa el riesgo de desarrollar diabetes, independientemente del peso corporal (16), así como el consumo de bebidas azucaradas incrementa hasta en un 28 % la incidencia de diabetes mellitus de tipo 2 (17).

Según el IV Estudio Nacional de Salud Bucodental (ENSAB-IV), el 91,58 % de las personas entre 12 y 79 años ha presentado caries dental en algún momento de su vida. De igual forma, el 33,27 % de los niños de 1, 3 y 5 años, ha tenido, a su corta edad, caries asociadas con el consumo excesivo de azúcares, y con fallas en la remoción frecuente y eficaz de la placa dental (18). Muchos padres de familia y cuidadores de niños en edad preescolar y escolar, no comprenden que la caries de la infancia temprana y en diferentes edades, se asocia con el consumo excesivo y habitual de bebidas azucaradas, como el agua de panela, y con rutinas de higiene bucal deficientes (19).

Implicaciones de la ley contra la comida chatarra

La Ley 2120 del 2021 pretende reducir las enfermedades crónicas más prevalentes, como la diabetes, la caries dental, las cardiovasculares y las cerebrovasculares, disminuyendo el consumo de azúcares, grasas y sal, y mejorando las capacidades de “compra y consumo responsable” de alimentos orientadas a una mejor selección de productos. La Ley debe ir acompañada de un proceso educativo a partir de estrategias que contengan información y actividades que refuercen los buenos hábitos y los estilos de vida saludables. Asimismo, se deben fomentar el deporte y la recreación, así como proponer pautas y acciones relacionadas con el seguimiento de los indicadores de las enfermedades no transmisibles y la promoción de entornos saludables, especialmente en niños y adolescentes. Estas propuestas serán lideradas por la Comisión Intersectorial de Seguridad Alimentaria y Nutricional (CISAN) (1).

Además, la Comisión de Regulación de Comunicaciones debe autorizar espacios institucionales en los canales de televisión abierta para promover hábitos saludables en horarios “pico”, lo cual se requiere para complementar el efecto que se espera que produzca la Ley 2021. Por otro lado, el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) debe asumir las actividades de inspección, vigilancia y control de lo dispuesto por esta Ley, así como controlar que la información sea verídica y que corresponda con el contenido real de los productos (1).

Se deben crear y promover entornos saludables en todos los espacios educativos y de recreación, que incluyan el consumo de agua potable, frutas y verduras, y una alimentación balanceada y saludable. De igual forma, se debe fomentar la actividad física e impulsar estrategias educativas para interpretar adecuadamente el etiquetado nutricional de los empaques.

Así como el Gobierno Nacional gestionó la promulgación de esta Ley es necesario avanzar en su reglamentación e implementación mediante un trabajo articulado con los profesionales de la salud y su inclusión en los planes de estudio. Igualmente, se requiere una articulación intersectorial entre los ministerios de Industria, Agricultura, Deporte y Recreación, Salud y Protección Social, y el de Educación Nacional, con el fin de poder garantizar una salud integral y mayor bienestar para la población colombiana.

Referencias

1. Congreso de la República. Ley 2120 del 30 de julio de 2021, Bogotá, D.C.: Congreso de la República; 2021.
2. Bong CL, Brasher C, Chikumba E, McDougall R, Mellin-Olsen J, Enright A. The COVID-19 pandemic: Effects on low-and middle-income countries. *Anesth Analg*. 2020;131:86-92 <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000004846>

3. Kretchy IA, Asiedu-Danso M, Kretchy JP. Medication management and adherence during the COVID-19 pandemic: Perspectives and experiences from low-and middle-income countries. *Res Social Adm Pharm.* 2021;17:2023-6. <https://doi.org/10.1016/j.sapharm.2020.04.007>
4. Red PaPaz. 2019: Exijamos la #LeyComidaChatarra. No comas más mentiras. Fecha de consulta: 7 de septiembre de 2021. Disponible en: <https://www.nocomasmentiras.org/>
5. Ministerio de Salud y Protección Social, Instituto Colombiano de Bienestar Familiar, Instituto Nacional de Salud, UN. Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia, ENSIN 2015. Bogotá, D.C.: Minsalud; 2017. <https://www.icbf.gov.co/bienestar/nutricion/encuesta-nacional-situacion-nutricional>
6. Organización Panamericana de la Salud. Alimentos y bebidas ultraprocesados en América Latina: tendencias, efecto sobre la obesidad e implicaciones para las políticas públicas. Washington, D.C.: OPS; 2015. https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/7698/9789275318645_esp.pdf
7. Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Ammirati E, Baddour LM, *et al.* Global burden of cardiovascular diseases and risk factors. 1990-2019 update from the GBD 2019 study. *J Am Coll Cardiol.* 2020;76:2982-3021. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.11.010>
8. University of Washington. Institute for Health Metrics and Evaluation. Global burden of disease study, 2016. Fecha de consulta: 7 de septiembre de 2021. Disponible en: <https://ghdx.healthdata.org/gbd-2016>
9. Fisberg M, Kovalskys I, Gómez G, Rigotti A, Cortés, Sanabria LY, *et al.* Total and added sugar intake: Assessment in eight Latin American countries. *Nutrients.* 2018;10:389-407. <https://doi.org/10.3390/nu10040389>
10. Ministerio de Salud y Protección Social. Panorama de la salud de los escolares en Colombia. Bogotá, D. C.: Minsalud; 2018. <https://www.minsalud.gov.co/Paginas/Panorama-de-la-salud-de-los-escolares-en-Colombia.aspx>
11. Chaloupka FJ, Powell LM, Warner KE. The use of excise taxes to reduce tobacco, alcohol, and sugary beverage consumption. *Annu Rev Public Health.* 2019 40:187-201. <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-040218-043816>
12. Federación Dental Internacional. El desafío de las enfermedades bucodentales – Una llamada a la acción global. Atlas de Salud Bucodental. Segunda edición. Ginebra: Federación Dental Internacional; 2015. https://www.fdiworlddental.org/sites/default/files/2021-03/book_spreads_oh2_spanish.pdf
13. Vecino-Ortiz AI, Arroyo-Ariza D. A tax on sugar sweetened beverages in Colombia: Estimating the impact on overweight and obesity prevalence across socio economic levels. *Soc Sci Med.* 2018;209:111-6. <https://doi.org/10.1016/j.socscimed.2018.05.043>
14. Mullee A, Romaguera D, Pearson-Stuttard J, Viallon V, Stepien M, Freisling H, *et al.* Association between soft drink consumption and mortality in 10 European countries. *JAMA Intern Med.* 2019;179:1479-90. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2019.2478>
15. Cornwell B, Villamor E, Mora-Plazas M, Marín C, Monteiro CA, Baylin A. Processed and ultra-processed foods are associated with lower-quality nutrient profiles in children from Colombia. *Public Health Nutr.* 2017;21:142-7. <https://doi.org/10.1017/S1368980017000891>
16. Malik VS, Popkin BM, Bray GA, Després J-P, Hu FB. Sugar-sweetened beverages, obesity, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular disease risk. *Circulation.* 2010;121:1356-64. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.876185>
17. Imamura F, O'Connor L, Ye Z, Mursu J, Hayashino Y, Bhupathiraju SN, *et al.* Consumption of sugar sweetened beverages, artificially sweetened beverages, and fruit juice and incidence of type 2 diabetes: Systematic review, meta-analysis, and estimation of population attributable fraction. *BMJ.* 2015;351:3576. <https://doi.org/10.1136/bmj.h3576>
18. Ministerio de Salud y Protección Social. Abecé sobre IV Estudio Nacional de Salud Bucal "Para saber cómo estamos y saber qué hacemos" Fecha de consulta: 7 de septiembre de 2021. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ENT/abc-salud-bucal.pdf>
19. García LM ,et al Prevalencia de caries y enfermedad periodontal en escolares del sector público de Cali, 2005. <https://colombiamedica.univalle.edu.co/index.php/comedica/article/download/563/930?inline=1>

Original article

Efficacy and safety of four COVID-19 vaccines in preventing SARS-CoV-2 infection: A rapid review

Lina Sofía Morón-Duarte, Kelly Rocío Chacón, María Paula Gutiérrez, Ilich Herbert De La Hoz, Nancy Yomayusa

Instituto Global de Excelencia Clínica-Keralty, Grupo de Investigación Traslacional, Universidad Sanitas, Bogotá, D.C., Colombia

Introduction: Since the emergence of the SARS-CoV-2, there have been efforts to develop vaccines to control the COVID-19 pandemic.

Objective: The present study assessed the efficacy and safety of the BNT162b2, mRNA-1273, ChAdOx1/AZD1222 and Gam-COVID-Vac rAd26-S/rAd5-S vaccines against the SARS-CoV-2.

Materials and methods: We searched PubMed/MEDLINE, Google Scholar, Cochrane, and the WHO International Clinical Trials Registry Platform on March 15, 2021. The search terms used were: “vaccine” OR “vaccination” AND “covid19” OR “coronavirus” OR “sarscov2” AND “bnt162b2” OR “chadox1-s” OR “azd1222” OR “sputnik” OR “Gam-COVID-Vac” OR “mrna” OR “mRNA-1273”. We measured the risk of bias of the studies and the quality of the evidence using GRADE profiles. A qualitative and quantitative analysis of the results of clinical trials is presented.

Results: Of the 74 identified studies, 4 were finally included in this review. The efficacies of the BNT162b2, mRNA-1273, ChAdOx1/AZD1222 and Gam-COVID-VacrAd26-S/rAd5-S vaccines against symptomatic COVID-19 were 95,0% (CI_{95%} 90,3-97,6), 94,1% (CI_{95%} 89,3-96,8), 66,7% (CI_{95%} 57,4-74,0), and 91,1% (CI_{95%} 83,8-95,1), respectively. There was moderate certainty of the evidence due to serious indirectness, when we measured the risk of bias of the studies and the quality of the evidence using GRADE profile. The safety profiles were acceptable, and data on serious adverse events (summary RR=0,93; CI_{95%} 0,77-1,12; p=0,16) and deaths from all causes (summary RR=0,70; CI_{95%} 0,33-1,50; p=0,90) showed no significant differences.

Conclusion: The results of this review support the level of evidence for the efficacy and safety of the COVID-19 vaccines analysed.

Keywords: Coronavirus infections; vaccines; treatment outcome; safety.

Received: 30/08/2021

Accepted: 14/02/2022

Published: 17/02/2022

Citation:

Morón-Duarte LS, Chacón KR, Gutiérrez MP, De la Hoz IH, Yomayusa N. Efficacy and safety of four COVID-19 vaccines in preventing SARS-CoV-2 infection: A rapid review. *Biomédica*. 2022;42(Supl.2):19-31.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.6254>

Corresponding author:

Lina Sofía Morón-Duarte, Calle 127 N° 20-56, piso 6, Bogotá, D.C., Colombia
Phone number: (571) 745 5100, extensión 5714599
ismoron@colsanitas.com; sofismodu@yahoo.com

Author contributions:

Lina Sofía Morón-Duarte: Design of the study, collection, analysis, interpretation of the data and writing of the manuscript.
Kelly Rocío Chacón, Ilich Herbert De La Hoz: Data collection, analysis and interpretation, and manuscript writing
María Paula Gutiérrez: Data collection, analysis and interpretation
Nancy Yomayusa: Study conception and manuscript writing

Funding:

Not applicable.

Conflicts of interest:

The authors declare no conflicts of interest.

Eficacia y seguridad de cuatro vacunas COVID-19 para prevenir la infección por SARS-CoV-2: una revisión rápida

Introducción. Desde que surgió el virus SARS-CoV-2, se han realizado esfuerzos para desarrollar vacunas para controlar la pandemia por COVID-19.

Objetivo. Evaluar los datos de la eficacia y seguridad de las vacunas BNT162b2, mRNA-1273, ChAdOx1/AZD1222 y Gam-COVID-Vac rAd26-S/rAd5-S contra el SARS-CoV-2.

Materiales y métodos. Se realizaron búsquedas en PubMed/MEDLINE, Google Scholar, Cochrane y la Plataforma de Registro Internacional de Ensayos Clínicos de la OMS el 15 de marzo de 2021. Los términos usados fueron: “vaccine” OR “vaccination” AND “covid19” OR “coronavirus” OR “sarscov2” AND “bnt162b2” OR “chadox1-s” OR “azd1222” OR “sputnik” OR “Gam-COVID-Vac” OR “mrna” OR “mRNA-1273”. Se midió el riesgo de sesgo de los estudios y la calidad de la información por medio de los perfiles GRADE. Se presenta un análisis cualitativo y cuantitativo de los resultados de los estudios clínicos.

Resultados. Se identificaron 74 estudios y se incluyeron 4 en la revisión. La eficacia de las vacunas BNT162b2, mRNA-1273, ChAdOx1/AZD1222 y Gam-COVID-VacrAd26-S/rAd5-S contra la COVID-19 sintomática fue del 95,0 % (IC_{95%} 90,3-97,6), 94,1 % (IC_{95%} 89,3-96,8), 66,7 % (IC_{95%} 57,4-74,0) y 91,1 % (IC_{95%} 83,8-95,1), respectivamente, y hubo una certeza moderada de la información debido a la falta de evidencia directa. Los perfiles de seguridad fueron aceptables, y los eventos adversos graves (RR resumido=0,93; IC_{95%} 0,77-1,12; p=0,16) y muerte por todas las causas (RR resumido=0,70; IC_{95%} 0,33-1,50; p=0,90) no mostraron diferencias significativas.

Conclusión. Los resultados de esta revisión respaldan el nivel de evidencia de la eficacia y seguridad de las vacunas COVID-19 que fueron analizadas.

Palabras clave: infecciones por coronavirus; vacunas; resultado del tratamiento; seguridad

The coronavirus disease 2019 (COVID-19) caused by the novel coronavirus 2019 (2019-nCoV) (1), also called severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) (2), has resulted in more than 160 million confirmed cases and 5 million deaths worldwide (November 29, 2021) (3). COVID-19 pandemic endangered global public health and economies and necessitated the development of effective vaccines to protect at-risk populations.

Containment measures failed to stop the spread of the virus, and there are no specific treatments against COVID-19. Vaccines prepare the immune system to detect and counteract viruses with greater success than other interventions. Successful cases of mass vaccination have controlled or eliminated smallpox, poliomyelitis, measles and rubella in America, which avoided illness, premature death and health costs (4).

Efforts to develop SARS-CoV-2 vaccines to control the pandemic have been underway since the virus emerged, with more than 500 candidate vaccines in clinical trials (5). Some vaccine development are more advanced than others. More than 80 candidate vaccines are being tested in humans (6). The impact of COVID-19 vaccines on the pandemic depends on several factors: the effectiveness of the vaccines; the speed of vaccine approval, manufacture, and delivery; the possible development of other variants; individual factors; and the number of people vaccinated (7).

The BNT162b2 (Pfizer BioNTech), mRNA-1273 (Moderna), ChAdOx1-S (Oxford University/AstraZeneca), and rAd26-S/rAd5-S (Gam-COVID-Vac) vaccines received emergency use authorization in some countries (8-10). The main countries where clinical trials of BNT162b2 vaccine were performed are the United States, Argentina, Brazil, Germany, South Africa, and Turkey. For ChAdOx1-S, the United Kingdom, South Africa and Brazil. The United States for mRNA-1273, and the Russian Federation for Gam-COVID-Vac rAd26-S/rAd5-S. The World Health Organization (WHO) has also granted EUA to BNT162b2, mRNA-1273 and ChAdOx1-S vaccines (11).

Due to these public policy decisions on health, besides the promising preliminary results of these vaccines against the virus SARS-CoV-2 and the initiation of mass vaccination campaigns, it is necessary to evaluate the available evidence on its efficacy and safety.

Materials and methods

We adhered to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines throughout the manuscript (12). The results were submitted to the International Register of Systematic Perspective Reviews (PROSPERO) and approved with registration number CRD42021229802. Two researchers performed the screening process independently and applied pre-established inclusion and exclusion criteria to select studies for a complete reading.

Search strategy

On March 15, 2021, we searched in PubMed/MEDLINE, Google Scholar, Cochrane, and the WHO International Clinical Trials Registry Platform. The search terms used were: "vaccine" OR "vaccination" AND "covid19" OR "coronavirus" OR "sarscov2" AND "bnt162b2" OR "chadox1-S" OR "azd1222" OR "sputnik" OR "Gam-COVID-Vac" OR "mrna" OR "mRNA-1273". These terms could be found anywhere in the article, title, or abstract. The search

equations used for each of the databases are provided in online supplement 1. The Rayyan® web application was used to organise the list of references, remove duplicates, and obtain the full document for review.

Inclusion criteria

According to the PICOT question-model, population, intervention, comparison, and outcomes are shown in Table 1.

Studies: Randomized clinical trials (RCT) phases II/III and III in humans.

Results report: Studies that reported individual effect estimates for each primary research study that was attributable to the comparison of interest and at least one outcome.

- No language or country restrictions were applied.

Exclusion criteria

We did not include studies that were only available on abstract format, because the information reported is insufficient to evaluate methodological quality.

Data collection and analysis

Screening and selection of studies

Two reviewers screened the total number of references identified in the search by examining the titles and abstracts against independently predefined eligibility criteria. From the group of pre-selected references, a smaller number of studies were selected. The reviewers verified that each study met the eligibility criteria by reading the full text on each publication. Disagreements were resolved via consensus. To extract the information, a standardized Excel tool was used, which was tested by the reviewers before use. The structure was based on collecting information on the basic characteristics of each study, such as participants, intervention (vaccine), comparators and outcomes. The data extraction was performed in duplicate and subsequently verified by the researchers involved, who compared the extracted data with the studies.

Reviewers selected the effect estimates of for the comparison and critical outcomes from reported values in the studies.

Table 1. Research questions using the PICOT framework

Populations	Persons with specific characteristics of each study
Interventions	Vaccines: BNT162b2 (Pfizer Biontech) mRNA-1273 (Moderna) ChAdOx1/AZD1222 (Oxford University/AstraZeneca) Gam-COVID-Vac rAd26-S/rAd5-S
Comparators	Placebo or any control arm, including no vaccine or other vaccines/alternate vaccine
Outcomes	Efficacy: <ul style="list-style-type: none"> • Symptomatic SARS-CoV-2 infection confirmed by laboratory • Hospitalization for COVID-19 • Asymptomatic SARS-CoV-2 infection Safety: <ul style="list-style-type: none"> • Adverse events (any serious, moderate or mild adverse event) • Death from all causes

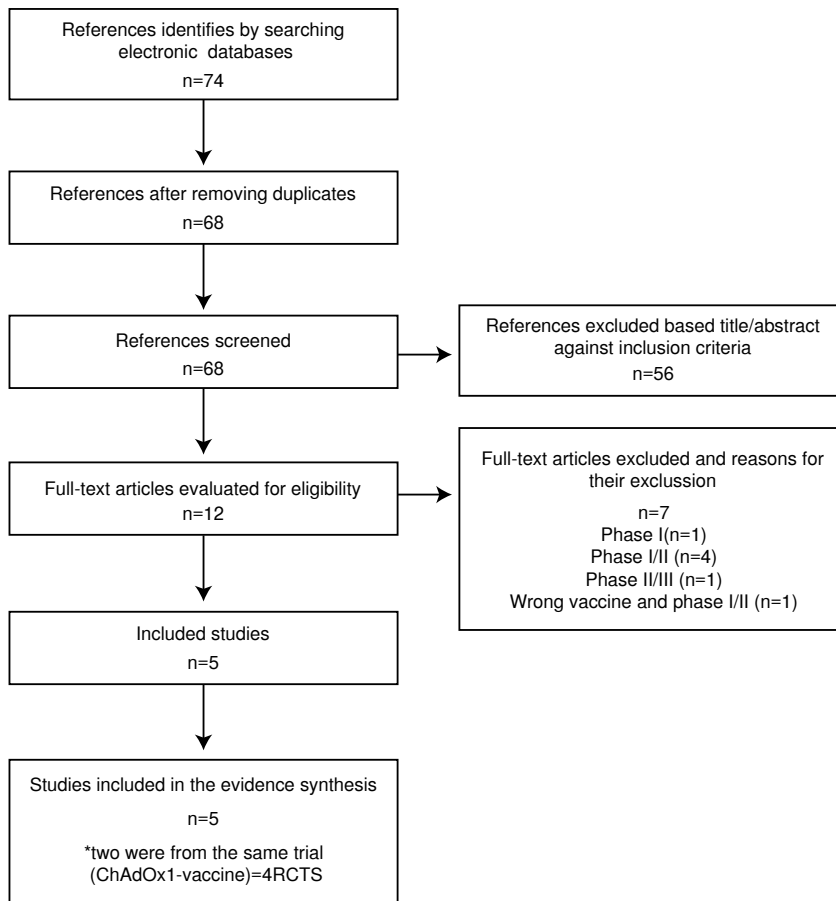


Figure 1. Flowchart of study selection conforming to PRISMA (12)

Assessments of risk of bias and certainty of the evidence

The Cochrane risk of bias tool was used to assess the following domains: randomization, deviations from intended intervention, missing outcome data, measurement of the outcome, selection of the reported results, and overall risk of bias (13). Studies were categorized as: “high risk”, “low risk” or “some concerns”. The certainty of the evidence was measured using GRADE profiles (14). A single-first reviewer author rated the risk of bias and certainty of the evidence for each study, and a second reviewer author checked the ratings.

Statistical analysis

Abstracted data were aggregated in tables. Risk ratios (RR), risk differences and corresponding 95% confidence intervals ($CI_{95\%}$) were calculated or extracted from the selected publications. We computed the RR for the outcomes of the adverse events and serious adverse events. Data on the vaccine efficacy were extracted from the publications and calculated $([1 - (\text{risk ratio or rate ratio comparing vaccine and placebo recipients})] \times 100)$ for the outcome asymptomatic or unknown infection of the vaccine ChAdOx1-S.

We performed inverse variance-weighted random-effects meta-analyses using the Paule and Mandel τ^2 estimator for heterogeneity (15). Heterogeneity across the RCTs was described using the I^2 and τ^2 metrics (16). Data were analysed using the statistical package Stata™, version 15 (Stata Corporation, College Station, Texas, United States).

Results

Figure 1 shows the search results, screening, and selection of evidence for this rapid review. The search of the identified databases detected 74 documents. After exclusion of duplicates, 68 articles remained for title and abstract screening. Fifty-six of these papers were deemed irrelevant according to the titles and abstracts and were later excluded. We assessed the full text of the remaining 12 articles: seven of these articles were excluded due to RCT phase I (n=1), phase I/II (n=4), phase II/III (n=1, no outcomes of interest), and wrong vaccine and phase I/II (n=1). Bibliographic data of these 7 studies were excluded after full-text assessment (17-23). Of the 5 included articles,

Table 2. Characteristics of the included studies

Study	Polack, 2020 [24]	Baden, 2020 [25]	Voysey, 2020 [26] [27]	Logunov, 2021 [28]
Vaccine platform description	RNA based vaccine	RNA based vaccine	Wnr, Viral vector (Non-replicating)	Wnr, Viral vector (Non-replicating)
Phase	III	III	III	III
Population/sample size in phase III clinical trial recruitment	Persons aged ≥16 years/37.724	Persons aged 18≥years/30.351	Persons aged 18≥years/17.177	Persons aged 18≥years/19.866
Intervention	Pfizer-BioNTech COVID-19 vaccine BNT162b2 (30 µg, 2 doses IM, 21 days apart)	Moderna COVID-19 vaccine mRNA -1273 (100 µg, 2 doses IM, 28 days apart)	AstraZeneca + University of Oxford COVID-19 vaccine ChAdOx1-S - (AZD1222) (Covishield) (2 doses IM, 28 days apart)	Gam-COVID-Vac combined vector vaccine, 0.5 ml/dose+0.5 ml/dose prime-boost immunization in days 1 (component I rAd26-S) and 21(component II rAd5-S)
Comparison	No Pfizer-BioNTech COVID-19 vaccine/placebo	No COVID-19 vaccine	Meningococcal Group A, C, W, and Y conjugate vaccine or (MenACWY) saline	Placebo, 0.5 ml/dose+0.5 ml/dose immunization in days 1 and 21
Countries	United States; Argentina; Brazil; Germany; South Africa; Turkey	United States	United Kingdom, South Africa, and Brazil	Russian Federation
No. of patients by groups				
Vaccine group	18,860	15,170	8,597	14,964
Placebo group	18,864	15,181	8,580	4,902
Age median or mean (SD)				
Vaccine group	52 (16-89)	51.4 (18-95)	NR	45.3 (SD=12.0)
Placebo group	52 (16-91)	51.3 (18-95)	NR	45.3 (SD=11.9)
Percentage of the population at high risk (>55 years)	40.90%	42%	12.20%	34.2% (>51 years)
Sex No. (%)				
Vaccine group				
Male	9,639 (51.1)	7,923 (52.2)	3,779 (44.0)	9,143 (61.1)
Female	9,221 (48.9)	7,258 (47.8)	4,816 (56.0)	5,821 (38.9)
Placebo group				
Male	9,436 (50.1)	8,062 (53.1)	3,601 (42.0)	3,015 (61.5)
Female	9,410 (49.9)	7,108 (46.9)	4,980 (58.0)	1,887 (38.5)
Comorbidities				
Vaccine group	with any Charlson comorbidity: 3,934 (20.9)	Chronic lung disease: 710 (4.7); severe obesity: 1,025 (6.8); diabetes: 1,435 (9.5); liver disease: 100 (0.7)	Cardiovascular disease: 1,040/8,241 (12.6); respiratory disease: 872/8,241 (10.6); diabetes: 237/8,241(2.9)	Concomitant diseases (diabetes, hypertension, ischaemic heart disease, obesity): 3,687/14,944 (24.7)
Placebo group	with any Charlson comorbidity: 3,809 (20.2)	Chronic lung disease: 744 (4.9); severe obesity: 1,021 (6.7); diabetes: 1,440 (9.5); liver disease: 96 (0.6)	Cardiovascular disease: 999/8,196 (12.2); respiratory disease: 872/8,196 (10.6); diabetes: 23/8,196 (2.5)	Concomitant diseases (diabetes, hypertension, ischaemic heart disease, obesity): 1,235/4,892 (25.2)

SD: Standard deviation

two reports were from the same trial (ChAdOx1-S vaccine). When outcomes were reported in both publications, the updated version was used. A total of 4 RCTs were included, and all studies were performed in high- or middle-income countries, such as the United States, Argentina, Brazil, Germany, South Africa, Turkey, United Kingdom and the Russian Federation. There were 105,118 participants (57,591 randomized to the vaccine against COVID-19 and 47,527 to placebo) (24-28). The age of the participants at study entry ranged from 16 to 85 years. We summarized the characteristics of the studies included in Table 2.

Risk of bias

The overall risk of bias was classified as having some concerns in all 4 RCTs due to deviations in the interventions. In general, all trials assessed the main efficacy outcomes using per-protocol and not intention-to-treat analyses. Details of the risk of bias assessment are provided in online supplement 2.

Data availability

Symptomatic SARS-CoV-2 infection confirmed by laboratory, severe or critical disease due to COVID-19, serious adverse events and all-cause mortality were assessed in all 4 RCTs (24-28) (Tables 3 and 4). The outcomes of hospitalization for COVID-19 and asymptomatic SARS-CoV-2 infection were reported in one RCT (Tables 3 and 4) (26,27).

Efficacy outcomes

The efficacies of the vaccines BNT162b2, mRNA-1273, ChAdOx1-S and Gam-COVID-VacrAd26-S/rAd5-S against SARS-CoV-2 infection (COVID-19) via assessment of symptomatic SARS-CoV-2 infection confirmed by a laboratory after the second dose were 95.0% (CI_{95%} 90.3-to 97.6), 94.1% (CI_{95%} 89.3-96.8), 66.7% (CI_{95%} 57.4-74.0) and 91.1% (CI_{95%} 83.8-95.1), respectively (24-28). The efficacy results after the first doses were also reported (Table 3). The efficacy of vaccine BNT162b2 against severe disease due to COVID-19 was 88.9% (CI_{95%} 12.5 to 98.6), and 100% for the other vaccines (mRNA-1273, ChAdOx1-S and Gam-COVID-VacrAd26-S/rAd5-S) (24-28). The efficacy of the vaccine ChAdOx1 in asymptomatic or unknown SARS-CoV-2 infection participants was 22.2% (CI_{95%} -9.9 to 45.0), and 100% in hospitalized patients with COVID-19 (Table 3) (26,27). Vaccine efficacy in subgroups defined by age, sex, and race was generally consistent with the overall population (Table 4). Efficacy meta-analysis was not performed because RCTs assessed this outcome differently.

Adverse events

More vaccine recipients than placebo recipients reported any serious moderate or mild adverse events (Table 5) (24-28). Serious adverse events did not show statistically significant differences between the analysis groups. Across the 4 RCTs, the summary RR for serious adverse events was 0.93 (CI_{95%} 0.77-1.12; p=0.16). The heterogeneity between trials was (I²=42.5%; τ²=0.02; p=0.424). Reports of deaths from all causes were rare. Across the 4 RCTs, the summary RR for all-cause mortality with vaccines against SARS-CoV-2 infection was 0.70 (CI_{95%} 0.33-1.50; p=0.90). There was no significant difference between-trial heterogeneity (I²=0%; τ²=0; p=0.358) (Figures 1 s and 2 s in online Supplement 3). No participant who received any vaccine died of COVID-19 (24-28). There was one death from COVID-19 in the placebo group in the RCT of the mRNA-1273 vaccine (25).

Table 3. Efficacy of vaccination against SARS-CoV-2 infection (COVID-19)

Study	Symptomatic SARS-CoV-2 infection confirmed by laboratory												Severe disease due to COVID-19		Asymptomatic or unknown infection			Hospitalization due to COVID-19			
	n of events/n of participants		VE (CI ₉₅ %)	n of events/n of participants		VE (CI ₉₅ %)	n of events/n of participants		VE (CI ₉₅ %)	n of events/n of participants		VE (CI ₉₅ %)	n of events/n of participants		VE (CI ₉₅ %)	n of events/n of participants		VE (CI ₉₅ %)			
	Vaccine	Placebo	After dose 2	Vaccine	Placebo	After dose 1	Vaccine	Placebo	From 14 days after dose 1	Vaccine	Placebo	From day 22 to day 90 after dose 1	Vaccine	Placebo	Vaccine	Placebo	Vaccine	Placebo	Vaccine	Placebo	
Polack, 2020 [24]	8/17,411	162/17,511	95.0% (90.3 to 97.6)*	50/21,669	275/21,686	82.0% (75.6 to 86.9)	2/21,669	27/21,686	92.6% (69.0 to 98.3)	NA	NA	NA	1/21,314	9/21,259	88.9% (12.5 to 98.6)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Baden, 2020 [25]	11/14,134	185/14,073	94.1% (89.3 to 96.8)**	NA	NA	NA	2/14,550	35/14,598	94.3% (76.2 to 98.6)	NA	NA	NA	0/14,134	30/14,073	100%	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Voysey, 2021 [26] [27]	84/8,597	248/8,580	66.7% (57.4 to 74.0)**	NA	NA	NA	NA	NA	NA	17/9,257	71/9,237	76.0% (59.3-85.9)	0/12,021	1/11,724	100%	41/2,692	42/2,751	2.0% *** (-50.7 to 36.2)	0/11,794	15/11,776	100%
Logunov, 2021 [28]	13/14,094	47/4,601	91.1% (83.8 to 95.1)*	16/14,964	62/4,902	91.6% (85.6 to 95.2)	30/14,999	79/4,950	87.6% (81.1 to 91.8)	NA	NA	NA	0/14,964	20/4,902	100%	16/1,379	31/1385	49.3%**** (7.4 to 72.2)	NA	NA	NA
																57/4,071	73/4,136	22.2% (-9.9 to 45.0)****	NA	NA	NA

*7 days after the second dose; ** 14 days after the second dose; VE: vaccine efficacy; NA: not applicable; ***Two standard doses; ****Low dose plus standard dose; ***** All doses

Table 4. Vaccine efficacy according to age, sex, and race subgroup

Age group	Polack, 2020 [24]			Age group	Baden, 2020 [25]			Voysey, 2021[26] [27]			Age group	Logunov, 2021 [28]		
	BNT162b2 (n=18,198)	Placebo (n=18,325)	VE (95% CI)		mRNA-1273 (n=14,134)	Placebo (n=14,073)	VE (CI ₉₅ %)	ChAdOx1	Placebo	VE (CI ₉₅ %)		Gam-COVID-Vac rAd26-S/rAd5-S (N=14,964)	Placebo (N=4,902)	VE (CI ₉₅ %)
16 to 55 yr	5/9,897	114/9,955	95.6 (89.4 to 98.6)	≥18 - <65 yr	7/10,551	156/10,521	95.6 (90.6 to 97.9)	NR	NR	NR	18-30	1/1,596	4/521	91.9% (51.2 to 99.3)
>55 yr	3/7,500	48/7,543	93.7 (80.6 to 98.8)	≥65 yr	4/3,583	29/3,552	86.4 (61.4 to 95.2)	NR	NR	NR	31-40	4/3,848	13/1,259	90.0% (71.1 to 96.5)
≥65 yr	1/3,848	19/3,880	94.7 (66.7 to 99.9)					NR	NR	NR	41-50	4/4,399	15/1,443	91.3% (73.7 to 96.9)
≥75 yr	0/774	5/785	100.0 (-13.1 to 100.0)					NR	NR	NR	51-60	5/3,510	22/1,146	92.7% (81.1 to 97.0)
											>60	2/1,611	8/533	91.8% (67.1 to 98.3)
Sex				Sex				Sex						
Male	3/8,875	81/8,762	96.4 (88.9 to 99.3)	Male	4/7,366	87/7,462	95.4 (87.4 to 98.3)	NR	NR	NR	Male	7/9,143	39/3,015	94.2% (87.2 to 97.4)
Female	5/8,536	81/8,749	93.7 (84.7 to 98.0)	Female	7/6,768	98/6,611	93.1 (85.2 to 96.8)	NR	NR	NR	Female	9/5,821	23/1,887	87.5% (73.4 to 94.2)
Race or ethnic group				Race or ethnic group										
White	7/14,504	146/14,670	95.2 (89.8 to 98.1)	White	10/9,023	144/8,916	93.2 (87.1 to 96.4)	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Black or African American	0/1,502	7/1,486	100.0 (31.2 to 100.0)					NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Hispanic or Latin	3/764	53/4,746	94.4 (82.7 to 98.9)	Communities of colour	1/5,088	41/5,132	97.5 (82.2 to 99.7)	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Non-Hispanic, non-Latin	5/12,548	109/12,661	95.4 (88.9 to 98.5)					NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
All others	1/1,405	9/1,355	89.3 (22.6 to 99.8)					NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

VE: vaccine efficacy; NR: Not reported; Yr: years old

Table 5. Number of participants reporting any event and serious adverse events

Adverse event	Polack, 2020 [24]		Baden, 2020 [25]		Voysey, 2021 [26] [27]		Logunov, 2021 [28]	
	BNT162b2 (n=21,621)	Placebo (n=21,631)	mRNA-1273 (n=15,185)	Placebo (n=15,166)	ChAdOx1 (n=12,282)	Placebo (n=11,962)	Gam-COVID-Vac rAd26-S/ rAd5-S (n=16,427)	Placebo (n=5,435)
Number of participants reporting any event	5,770 (26.7%)	2,638 (12.2%)	3,632 (23.9%)	3,277 (21.6%)	95/12,021 (0.8%)	126/11,724 (1.1%)		
	RR=2.19 (2.10 to 2.28)		RR=1.11 (1.06 to 1.15)		RR=0.74 (0.56 to 0.96)			
Related	4,484 (20.7%)	1,095 (5.1%)						
Severe	240 (1.1%)	139 (0.6%)						
Number of participants reporting any serious adverse events	126 (0.6%)	111 (0.5%)	153 (1.0%)	147 (1.0%)	108 (0.9%)	127 (1.1%)	45 (0.3%)	23 (0.4%)
Related	4 (0.0%)	0 (0.0%)						
Severe	71 (0.3)	68 (0.3)	234 (1.5)	202 (1.3)			0 (0.0%)	
	2/21,621	4/21,631	6/15,185	7/15,166	1/12,282	4/11,962	3/16,427	1/5,435
All-cause mortality	RR=0.50 (0.09 to 2.73)		RR=0.86 (0.29 to 2.55)		RR=0.49 (0.09 to 2.66)		RR=0.99 (0.10 to 9.54)	

RR: Risk ratios

Certainty of the evidence

For the efficacy outcome evaluated via symptomatic SARS-CoV-2 infection confirmed by a laboratory, the certainty of the evidence (using GRADE) was moderate due to serious indirectness (data from an interim analysis of the trial, with a short follow-up duration; estimates may change during longer follow-up; population included in RCTs may not represent all persons aged 16 years in BNT162b2; and 18 years in mRNA-1273, ChAdOx1-S, Gam-COVID-VacrAd26-S/rAd5-S). For the severe or critical disease due to COVID-19 in the RCTs regarding BNT162b2 and ChAdOx1 vaccines, the certainty of the evidence was very low, and moderate for mRNA-1273 and Gam-COVID-VacrAd26-S/rAd5-S vaccines. In the four RCTs, the certainty of the evidence for the outcomes of all-cause mortality and serious adverse events was very low due to serious indirectness and very serious imprecision based on the wide $CI_{95\%}$ for RR, which is consistent with substantial benefit or harm (see GRADE tables for more details in online supplement 4).

Discussion

Available data indicated that the vaccines evaluated in this systematic review effectively prevented symptomatic laboratory-confirmed COVID-19 (range 69.7-95%) (24-28), with moderate certainty of evidence. For severe cases of the disease, the four evaluated vaccines were between 90 and 100% effective with moderate to very low certainty of evidence. The subgroup analysis in each RCT revealed that the global efficacy of the vaccine was similar to the efficacy showed in different populations according to age, sex, comorbidities, and race/ethnicity (24-28).

The current concern related to asymptomatic infections is based on people who is able to continue transmitting the virus to others despite being vaccinated. Although asymptomatic infections are not a direct measure of disease transmission, researchers have viewed the information on this result as an indicator of how vaccines would help reducing the risk of the spread of SARS-CoV-2. The reports included in this review revealed information on this outcome from the ChAdOx1-S vaccine, which provided preliminary data on the prevention of asymptomatic SARS-CoV-2 infection. Showing an efficacy of 49.3% ($CI_{95\%}$ 7.4-72.2) in the group that received a half dose followed by a standard dose, compared to only 2% ($CI_{95\%}$ -50.7-36.2) in the group that received two standard doses (26,27). These results suggest that COVID-19 vaccines also reduce asymptomatic infection and potentially transmission.

The evidence shows that vaccination prevents a person from getting COVID-19 in its severe form and reduces the possibility of transmission to others (29). Substantial reductions in SARS-CoV-2 infections (symptomatic and asymptomatic) will help to reduce overall levels of disease and the transmission of the virus worldwide.

For adverse events and death, the analysed vaccines showed an adequate safety profile. However, the level of certainty of evidence was very low. Therefore, surveillance and follow-up of vaccinated cohorts is very important for the identification of possible adverse effects, especially rare events of death or disability.

Our review synthesized the evidence in a simple and methodical way to inform health providers and readers about the general efficacy and safety of four vaccines against COVID-19. These vaccines exhibited different degrees of effectiveness in the prevention of SARS-CoV-2 infection. However, all were very effective in preventing serious forms of illness and secondary death from COVID-19. The BNT162b2, mRNA-1273, ChAdOx1-S, and Gam-COVID-VacrAd26-S/rAd5-S vaccines showed high efficacy based on the minimum criteria established by the WHO to recommend a vaccine against COVID-19, which consisted of an estimate of 50% and with a clear demonstration of efficacy in the base population (30).

Global, national and regional regulatory procedures evaluating the suitability of new medical devices for public health emergencies, are responsible for performing a rigorous process to decide the administration of a vaccine with specified prioritisation for the earliest use (31). Other vaccines that were not the subject of this review have also received approval for emergency use by health regulatory agencies in different countries, such as CanSino, Sinopharm, Sinovac and Johnson & Johnson's vaccines (32-35). This information is encouraging due to the main challenge producing safe and effective vaccines in sufficient quantity for equitable distribution worldwide. More vaccines provide greater hope of ending the pandemic.

Strengths and limitations

Rapid review is a methodology that may be particularly important in the COVID-19 pandemic because the evidence is rapidly emerging and verified information is needed to make policy or practical decisions. However, there are some limitations to our study, which primarily relate to the performance of this review in a limited time frame. First, while a comprehensive search was performed in three databases, there was insufficient time to search other sources (grey literature) to ensure comprehensiveness. However, making these methodological trade-offs is consistent with the time-limited approach taken in other rapid review methodologies (36,37).

Second, this review included only 4 phase II/III and III clinical trials with preliminary published data because they involve ongoing research. We did not include other study designs that analysed real-life data, which provide more reliable and representative conclusions for the population. Third, there is no evidence of the long-term effectiveness and safety of the vaccine.

These trials had a short follow-up of up to 28 days after vaccination and unsolicited serious adverse events through 6 months after the second dose. It is necessary to highlight that the level of evidence of the outcomes evaluated in this review ranged between moderate and very low. This is primarily

because the analysis was performed per-protocol, as planned for the interim analysis, which generates uncertainty in the results because the estimates may change during longer follow-up. The results of an RCT acquire greater validity when the patients are analysed according to the group in which they were assigned, i.e., application of the intention-to-treat principle. This application makes it possible to maintain the advantages of randomization, avoiding overestimates of the effects of the therapy under study, and admitting the non-adherence of some patients, which is a situation that is closer to reality. Finally, we found no major limitations in study designs in relation to randomization sequence, blinding of investigators, personnel involved in the study, or significant losses to follow-up. However, the sample sizes of the intervention group (n=14,964) and the control group (n=4,902) (Table 3) in the RCT of the Gam-COVID-VacrAd26-S/rAd5-S vaccine were striking, but the distributions observed of the baseline characteristics between the study groups (28) were compatible with chance.

Implications for practice

Health care providers and professionals should communicate consistent, complete, and clear information on the benefits, risks, contraindications, safety issues, warnings and follow-up recommendations to persons receiving COVID-19 vaccines and their caregivers. It should be explained that there is limited evidence on how much COVID-19 vaccines reduce transmission in general population and for how long protection lasts. Also, prevention and biosecurity guidelines should be strictly followed. This includes the use of masks, hand washing, social distance greater than 2 meters, avoiding crowds and enclosed unventilated areas (38,39).

We should generate pharmacovigilance systems to identify and respond quickly to any adverse events in a recipient after vaccination, including vaccine administration errors, serious adverse events, multisystemic inflammatory syndrome cases, and COVID-19 cases resulting in hospitalization and death. It is recommended that any other clinically significant adverse event should be reported, even if its association with the administration of the vaccine is not clear.

Implications in research

It is necessary to keep track of the studies and reports that evaluate the beneficial and harmful effects of the different vaccines, which may be possible using living systematic reviews periodically informing the best practices in vaccine prevention and clinical research of this highly prevalent disease.

The results of this review support the level of evidence for the efficacy and safety of the COVID-19 vaccines that were analysed. The information presented in this manuscript has not been presented elsewhere.

Ethical approval and other permissions

Ethical approval for this study was not necessary because no patient data were collected.

References

1. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020;579:265-69.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>

2. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, *et al.* The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 2020;4:536-44. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
3. World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) pandemic, dashboard. Accessed: June 21, 2021. Available at: <https://covid19.who.int/>
4. Schuchat A. Human vaccines and their importance to public health. *Procedia in Vaccinology.* 2011;5:120-6. <https://doi.org/10.1016/j.provac.2011.10.008>
5. ClinicalTrials.gov. COVID, SARS-CoV-2, Vaccination. Accessed: June 21, 2021. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Covid19&term=vaccines&cntry=&state=&city=&di st=>
6. World Health Organization. Draft landscape and tracker of COVID-19 candidate vaccines. Accessed: June 21, 2021. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>
7. Haghpanah F, Lin G, Levin SA, Klein E. Analysis of the potential impact of durability, timing, and transmission blocking of COVID-19 vaccine on morbidity and mortality. *EClinicalMedicine.* 2021;35:1-13. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.100863>
8. Food and Drug Administration. Moderna COVID-19 Vaccine, Emergency Use Authorization (EUA) of the Moderna covid-19 vaccine to prevent coronavirus disease 2019 (COVID-19). Accessed: April 21, 2021. Available at: <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/coronavirus-disease-2019-covid-19/moderna-covid-19-vaccine>
9. Food and Drug Administration. Comirnaty and Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine. Accessed: April 21, 2021. Available at: <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/coronavirus-disease-2019-covid-19/comirnaty-and-pfizer-biontech-covid-19-vaccine>
10. AstraZeneca. AstraZeneca's COVID-19 vaccine authorised for emergency supply in the UK. Accessed: April 21, 2021. Available at: <https://www.astrazeneca.com/media-centre/press-releases/2020/astrazenecas-covid-19-vaccine-authorised-in-uk.html>
11. World Health Organization. Pfizer/BioNTech COMIRNATY®, COVID-19 vaccine. Accessed: April 22, 2021. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/comirnaty-covid-19-mrna-vaccine>
12. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, *et al.* The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ.* 2021;372:n71. <https://doi.org/10.1136/bmj.n71>
13. Higgins JPT, Altman DG, Gøtzsche PC, Jüni P, Moher D, Oxman AD, *et al.* The Cochrane Collaboration's tool for assessing risk of bias in randomised trials. *BMJ.* 2011;343:d5928. <https://doi.org/10.1136/bmj.d5928>
14. Santesso N, Glenton C, Dahm P, Garner P, Akl EA, Alper B, *et al.* GRADE guidelines 26: Informative statements to communicate the findings of systematic reviews of interventions. *J Clin Epidemiol.* 2020;119:126-35. <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2019.10.014>
15. Langan D, Higgins JPT, Simmonds M. Comparative performance of heterogeneity variance estimators in meta-analysis: A review of simulation studies. *Res Synth Methods.* 2017;2:181-98. <https://doi.org/10.1002/jrsm.1198>
16. Higgins JPT, Thompson SG. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. *Stat Med.* 2002;11:1539-58. <https://doi.org/10.1002/sim.1186>
17. Walsh EE, Frenck RW, Falsey AR, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, *et al.* Safety and immunogenicity of two RNA-based Covid-19 vaccine candidates. *N Engl J Med.* 2020;25:2439-50. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2027906>
18. Ewer KJ, Barrett JR, Belij-Rammerstorfer S, Sharpe H, Makinson R, Morter R, *et al.* T cell and antibody responses induced by a single dose of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) Vaccine in a phase 1/2 clinical trial. *Nat Med.* 2021;27:270-8. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-01194-5>
19. Mulligan MJ, Lyke KE, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, *et al.* Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults. *Nature.* 2020;7830:589-93. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2639-4>

20. Folegatti PM, Ewer KJ, Aley PK, Angus B, Becker S, Belij-Rammerstorfer S, *et al.* Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: A preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2020;10249:467-78. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31604-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31604-4)
21. Barrett JR, Belij-Rammerstorfer S, Dold C, Ewer KJ, Folegatti PM, Gilbride C, *et al.* Phase 1/2 trial of SARS-CoV-2 vaccine ChAdOx1 nCoV-19 with a booster dose induces multifunctional antibody responses. *Nat Med*. 2021;2:279-88. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-01179-4>
22. Ramasamy MN, Minassian AM, Ewer KJ, Flaxman AL, Folegatti PM, Owens DR, *et al.* Safety and immunogenicity of ChAdOx1 nCoV-19 vaccine administered in a prime-boost regimen in young and old adults (COV002): A single-blind, randomised, controlled, phase 2/3 trial. *Lancet*. 2021;10267:1979-93. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32466-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32466-1)
23. Keech C, Albert G, Cho I, Robertson A, Reed P, Neal S, *et al.* Phase 1-2 Trial of a SARS-CoV-2 recombinant spike protein nanoparticle vaccine. *N Engl J Med*. 2020;24:2320-32. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2026920>
24. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, *et al.* Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *N Engl J Med*. 2020;27:2603-15. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034577>
25. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, *et al.* Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N Engl J Med*. 2021;384:403-16. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2035389>
26. Voysey M, Clemens SAC, Madhi SA, Weckx LY, Folegatti PM, Aley PK, *et al.* Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: An interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *Lancet*. 2021;10269:99-111. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32661-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32661-1)
27. Voysey M, Costa-Clemens SA, Madhi SA, Weckx LY, Folegatti PM, Aley PK, *et al.* Single-dose administration and the influence of the timing of the booster dose on immunogenicity and efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine: A pooled analysis of four randomised trials. *Lancet*. 2021;10277:881-91. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00432-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00432-3)
28. Logunov DY, Dolzhikova I V, Shcheblyakov D V, Tukhvatulin AI, Zubkova OV, Dzharullaeva AS, *et al.* Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: An interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet*. 2021;10275:671-81. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00234-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00234-8)
29. Centers for Disease Control and Prevention. Science Brief: Background rationale and evidence for public health recommendations for fully vaccinated people. Accessed: April 22, 2021. Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/science/science-briefs/fully-vaccinated-people.html>
30. World Health Organization. Target product profiles for COVID-19 vaccines. Accessed: May 10, 2021. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/who-target-product-profiles-for-covid-19-vaccines>
31. World Health Organization. WHO issues its first emergency use validation for a COVID-19 vaccine and emphasizes need for equitable global access. Accessed: April 10, 2021. Available at: <https://www.who.int/news/item/31-12-2020-who-issues-its-first-emergency-use-validation-for-a-covid-19-vaccine-and-emphasizes-need-for-equitable-global-access>
32. Sinopharm. Chinese Covid-19 vaccine efficacy better than expected. Accessed: April 10, 2021. Available at: <https://www.precisionvaccinations.com/vaccines/sinopharm-covid-19-vaccine-bbip-covr>
33. Mallapaty S. China COVID vaccine reports mixed results — what does that mean for the pandemic? Accessed: April 10, 2021. Available at: <https://www.nature.com/articles/d41586-021-00094-z>
34. Centers for Disease Control and Prevention. Johnson & Johnson's Janssen COVID-19 vaccine overview and safety. Accessed: May 10, 2021. Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/vaccines/different-vaccines/janssen.html>
35. Food and Drug Administration. FDA issues emergency use authorization for third COVID-19 vaccine. Accessed: May 10, 2021. Available at: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-issues-emergency-use-authorization-third-covid-19-vaccine>

36. Grant MJ, Booth A. A typology of reviews: An analysis of 14 review types and associated methodologies. *Health Info Libr J.* 2009;2:91-108. <https://doi.org/10.1111/j.1471-1842.2009.00848.x>
37. Tricco AC, Antony J, Zarin W, Striffler L, Ghassemi M, Ivory J, *et al.* A scoping review of rapid review methods. *BMC Med.* 2015;13:224. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0465-6>
38. Alberta Health Services. COVID-19 Scientific Advisory Group evidence summary and recommendations. Accessed: May 10, 2021. Available at: <https://www.albertahealthservices.ca/assets/info/ppih/if-ppih-covid-19-sag-post-vaccine-transmission-rapid-review.pdf>
39. Centers for Disease Control and Prevention. CDC issues first set of guidelines on how fully vaccinated people can visit safely with others. Accessed: May 10, 2021. Available at: <https://www.cdc.gov/media/releases/2021/p0308-vaccinated-guidelines.html>

Original article

Preventive measures focused on the urban-rural interface protect rural food-producing communities from SARS-CoV-2

Gina Polo¹, Diego Soler-Tovar¹, Luis Carlos Villamil-Jiménez¹, Carlos Mera^{1,2}

¹ Grupo de Investigación en Epidemiología y Salud Pública, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de La Salle, Bogotá, D.C., Colombia

² Center for Natural and Human Sciences, Universidade Federal do ABC, Santo Andre, SP, Brazil

Introduction: Rural food-producing communities are fundamental for the development of economic activities associated with sustainability and food security. However, despite the importance of rurality in Colombia, preventive strategies continue to be implemented homogeneously, without considering the dynamics of SARS-CoV-2 in rural food-producing communities.

Objective: To model real areas in Colombia involving rural and urban populations that have intrinsic SARS-CoV-2 transmission dynamics. Characterize rural-urban interactions by means of a parameter that provides different scenarios and allows us to identify interactions capable of preventing SARS-CoV-2 transmission in rural food-producing communities.

Materials and methods: The dynamics of SARS-CoV-2 infection was modeled in five case studies (Boyacá, Caquetá, Cundinamarca, Santander and Sucre) considering urban and rural areas and their interaction (connectivity) in the urban-rural interface. For this purpose, an epidemiological compartmental model considering a classification of individuals according to their economic activity and their epidemiological status was assessed.

Results: Preventive measures focused on the urban-rural interface impact the number of deaths in rural areas. Hence, it is possible to assume that the dynamics of the disease in rural areas depend on the constant interaction with infected individuals from urban areas, which occurs due to the food production dynamics in the urban-rural interface.

Conclusions: Preventive measures should focus on places of high transmissibility and risk for rural communities, such as the urban-rural interface. This work highlights the importance of national heterogeneous preventive measures and the protection of rural communities from the social and economic impacts of SARS-CoV-2.

Key words: coronavirus infections/prevention and control; communicable disease control; rural population; Colombia

Medidas preventivas centradas en la interfaz urbano-rural protegen a las comunidades rurales productoras de alimentos del SARS-CoV-2

Introducción. Las comunidades rurales productoras de alimentos son fundamentales para el desarrollo de actividades económicas asociadas a la sostenibilidad y la seguridad alimentaria. Sin embargo, a pesar de la importancia de la ruralidad en Colombia, las estrategias de prevención continúan siendo implementadas homogéneamente, sin considerar la dinámica del SARS-CoV-2 en estas comunidades.

Objetivo. Modelar la dinámica del SARS-CoV-2 en poblaciones rurales colombianas. Se quiso caracterizar la interacción rural-urbana mediante un parámetro que proporciona diferentes contextos y permite identificar una interacción rural-urbana capaz de prevenir la transmisión del SARS-CoV-2 en comunidades rurales productoras de alimentos.

Materiales y métodos. La dinámica de transmisión del SARS-CoV-2 se modeló en cinco estudios de caso (Boyacá, Caquetá, Cundinamarca, Santander y Sucre) considerando áreas urbanas y rurales, así como su interacción (conectividad) en la interfaz urbano-rural. Para ello, se empleó un modelo epidemiológico compartimental que considera una clasificación de los individuos según su actividad económica y su estado epidemiológico.

Resultados. Las medidas preventivas enfocadas en la interfaz urbano-rural impactan el número de muertes en áreas rurales. Por lo tanto, es posible asumir que la dinámica de la enfermedad en las áreas rurales depende del contacto constante con los individuos infectados de las áreas urbanas, lo que ocurre debido a la dinámica de los sistemas de producción de alimentos en la interfaz urbano-rural.

Conclusiones. Las medidas de prevención deben enfocarse en lugares con gran transmisibilidad y riesgo para las comunidades rurales, como la interfaz urbano-rural. En este trabajo se destaca la importancia de las medidas preventivas heterogéneas y la protección de las comunidades rurales contra los impactos sociales y económicos del SARS-CoV-2.

Palabras clave: infección y prevención del coronavirus; control de enfermedades transmisibles; población rural; Colombia

Received: 27/09/2021

Accepted: 28/03/2022

Published: 08/04/2022

Citation:

Polo G, Soler-Tovar D, Villamil-Jiménez LC, Mera C. Preventive measures focused on the urban-rural interface protect rural food-producing communities from SARS-CoV-2. *Biomédica*. 2022;42(Supl.2):32-9. <https://doi.org/10.7705/biomedica.6313>

Corresponding author:

Gina Polo, Cra. 4A N° 59A-44, Bogotá, D.C., Colombia
Phone: +57 3013801081
gppoloi@unal.edu.co

Author contributions:

Gina Polo: Study design, computational simulations and manuscript writing
Diego Soler-Tovar: Study design, writing and review of the manuscript
Luis Carlos Villamil-Jiménez: Interpretation of results and review of the manuscript
Carlos Mera Acosta: Study design, computational simulations and manuscript writing

Funding:

This work was supported by the *Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación* - MinCiencias [MinCienciatón Project: 77464; Contract No. 362-2020. Project: "Modeling of public health interventions of the COVID-19 outbreak in Colombia: effectiveness and epidemiological and socioeconomic impact of decision-making and mitigation measures"]. The opinions expressed are those of the authors and not necessarily those of MinCiencias.

Conflicts of interest:

The authors have no conflict of interest.

In 2020, the World Health Organization (WHO) declared the severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 (SARS-CoV-2) outbreak, originally reported on December 31, 2019, in Wuhan of the Hubei province in China, as a public health emergency (1). Until today, the preventive measures against SARS-CoV-2 have focused globally in the homogeneous implementation of mitigation measures such as the interruption of non-essential services for prolonged periods, generating social and economic costs (2), or suppression measures such as social distancing that includes the restriction of mobility and the establishment of remote work. On March 17, 2020, the Colombian government issued Decree 417 of 2020, declaring the State of Economic, Social and Ecological Emergency throughout the national territory (3). However, differences (heterogeneities) between urban and rural areas were not considered and, therefore, the rural population had difficulties adapting to mobility restriction measures and implementing remote work, suffering negative economic consequences as a result (2).

Colombia is one of the Latin American countries with the largest rural population (4). According to the *Departamento Administrativo Nacional de Estadística* (DANE), the estimate of inhabitants in rural areas in the country is 22.9% of the total estimated population of 48,258,494 (5). Although Colombia, like most countries in the world, has undergone an important urbanization process, only 0.3% of the entire Colombian territory corresponds to urban areas (6) and 53% of the population is concentrated in rural territories or in the urban-rural interface (7). Although it has heterogeneous conditions, and despite the more than 130,000 deaths reported associated to the SARS-CoV-2 pandemic, and more than six million reported cases (8), preventive measures continue to be implemented homogeneously, without considering the virus dynamics in rural food-producing communities and in the urban-rural interface.

Based on the impossibility of implementing suppression (i.e., mobility restriction and remote work) or mitigation (i.e., interruption of activities) measures in rural food-producing communities, this work aims to model real areas in Colombia that have an intrinsic SARS-CoV-2 transmission dynamics in these populations. We characterize rural-urban interaction by means of different scenarios that allows us to identify interactions capable of preventing SARS-CoV-2 transmission in rural food-producing communities.

Materials and methods

Study area

Colombia has a population of approximately 50 million people, distributed in 32 administrative units called departments, with Bogotá, D.C., as the capital district. In this work, five departments were considered: Boyacá, Caquetá and Cundinamarca (dairy producer), Santander (poultry producer) and Sucre (fish producer) (table 1). In each department, the main urban center was considered, as well as the main neighboring rural municipalities associated with each production system (figure 1).

Data

The data were obtained from the public reports of mortality due to SARS-CoV-2 reported by the *Instituto Nacional de Salud* of Colombia (8) from March 16, 2020, to December 31, 2020 (8). As by date, a total of 42,909 deaths were reported, with Boyacá with 28,268 cases (232.20 per 100,000 inhabitants) and 609 deaths (lethality: 2.15%); 14,936 cases (371.68 per 100,000 inhabitants)

and 529 deaths (lethality: 3.54%) in Caquetá; 66,254 cases (226.9 per 100,000 inhabitants) and 1,684 deaths (lethality: 2.54%) in Cundinamarca; 66,566 cases (304.7 per 100,000 inhabitants) and 2,361 deaths (lethality: 3.55%) in Santander; and 17,438 cases (192.8 per 100 thousand inhabitants) and 677 deaths (fatality: 3.88%) in Sucre.

Model

To understand the dynamics of SARS-CoV-2 infection in selected rural food-producing communities, an epidemiological model was considered, classifying individuals according to their economic activity (rural - R: development of activities exclusively in the rural area), urban - U: development of activities exclusively in the urban area) or urban-rural - UR: development of activities in the urban-rural interface) and their epidemiological status (susceptible - S: at risk of developing the disease); exposed - E: infected but not infectious); infectious - I: capable of transmitting the disease; recovered - R: recovered from the disease; or deceased - F: death due to the disease (9).

According to this classification, susceptible individuals residing in rural areas could be exposed to SARS-CoV-2 infection by developing activities at the urban-rural interface through contact with infected individuals residing in urban areas. Likewise, these individuals residing in urban areas could be exposed to the infection through contact with other infected individuals who also reside in urban areas or when carrying out activities in the urban-rural interface. Due to the low contact rate reported in rural areas (2), the model does not consider transmission of SARS-CoV-2 among people residing in rural areas. As shown in table 2, this model can be described by twelve different transitions (reactions) from the ten different states and transitions (figure 2).

Table 1. Departments and municipalities considered as case studies.

Departament	Municipality	Population	Cases	Deaths	Departament	Municipality	Population	Cases	Deaths	
Boyacá	Tunja	179,263	8,473	110 (1.3%)	Cundinamarca	Zipaquirá	146,352	5,268	126 (2.4%)	
	Belén	7,532	63	2 (3.2%)		Cajicá	92,967	3,632	43 (1.2%)	
	Boyacá	5,118	26	0 (0.0%)		Cogua	24,434	680	31 (4.6%)	
	Chiquiza	5,484	34	3 (8.8%)		Guasca	16,934	113	2 (1.8%)	
	Chivatá	2,834	13	0 (0.0%)		La Calera	32,917	594	12 (2.0%)	
	Cómbita	13,280	465	5 (1.1%)		Nemocón	14,532	208	3 (1.4%)	
	Cucaita	3,787	32	1 (3.1%)		Pacho	25,803	296	9 (3.0%)	
	Duitama	126,670	4,769	89 (1.9%)		Sopó	28,999	630	16 (2.5%)	
	Motavita	5,703	65	4 (6.1%)		Subachoque	16,743	166	5 (3.0%)	
	Oicatá	2,890	28	0 (0.0%)		Tabio	24,206	489	8 (1.6%)	
	Paipa	34,679	855	16 (1.9%)		Tocancipá	45,714	1177	18 (1.5%)	
	Samacá	18,818	444	12 (2.7%)		Santander	Bucaramanga	607,428	28,680	998 (3.5%)
	Sora	3,077	16	1 (6.3%)			Charta	2,888	6	0 (0.0%)
	Soracá	6,068	49	3 (6.1%)			El Playón	14,038	110	11 (10.0%)
Sotaquirá	8,305	30	0 (0.0%)	Floridablanca	307,896		10,352	421 (4.1%)		
Ventaquemada	16,093	102	3 (2.9%)	Girón	171,904		5,206	184 (3.5%)		
				Lebrija	44,169		363	20 (5.5%)		
Caquetá	Florencia	173,011	9,481	330 (3.5%)	Los Santos	14,787	49	6 (12.2%)		
	Albania	4,396	194	4 (2.1%)	Matanza	5,035	31	1 (3.2%)		
	Belén de Andaquíes	11,181	200	4 (2.0%)	Rionegro	27,062	243	13 (5.3%)		
	El Doncello	19,284	368	15 (4.1%)	Sucre	Sincelejo	293,951	11,085	414 (3.7%)	
	El Paujil	18,464	261	10 (3.8%)		Corozal	70,853	1,109	54 (4.9%)	
	La Montañita	14,692	205	3 (1.5%)		Coveñas	19,516	506	6 (1.1%)	
	Milán	9,952	107	4 (3.7%)		Morrea	15,858	179	2 (1.3%)	
	Morelia	3,747	77	6 (7.8%)		Palmito	15,056	77	1 (5.8%)	
	Puerto Rico	26,282	496	15 (3.0%)		Sampués	48,819	468	27 (3.7%)	
	San Vicente del Caguán	52,593	999	42 (4.2%)	San Onofre	51,109	241	9 (1.5%)		
	Solita	3,815	49	1 (2.0%)	Tolú	34,117	329	14 (4.2%)		
	Valparaiso	7,048	75	4 (5.3%)	Toluviejo	22,289	173	11 (6.3%)		

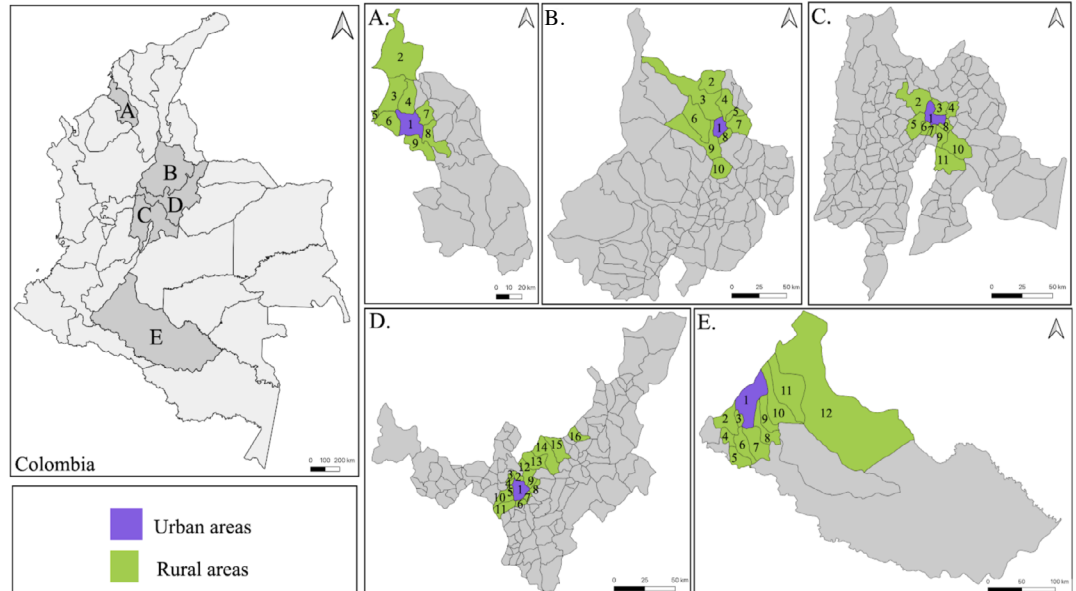


Figure 1. Study area: A) Sucre: 1-Sincelejo, 2-San Onofre, 3-Tolú, 4-Toluviejo, 5-Coveñas, 6-Palmito, 7-Morroa, 8-Corozal, 9-Sampués; B) Santander: 1-Bucaramanga, 2-Playón, 3-Rionegro, 4-Matanza, 5-Charta, 6-Lebrija, 7-Tona, 8-Floridablanca, 9- Girón, 10-Santos; C) Cundinamarca: 1-Zipaquirá, 2-Pacho, 3-Cogua, 4-Nemocón, 5-Subachoque, 6-Tabio, 7-Cajicá, 8-Tocancipá, 9-Sopó, 10-Guasca, 11-Calera; D) Boyacá: 1-Tunja, 2-Motavita, 3-Chiquiza, 4-Sora, 5-Cucaita, 6-Boyacá, 7-Soracá, 8-Chivatá, 9-Oicatá, 10-Samacá, 11-Ventaquemada, 12-Cómbita, 13-Sotaquirá, 14-Paipa, 15-Duitama, 16-Belén; E) Caquetá: 1-Florencia, 2-Belén, 3-Morelia, 4-Albania, 5-Solita, 6-Valparaíso, 7-Milán, 8-Montañita, 9-Paujil, 10-Doncello, 11-Puerto Rico, 12- San Vicente del Caguán.

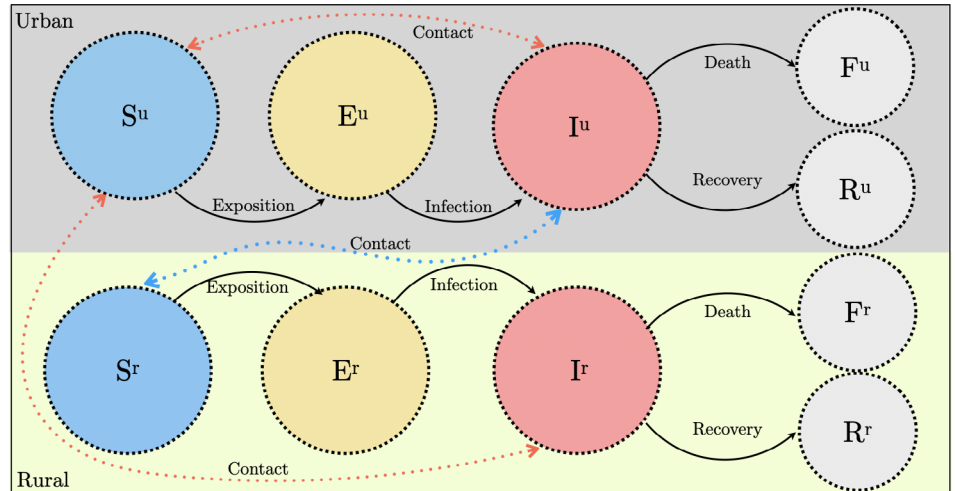
Table 2. Events, reactions, and parameters of the SEIRF epidemiological model

Event	Reaction	Parameter
Exposure of a susceptible individual living in an urban area by contact with infectious individuals in an urban area.	$S_u \rightarrow E_u$	ϵ^1
Exposure of a susceptible individual living in an urban area by contact with infectious individuals in the rural area at the urban-rural interface.	$S_u \rightarrow E_u$	ϵ^2
Exposure of a susceptible individual residing in a rural area by contact with infectious individuals in the urban area at the urban-rural interface.	$S_r \rightarrow E_r$	ϵ^3
Infection of an exposed individual living in an urban area.	$E_u \rightarrow I_u$	β^1
Infection of an exposed individual residing in a rural area.	$E_r \rightarrow I_r$	β^2
Recovery of an infectious individual living in an urban area.	$I_u \rightarrow R_u$	γ^1
Recovery of infectious individual residing in rural area.	$I_r \rightarrow R_r$	γ^2
Death of an infectious individual living in an urban area.	$I_u \rightarrow F_u$	δ^1
Death of an infectious individual residing in a rural area.	$I_r \rightarrow F_r$	δ^2

Model fitting and scenario simulations

The epidemiological model was fitted to the number of deaths reported by the INS through the adjustment of the model parameters using a maximum likelihood function (9-11). For this adjustment, the number of initial susceptible individuals in each urban or rural municipality was considered according to the population size reported by the DANE (5). In this work, we used the maximum likelihood optimizer through the function “mle2” of the package “bbmle” of the computational language R (Bolker, 2020) to estimate this method for the model parameter θ of each department.

In order to evaluate the impact of preventive measures focused on the urban-rural interface on rural areas, four scenarios associated with variations in the contact rate were considered (12,13) ($\epsilon = 70\%$, $\epsilon = 40\%$, $\epsilon = 20\%$, $\epsilon = 0\%$) between the individuals on this interface.



Su: Urban susceptibles; Sr: Rural susceptibles; Eu: Urban exposed; Er: Rural exposed; Iu: Urban infected; Ir: Rural infected; Fu: Urban deaths; Fr: Rural deaths; Ru: Recovered urban; Recovered rural

Figure 2. Epidemiological SEIRF model considered for the different case studies. The states correspond to the circles and the transitions between the states are represented by arrows

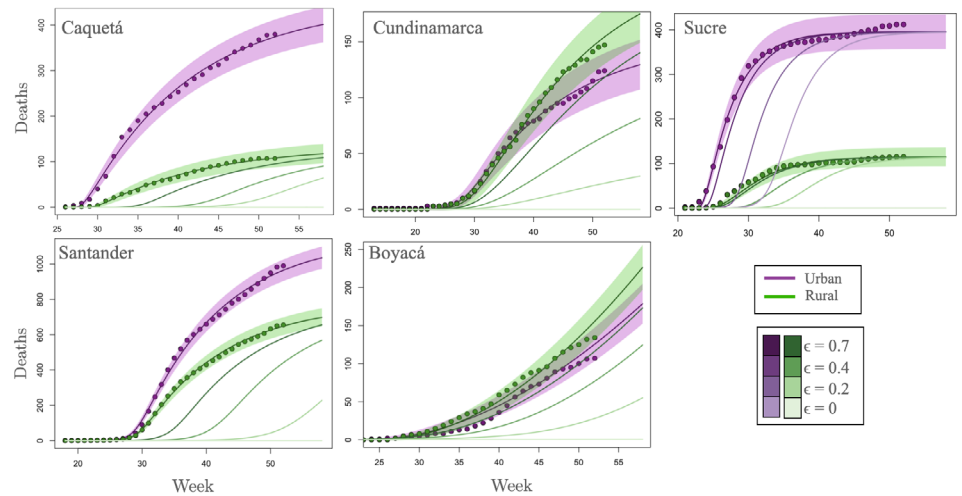


Figure 3. Model fitting to the number of deaths in each of the case study departments considering the selected municipalities of urban and rural areas.

Results

Figure 3 shows the adjustment of the model to accumulated deaths in urban and rural areas reported in each department. This fit demonstrates the ability of the model to reproduce and predict the epidemiological profile of SARS-CoV-2 infection in urban and rural human populations. The list of parameters obtained because of the maximum likelihood function for each department considered in the case studies are found in table supplementary 1 of the supplementary material.

Purple and green dots in figure 3 describe the cumulative number of deaths reported in urban and rural food-producing communities, respectively, while the lines indicate the fit of the model to the actual data. There is a clear difference in the epidemiological profile of the pandemic in the different municipalities. Specifically, the first epidemiological week, defined as the initial week in which the first infections were detected, it is different for each department, as can be observed in the x-axis of figure 3. Within the

departments of Sucre and Caquetá, a difference in the first epidemiological week can also be observed for urban and rural populations. However, in Cundinamarca and Boyacá, departments with a high interaction between urban and rural communities, deaths occur simultaneously in rural and urban populations.

There is also a marked difference between the curves describing the accumulated deaths in urban and rural areas in Caquetá, Sucre, and Santander. However, in the departments of Cundinamarca and Boyacá, there is a very similar accumulated number of deaths for rural and urban areas. This difference in the case study departments is mainly because the coefficient that simulates the interaction in the urban-rural interface is markedly higher in Cundinamarca and Boyacá (table supplementary 1).

The importance of the interaction in the urban-rural interface becomes explicit when we consider its variation throughout four scenarios, namely: $\epsilon = 70\%$, $\epsilon = 40\%$, $\epsilon = 20\%$, $\epsilon = 0\%$. The modulation of the parameter ϵ counts for the implementation of different preventive measures focused on the urban-rural interface. As observed in figure 3, the preventive measures focused on the urban-rural interface impact the number of deaths in rural areas of all the considered departments, so it can be assumed that the dynamics of the disease in rural areas depend on connectivity (contact rate) at the urban-rural interface. Additionally, as shown in the case of Sucre, preventive measures focused on the urban-rural interface can delay the epidemic peak in urban areas.

Discussion

Our findings confirm that information about human mobility and connectivity should be a starting point for modeling important dynamic processes in human and animal epidemiology, population ecology, biology, and evolution (14-17). The urban-rural interface is essential for the development of economic activities associated with sustainability and food security (18), so it is essential to establish strategic and differentiated preventive measures for these communities. Preventive measures focused on the urban-rural interface may include: mandatory and appropriate use of personal protection items such as face masks (12,19,20); implementation of transportation systems/ schedules to avoid crowds, including movement restrictions for all family members (20-23); trade products exclusively in open places that social distancing and low contact rates with implementation of sinks and cleaning items that allow constant handwashing (24,25). These recommendations focused on the urban-rural interface will potentially impact the dynamics of the infection, reducing the number of deaths in rural communities.

In the context of a global health emergency, the contributions of epidemiological models are essential to expand the knowledge regarding transmission dynamics, identify patterns and individuals with greater susceptibility, and propose strategic measures that minimize the inevitable adverse health, economic, and social effects (26,27). The findings of the proposed model warn that highly connected areas, such as the urban-rural interface, are vulnerable to infectious outbreaks and can hardly be adapted to the preventive measures proposed worldwide. Measures focused on reducing connectivity or guaranteeing safe interactions in the urban-rural interface can be an effective mitigation strategy to avoid the geographical spread of diseases to rural areas.

Considering the little importance given to the interaction between the rural population, the implementation of preventive measures focused on rural areas is not of fundamental significance in terms of reducing the transmission of SARS-CoV-2. Therefore, people associated exclusively with food production systems do not need to be subjected to the preventive measures implemented by the national government, such as mobility restrictions. Therefore, these areas are exposed to SARS-CoV-2 when trading their products and conducting activities at the urban-rural interface. Thus, in order to reduce exposure to the virus infection, and prevent its transmission to rural communities in Colombia, measures should focus on places with high transmissibility and risk for rural communities, such as the urban-rural interface.

Acknowledgments

The authors thank the *Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación* of Colombia for the MinCienciatón project and the Vice-rector for Research and Transfer of the University of La Salle. The authors also thank other members of the research team of this project for the discussions that enriched the development of this work: Martha Fabiola Rodríguez, Natalia Polanco, Sandra Durán, Laura Victoria Martín, Julián Felipe Porras, Nicolás Bobadilla, Carlos Meza Carvajalino, Marco Penagos and Juan Carlos Meza Martínez.

References

1. World Health Organization, WHO. Coronavirus disease (COVID-2019) situation reports 2020. Accessed: August 6, 2020. Available at: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>.
2. Britton T, Ball F, Trapman P. A mathematical model reveals the influence of population heterogeneity on herd immunity to SARS-CoV-2. *Science*. 2020;369:846-9. <https://doi.org/10.1126/science.abc6810>
3. Caicedo-Gómez, A. Principales medidas de gasto público en Colombia adoptadas en el estado de emergencia económica, social y ecológica implementado por el Decreto Legislativo 417 de 2020. *Revista Derecho Fiscal*. 2020;18:117-42. <https://doi.org/10.18601/16926722.n18.05>
4. White B. Rural youth, today and tomorrow. IFAD Research Series. 2020;48:1-29. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3567742>
5. Departamento Administrativo Nacional de Estadística. Proyecciones de Población. 2018. Accessed: August 6, 2020. Available at: <https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/demografia-y-poblacion/censo-nacional-de-poblacion-y-vivenda-2018>
6. Instituto Geográfico Agustín Codazzi. Tan solo el 0,3 por ciento de todo el territorio colombiano corresponde a áreas urbanas. Accessed: August 7, 2020. Available at: <https://igac.gov.co/es/noticias/tan-solo-el-03-por-ciento-de-todo-el-territorio-colombiano-corresponde-areas-urbanas-igac>
7. Centro Latinoamericano para el Desarrollo Rural. Informe de Gestión Oficina Colombia. 2018. Accessed: August 7, 2020. Available at: <https://www.rimisp.org>
8. Instituto Nacional de Salud. COVID-19 Colombia. Accessed: August 6, 2020. Available at: <https://www.ins.gov.co/Noticias/paginas/coronavirus.aspx>
9. Polo G, Soler-Tovar D, Villamil-Jiménez LC, Benavides- Ortiz E, Mera Acosta C. SARS-CoV-2 transmission dynamics in the urban-rural interface. *Public Health*. 2022;206:1-4. <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2022.02.007>
10. Bolker B. Maximum likelihood estimation and analysis with the bbmle package. Fecha de consulta: 10 de agosto de 2020. Disponible en: Accessed: August 6, 2020. Available at: <https://cran.r-project.org/web/packages/bbmle/vignettes/mle2.pdf>
11. Cauchemez S, Ferguson NM. Likelihood-based estimation of continuous-time epidemic models from time-series data: Application to measles transmission in London. *J R Soc Interface*. 2018;5:885-97. <https://doi.org/10.1098/rsif.2007.1292>

12. Eikenberry SE, Mancuso M, Iboi E, Phan T, Eikenberry K, Kuang Y, *et al.* To mask or not to mask: Modeling the potential for face mask use by the general public to curtail the COVID-19 pandemic. *Infect Dis Model.* 2020;5:293-308. <https://doi.org/10.1016/j.idm.2020.04.001>
13. Ferguson N, Laydon D, Nedjati-Gilani G, Imai N, Ainslie K, Baguelin M, *et al.* Report 9: Impact of non-pharmaceutical interventions (NPIs) to reduce COVID19 mortality and healthcare demand. London: Imperial College London COVID-19; 2020. p.1-20. <https://doi.org/10.25561/77482>
14. Belik V, Geisel T, Brockmann, D. Natural human mobility patterns and spatial spread of infectious diseases. *Physical Review X.* 2011;1:011001. <https://doi.org/10.1103/PhysRevX.1.011001>
15. Polo G, Mera Acosta C, Labruna MB, Ferreira F, Brockmann D. Hosts mobility and spatial spread of *Rickettsia rickettsii*. *PLoS Comput Biol.* 2018;14:e1006636. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006636>
16. Schlosser F, Maier BF, Jack O, Hinrichs D, Zachariae A, Brockmann D. COVID-19 lockdown induces disease-mitigating structural changes in mobility networks. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2020;117:32883-90. <https://doi.org/10.1073/pnas.2012326117>
17. Polo G, Labruna MB, Ferreira F. Basic reproduction number for the Brazilian Spotted Fever. *J Theor Biol.* 2018;458:119-24. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2018.09.011>
18. Lerner AM, Eakin H. An obsolete dichotomy? Rethinking the rural-urban interface in terms of food security and production in the global south. *The Geogr J.* 2011;177:311-20. <https://www.jstor.org/stable/41475774>
19. Ueki H, Furusawa Y, Iwatsuki-Horimoto K, Imai M, Kabata H, Nishimura H, *et al.* Effectiveness of face masks in preventing airborne transmission of SARS-CoV-2. *MSphere.* 2020;5:e00637-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00637-20>
20. Freedman DO, Wilder-Smith A. In-flight transmission of SARS-CoV-2: A review of the attack rates and available data on the efficacy of face masks. *J Travel Med.* 2020;27:taaa178. <https://doi.org/10.1093/jtm/taaa178>
21. Chu DK, Akl EA, Duda S, Solo K, Yaacoub S, Schünemann HJ, *et al.* Physical distancing, face masks, and eye protection to prevent person-to-person transmission of SARS-CoV-2 and COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2020;395:1973-87. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31142-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31142-9)
22. Luo K, Lei Z, Hai Z, Xiao S, Rui J, Yang H, *et al.* Transmission of SARS-CoV-2 in public transportation vehicles: A case study in Hunan province, China. *Open Forum Infect Dis.* 2020;7:ofaa430. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa430>
23. Di Carlo P, Chiacchiaretta P, Sinjari B, Aruffo E, Stuppia L, De Laurenzi V, *et al.* Air and surface measurements of SARS-CoV-2 inside a bus during normal operation. *PLoS ONE.* 2020;15:e0235943. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235943>
24. Ma QX, Shan H, Zhang HL, Li GM, Yang RM, Chen JM. Potential utilities of mask-wearing and instant hand hygiene for fighting SARS-CoV-2. *J Med Virol.* 2020;92:1567-71. <https://doi.org/10.1002/jmv.25805>
25. Doung-Ngern P, Suphanchaimat R, Panjangampatthana A, Janekrongtham C, Ruampoom D, Daochaeng N, *et al.* Case-control study of use of personal protective measures and risk for SARS-CoV 2 infection, Thailand. *Emerg Infect Dis.* 2020;26:2607. <https://doi.org/10.3201/eid2611.203003>
26. Araújo MB, Mestre F, Naimi B. Ecological and epidemiological models are both useful for SARS-CoV-2. *Nat Ecol Evol.* 2020;4:1153-4. <https://doi.org/10.1038/s41559-020-1246-y>
27. Polo G, Soler-Tovar D, Villamil-Jiménez LC, Benavides-Ortiz E, Mera Acosta. Bayesian spatio-temporal modeling of COVID-19: Inequalities on case-fatality risk. *Spat Spatiotemporal Epidemiol.* 2022. <https://doi.org/10.1016/j.sste.2022.100494>

Artículo original

Infeción natural por SARS-CoV-2 en gatos y perros domésticos de personas con diagnóstico de COVID-19 en el Valle de Aburrá, Antioquia

Azucena Cabrera^{1,2}, Dubán González-Álvarez³, Luz A. Gutiérrez⁴, Francisco J Díaz⁵, Diego Forero⁶, Juan David Rodas⁷

¹ Grupo de Investigación de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Administrativas y Agropecuarias, Unilasallista Corporación Universitaria, Caldas, Antioquia, Colombia

² Programa de Maestría en Epidemiología, Facultad de Ciencias de la Salud y del Deporte, Fundación Universitaria del Área Andina, Bogotá, D.C., Colombia

³ Grupo de Investigación en Ingeniería de Alimentos, Facultad de Ingeniería, Unilasallista Corporación Universitaria, Caldas, Antioquia, Colombia

⁴ Grupo de Investigación en Producción, Desarrollo y Transformación Agropecuaria, Facultad de Ciencias Administrativas y Agropecuarias, Unilasallista Corporación Universitaria, Caldas, Antioquia, Colombia

⁵ Grupo de Inmunovirología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Antioquia, Colombia

⁶ Programa Profesional en Terapia Respiratoria, Facultad de Ciencias de la Salud y del Deporte, Fundación Universitaria del Área Andina, Bogotá, D.C., Colombia

⁷ Grupo de Investigación en Ciencias Veterinarias, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Antioquia, Colombia

Recibido: 21/01/2022

Aceptado: 04/04/2022

Publicado: 20/04/2022

Citación:

Cabrera A, González-Álvarez D, Gutiérrez LA, Díaz FJ, Forero D, Rodas JD. Infeción natural por SARS-CoV-2 en gatos y perros domésticos de personas con diagnóstico de COVID-19 en el Valle de Aburrá, Antioquia. *Biomédica*. 2022;42(Supl.2):48-58. <https://doi.org/10.7705/biomedica.6407>

Correspondencia:

Azucena Cabrera, Programa de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Unilasallista Corporación Universitaria, Carrera 51 N° 118 Sur-57 Caldas, Antioquia, Colombia
Teléfono: (604) 320 1999; extensión 202
gcabrera@unilasallista.edu.co;
azucenacabrera@unilasallista@gmail.com

Contribución de los autores:

Azucena Cabrera: diseño del estudio, toma y procesamiento de muestras, análisis de los datos epidemiológicos, estadísticos y bioinformáticos
Dubán González: apoyo en el procesamiento de las técnicas moleculares en el laboratorio y escritura del manuscrito.

Luz A. Gutiérrez-Ramírez: dirección administrativa del proyecto y diseño experimental
Francisco J. Díaz: análisis de los datos bioinformáticos

Diego Forero y Juan David Rodas: apoyo en el diseño del estudio y análisis de los datos
Todos los autores participaron en la escritura del manuscrito.

Financiación:

El proyecto fue financiado por el Sistema General de Regalías, dentro de su incorporación al proyecto: "Fortalecimiento de capacidades instaladas de Ciencia y Tecnología, a través de una Red Regional de Laboratorios, para atender problemáticas asociadas con agentes biológicos de alto riesgo para la salud humana en el Departamento de Antioquia", liderado por la Universidad de Antioquia e identificado con el código: BPIN 2020000100131.

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener algún conflicto de intereses para la publicación de este artículo.

Introducción. El síndrome respiratorio agudo grave causado por el nuevo coronavirus SARS-CoV-2 es causa de la emergencia sanitaria por la pandemia de COVID-19. Si bien el humano es el principal huésped vulnerable, en estudios experimentales y reportes de infección natural, se han encontrado casos de zoonosis inversa de SARS-CoV-2 en animales.

Objetivo. Evaluar la infección natural por SARS-CoV-2 en gatos y perros de propietarios con diagnóstico de COVID-19 en el Valle de Aburrá, Antioquia, Colombia.

Materiales y métodos. La circulación del SARS-CoV-2 se evaluó por RT-qPCR y RT-PCR en muestras de frotis nasofaríngeos y orofaríngeos de gatos y perros cuyos propietarios se encontraban dentro del periodo de los 14 días de aislamiento. Los casos positivos se verificaron amplificando fragmentos de los genes *RdRp*, *N* y *E*; se secuenció el gen *RdRp* y se analizó filogenéticamente.

Resultados. De 80 animales evaluados, seis gatos y tres perros fueron casos confirmados de infección natural por SARS-CoV-2. Los animales no presentaron signos clínicos y sus propietarios, que padecían la infección, reportaron únicamente signos leves de la enfermedad sin complicaciones clínicas. En el análisis de una de las secuencias, se encontró un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) con un cambio en la posición 647, con sustitución del aminoácido serina (S) por una isoleucina (I). Los casos se presentaron en los municipios de Caldas, Medellín y Envigado.

Conclusiones. Se infiere que la infección natural en los gatos y perros se asocia al contacto directo con un paciente con COVID-19. No obstante, no es posible determinar la virulencia del virus en este huésped, ni su capacidad de transmisión zoonótica o entre especie.

Palabras clave: Infección por coronavirus; síndrome respiratorio agudo grave; zoonosis; transmisión zoonótica; análisis filogenético; huésped

Natural SARS-CoV-2 infection in domestic cats and dogs of humans diagnosed with COVID-19 in Valle de Aburrá, Antioquia

Introduction: The severe acute respiratory syndrome caused by the new coronavirus SARS-CoV-2 is the cause of the health emergency due to the COVID-19 pandemic. Although humans are the main susceptible host, experimental studies and reported cases of natural infection have evidenced scenarios of SARS-CoV-2 reverse zoonosis in animals.

Objective: To evaluate the natural infection of SARS-CoV-2 in cats and dogs with owners diagnosed with COVID-19 in the Valle de Aburrá subregion in Antioquia, Colombia.

Materials and methods. The circulation of SARS-CoV-2 was evaluated by RT-qPCR and RT-PCR in samples of nasopharyngeal and oropharyngeal smears from cats and dogs whose owners presented latent COVID-19 infection. Positive cases were verified through amplification of *N*, *E* and *RdRp* gene fragments; with the latter being sequenced and the phylogenetically analyzed

Results. From 80 tested animals, 6 cats and 3 dogs resulted positive for natural SARS-CoV-2 infection. These animals did not show any clinical signs; and their infected owners

only reported mild signs of COVID-19, without clinical complications. Regarding analysis of one of the sequences, a single nucleotide polymorphism (SNP) was found, with a substitution in position 647, resulting in the change of the amino acid serine (S) for isoleucine (I). The cases occurred in the municipalities of Caldas, Medellín and Envigado. **Conclusions.** It is inferred that natural infection in cats and dogs is associated with direct contact with a positive COVID-19 patient.

Keywords: Coronavirus infections; severe acute respiratory syndrome; zoonoses; zoonotic transmission; phylogenetic analysis; viral host.

Introducción

La emergencia pandémica por la enfermedad nombrada como COVID-19, causada por el nuevo coronavirus de tipo 2 del subgénero de los sarbecovirus, causante del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2), se desató como un nuevo escenario zoonótico evolutivo de los coronavirus de vida silvestre, que, por procesos antrópicos, se transmiten de sus reservorios naturales o huéspedes intermedios a los humanos (1).

En relación con el desarrollo de la pandemia, que fue declarada por la Organización Mundial de Salud (OMS) desde el 11 de marzo de 2020, las consecuencias en el sistema sanitario han sido considerables (2). Al 1° de marzo de 2022, se han registrado en el mundo alrededor de 302 millones de casos y se han contabilizado aproximadamente 6,5 millones de muertes, de acuerdo con los datos de *Our World in Data* del *Global Change Data Lab* (<https://ourworldindata.org/coronavirus>).

En Colombia, luego de presentarse el primer caso el 6 de marzo de 2020, el país superó los 6 millones de casos confirmados de COVID-19 a finales de marzo de 2022 (3). En el segundo semestre de 2021, se encontraba entre los primeros 10 países con una gran incidencia de la enfermedad, al igual que Estados Unidos, India, Brasil, Rusia, Francia, Reino Unido, Turquía y Argentina (4).

Esta emergencia sanitaria dejó en evidencia que la infección natural o accidental en los animales de compañía podrían tener consecuencias para la salud humana y animal (5). Se han reportado oficialmente casos positivos para el SARS-CoV-2 en gatos domésticos, grandes felinos, visones y perros, ante la Organización Mundial de Sanidad Animal, conocida también como Oficina Internacional de Epizootias (OIE) (6).

Bonilla-Aldana, *et al.*, sugieren que, a mayor incidencia en humanos, se aumenta la probabilidad de contagiar a los animales que se encuentran a su cuidado. Sin embargo, países con gran incidencia de casos de COVID-19, como India y Rusia, no han reportado oficialmente ningún caso hasta el momento de la escritura de este artículo (7). En Colombia, los reportes se limitan a un único caso clínico animal (perro), con sintomatología asociada, cuyo estudio filogenético determinó que se trataba de una infección por la variante de interés epidemiológico (VOI) Iota SARS-CoV-2 (Lineage B.1.526) (8). No obstante, se requiere vigilancia epidemiológica activa y continua de las mascotas de las personas con COVID, como se hace en otros países como China, Francia, España, Reino Unido, Estados Unidos y, a nivel latinoamericano, México, Brasil, Argentina, Chile y Uruguay (7).

Si bien por su virulencia el SARS-CoV-2 podría transmitirse mediante aerosoles como gotas en el aire, saliva o mordeduras, de animales de compañía como perros y gatos a humanos, y viceversa, (9), hasta la fecha no se ha demostrado capacidad zoonótica de los animales infectados por

SARS-CoV-2 al humano (6). Sucedió diferente con los visones que, en abril y junio del 2020, encendieron las alarmas sanitarias por los brotes presentados en varias de las granjas de los Países Bajos y en Dinamarca (10), con el agravante sanitario de tener gran virulencia y transmitirse desde y hacia las personas que estuvieron en contacto con los visones infectados; las autoridades sanitarias intervinieron inmediatamente, sacrificando todas las poblaciones de visones expuestas (10).

Ante la necesidad de involucrar la vigilancia epidemiológica veterinaria en la coyuntura de la pandemia, y, teniendo muy en cuenta el enfoque propuesto por la OMS: “Una salud”, en este estudio se buscó determinar la frecuencia de infección natural de SARS-CoV-2 en los animales de compañía (gatos y perros) de personas confirmadas como positivas para COVID-19; se consideran los “huéspedes accidentales” con mayor probabilidad de infectarse de forma natural y, consecuentemente, poder facilitar una zoonosis inversa que, al igual que en otros países y como se confirmó en otra región de Colombia, se puede estar presentando en el Valle de Aburrá, ubicado en el departamento de Antioquia.

Materiales y métodos

Este es un estudio de tipo transversal no probabilístico, en el cual la inclusión de pacientes se hizo por conveniencia, como una prueba piloto de detección diagnóstica de SARS-CoV-2 en perros y gatos en el Valle de Aburrá.

Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en las localidades rurales y urbanas de los municipios del Área Metropolitana del Valle de Aburrá, ubicado entre la latitud 6°03'18"N – 6°26'34"N y longitud 75°38'37"O – 75°19'38"O. La densidad poblacional en los municipios del estudio, de acuerdo con el censo nacional del 2018, es de 3'555.938 habitantes, distribuidos en 2'184.192 viviendas, con una media de 3,1 personas por hogar (11).

Criterios de inclusión y exclusión

El estudio vinculó por participación voluntaria a propietarios de animales de compañía –perros, gatos o ambos– que se encontraban dentro del periodo de 14 días de incubación de la COVID-19; estos casos se confirmaron como positivos por pruebas moleculares RT-qPCR o pruebas de antígeno, practicadas por un laboratorio avalado por el Instituto Nacional de Salud para diagnosticar el SARS-COV-2, de acuerdo con lo establecido en las directrices del Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia (12).

En los casos en que se requirió utilizar contención química, se excluyeron los animales que por anamnesis tuvieron historial de falla renal, hepática o ambas, o que presentaron signos de anemia en la valoración clínica general o eran hembras gestantes, para evitar contraindicaciones en las mascotas por efectos secundarios de los fármacos.

Reclutamiento de los casos y variables epidemiológicas

Se utilizó una pieza publicitaria que se difundió en las diferentes redes sociales. El primer filtro de las personas interesadas se hizo por medio de un sondeo telefónico y electrónico que evidenciara y asegurara los criterios de inclusión a la investigación. Posteriormente, se agendó un encuentro virtual utilizando la plataforma de uso abierto *Google Meet*, en el cual se

informó, diligenció y aceptó por medio digital el consentimiento informado. Se registraron datos demográficos, el cuadro clínico de la persona, los antecedentes médicos, la frecuencia del contacto con la mascota, y los datos del animal doméstico, como: raza, edad, sexo, signos clínicos aparentes en las últimas dos semanas, antecedentes de morbilidades, y plan de vacunación y desparasitación. Finalmente, se programaron el día y la hora para tomar la muestra de la mascota.

Toma de muestras y transporte

Para la atención de las mascotas y el muestreo, se empleó el equipamiento de protección personal, de acuerdo con las directrices del Ministerio de Salud y Protección Social (13). La mascota se evaluó por medio de un examen físico general, en el que se tomó la temperatura rectal y, luego de una correcta sujeción física, se obtuvo la muestra para los análisis moleculares. Esta se obtuvo mediante frotis nasofaríngeo y orofaríngeo, moviendo circularmente el escobillón por un tiempo entre 20 y 30 segundos por cavidad, y, de acuerdo con la metodología descrita por Shi, *et al.* (14),

Los dos hisopos de marca Nasal Swab-Goodwood Medical Care Ltd. (Ref. GW-1237NP China) utilizados por mascota, se almacenaron en un mismo medio de transporte viral (Instituto Colombiano de Medicina Tropical - CES, Sabaneta, Colombia) y se rotularon con el código asignado a cada animal. Posteriormente, se transportaron refrigerados y, en menos de 5 horas, se almacenaron a -80 ± 5 °C en el ultracongelador del Laboratorio de Diagnóstico Clínico Veterinario de la Unilasallista Corporación Universitaria, para su posterior análisis. La metodología de toma y conservación de las muestras siguió las directrices de la guía “*Considerations for sampling, testing, and reporting of SARS-CoV-2 in animals*” versión 7 de la Oficina Internacional de Epizootias (15).

En los casos de mascotas agresivas, con fobias, estrés o ansiedad que dificultaron la contención física, se aplicó, con el consentimiento del propietario, acepromazina a 10 mg/ml/kg, combinada con tramadol a 50 mg/mL por vía parenteral.

Análisis experimental y diagnóstico en el laboratorio

Extracción del material genético

Se utilizaron dos métodos: el primero fue el semiautomatizado *MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation* (Thermo Fisher Scientific Inc, Massachusetts, USA 2020©) en el equipo KingFisher Flex System™, utilizando bloques de calentamiento de 96 pozos, validado para el diagnóstico de SARS-CoV-2 (16). En el segundo método se utilizó el reactivo *vNAT Viral Nucleic Acid Buffer* marca Bio-Speedy® (Bioeksen R&D Technologies Incorporated Company, Sariyer, Estambul, Turquía), igualmente diseñado para el diagnóstico de COVID-19 (17). Es de resaltar que se siguieron las recomendaciones del fabricante en ambos métodos. Los productos de extracción se cuantificaron en el equipo NanoDrop™ One Spectrophotometers (Thermo Fisher Scientific Inc. Massachusetts, USA).

Controles internos de la PCR

Como control interno, para asegurar que las muestras efectivamente hayan recuperado ácidos nucleicos del animal, se amplificó por PCR en tiempo real un fragmento de gen constitutivo de β -actina de perro y gato, utilizando las

secuencias de los cebadores descritos en el cuadro 1. La reacción se amplificó con 10 µl de 2X fast- q-PCR SYBR® (Finnzymes, Espoo, Finlandia), con una concentración final de 400 nM de cada cebador y 6,4 µl de agua libre de nucleasas (Fisher BioReagents, USA); además, se agregaron 2 µl de ARN/ADN extraído con el reactivo *vNAT Viral Nucleic Acid Buffer*.

Las condiciones del termociclador se establecieron según la metodología descrita por Peleg, *et al.* (18) para amplificar la β-actina canina y, según lo descrito por Yamashita-Kawanishi, *et al.* (19), para las muestras de los gatos. Se calcularon la mediana del umbral de ciclos (*Cycle Threshold*, Ct) y la temperatura de fusión (Tm).

Todos los montajes de PCR incluyeron un control positivo (SARS-CoV-2 plásmido) incluido en el kit para la detección del virus. Para la RT-PCR de β-actina canina, se utilizó ADN de la cepa *E. canis* (NCBI: MT472834)). Tanto en las extracciones como en las PCR, siempre se incluyó agua libre de nucleasas como control negativo.

Detección molecular de SARS-CoV-2

Se empleó la técnica RT-qPCR como tamizaje de detección de carga viral, amplificando el gen *RdRp* del SARS-CoV-2 y siguiendo las instrucciones del fabricante del kit comercial *Logix Smart™ Coronavirus* (COVID-19) de la marca Co-Diagnostic Inc (Salt Lake City, USA), en el termociclador para PCR en tiempo real Rotor-Gene Q de la marca Qiagen © (Hilden, Alemania).

Las muestras positivas se sometieron a una segunda RT-qPCR, utilizando el kit comercial *1copy™ COVID-19 qPCR Triplex Kit* de la marca 1drop Inc (Gyeonggi-do, República de Corea) para amplificar los genes *N* y *E* de SARS-CoV-2. Para la amplificación de mínimo dos genes, las muestras confirmadas como positivas fueron procesadas por PCR anidada, utilizando los marcadores universales para la región *RdRp* de los coronavirus (cuadro 1). La primera amplificación de RT-PCR se llevó a cabo utilizando *Verso 1-Step qRT-PCR* (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU). Cada 25 µl de reacción contenían 0,25 µl de *verso Enzyme Mix*, 12,5 µl *2X 1-Step qPCR Mix*, 1,25 µl de *RT Enhancer*, 0,2 µM de cada cebador (pan-CoV outF y pan-CoV R), 2 µl de muestra y agua libre de nucleasas hasta completar el volumen de 25 µl. Las condiciones térmicas de la PCR se establecieron a 55 °C durante 30 minutos para la transcripción inversa; seguidos de una incubación a 95 °C durante 15 minutos. Posteriormente, 30 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 54 °C por 30 segundos y 68 °C por 60 segundos. Finalmente, una extensión de 68 °C durante cinco minutos.

Cuadro 1. Secuencias de los cebadores utilizados para la detección de SARS-CoV-2 en muestras de frotis nasofaríngeos y orofaríngeos de perros y gatos mediante RT-PCR

Especie	Gen	Nombre	Secuencia (5'-3')	Posición	Amplicón (pb)	Ref.
Cánidos	β- actina	Canine β actin-F	GCGCAAGTACTCTGTGTGGAT	1005-1025	88	(12)
		Canine β actin-R	GTCGTACTCCTGCTTGCTGAT	1072-1092		
Felinos	β- actina	β actin-F	CAACCGTGAGAAGATGACTCAGA	3--25	127	(13)
		β actin-R	CCCAGAGTCCATGACAATAACA	280-259		
β, α, δ-CoV	RdRp	pan-CoV_outF	CCAARTTYTAYGGHGGITGG	26374-26356	670-673	(24)
		pan-CoV_R	TGTTGIGARCARAAYTCATGIGG			
		pan-CoV_inF	GGTTGGGAYTAYCCHAARTGTGA AGCAGTACGCACACAATCG			

pb: pares de base nitrogenadas

La segunda PCR convencional se practicó en un volumen final de 50 μ l, utilizando 2 μ l de producto amplificado de la primera RT-PCR, 1U de *TopTaq DNA Polymerase* (Qiagen, Chatsworth, CA EE. UU), 1x *TopTaq PCR Buffer*, 1X *coralload*, 0,2 μ M de cada cebador (pan-CoV_inF y pan-CoV_R), 200 μ M de cada dNTP, y agua ultrapura para completar el volumen final de 50 μ l. La PCR se hizo utilizando un protocolo de ciclado de 94 °C durante tres minutos, y 35 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante un minuto y 72 °C durante 37 segundos, seguido de un ciclo de 72 °C durante 10 minutos. Los productos amplificados se separaron mediante electroforesis de gel de agarosa Tris Acetato-EDTA al 2 %, y se visualizaron mediante tinción con ADN *GelRed 20X* (Biotium®, Fremont, CA, USA). Las muestras que presentaron productos de PCR visibles correspondientes a 600 pares de bases (pb), se consideraron positivas para el *RdRp* de SARS-CoV-2.

Secuenciación y análisis filogenéticos

Los productos positivos de la RT-PCR fueron purificados y secuenciados en el Laboratorio de Secuenciación y Análisis Molecular (SSiGMol) del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia. Se purificaron utilizando *BigDye XTerminator Purification Kit* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) y se secuenciaron en el equipo ABI 3500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), con un capilar de 50 cm y mediante la técnica de electroforesis capilar.

Las secuencias nucleotídicas obtenidas se ensamblaron y editaron en los programas Chromas, versión 2.6.6 (Technelysium Pty Ltd) y Bioedit de licencia abierta (Nucleics, Hong Kong, China) (20). Las alineaciones se realizaron utilizando MUSCLE, y se ajustó el modelo Jukes y Cantor (1969) de sustitución de ADNc para calcular las puntuaciones BIC (criterio de información bayesiano) y los valores de máxima verosimilitud (*lnL*), utilizando el programa MEGA versión 11 (21).

Los valores de *bootstrap* se calcularon después de 1.000 repeticiones, y el análisis filogenético se hizo con los programas MEGA, versión 11, IQ Tree COVID-19 - versión 2.1.3. (22), y iTol, versión 6.3.2 (23). Se utilizaron las bases de datos de NCBI Genbank y GISAID para descargar las secuencias de referencia Human Wuhan-Hu-1 266-21555 (NC045512), las secuencias de cada linaje del virus reportadas en Antioquia, una secuencia de las primeras reportadas en Colombia, y las secuencias disponibles de SARS-CoV-2 reportadas en gatos o perros. Las dos secuencias encontradas en el estudio se ingresaron y se encuentran disponibles con los siguientes códigos de acceso: OK444145 y OK556702 en GenBank, y EPI_ISL_5155468 y EPI_ISL_5321779 en GISAID.

Interpretación de los casos

Según los criterios establecidos por la Oficina Internacional de Epizootias, los resultados se calificaron como: i) positivo confirmado, respecto de aquella muestra donde se amplificaron mínimo dos genes con o sin secuenciación, ii) caso no concluyente, cuando se amplificó un solo gen, y iii) negativo, para las muestras en las que no se amplificó ningún gen objetivo, (15).

Análisis estadístico

Se hizo el análisis descriptivo de las características de los participantes del estudio y sus mascotas, y se registraron las frecuencias y los porcentajes para las variables categóricas. La concordancia de los dos métodos de

extracción del material genético empleado para detectar el SARS-CoV-2, se analizó mediante el índice kappa con un nivel de significancia del 95 % y una p menor de 0,05. Asimismo, se estimaron las medianas del umbral de ciclos (Ct) para cada uno de los genes objetivos de la RT-qPCR. Finalmente, se procedió calculando la prevalencia puntual y la tasa de morbilidad. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa estadístico SPSS® v. 25, y JASP 0.14.1.0 (*software* gratuito).

Consideraciones éticas

El proyecto fue aprobado por el Comité de Bioética de Unilasallista Corporación Universitaria (radicado 31082020). Con firmas digitales de todos los propietarios de los animales, se obtuvo el consentimiento informado para obtener los datos de la encuesta y aceptar las políticas de confidencialidad, y, además, el consentimiento para el examen clínico y la toma de muestras de sus mascotas.

Resultados

Características epidemiológicas de los casos de COVID-19 y sus mascotas

Entre el segundo semestre de 2020 y el primer semestre del 2021, se recolectaron 80 muestras de casos de COVID-19. La mayoría de los participantes fueron mujeres menores de 29 años para el 50 % de las observaciones. Las técnicas moleculares de RT-qPCR representaron la mayor frecuencia (66,3 %) entre los diferentes métodos diagnósticos para confirmar el SARS-CoV-2.

De los 80 casos con diagnóstico de COVID-19, cinco (6,3 %) pacientes fueron hospitalizados e ingresaron en una unidad de cuidados intensivos, siete (8,8 %) cursaron la enfermedad sin síntomas aparentes, y 68 (84,9 %) exhibieron signos clínicos leves sin complicaciones y se aislaron en sus casas. En cerca del 50 % de los casos, no se reportaron enfermedades concomitantes asociadas; en el resto, se presentaron enfermedades crónicas cardiovasculares, respiratorias y metabólicas.

Las viviendas eran ocupadas por 3 (\pm 2) personas, en promedio, y la razón de infección en la vivienda fue, en promedio, de un infectado por cada persona en contacto con un positivo pero negativa para SARS-CoV-2 (1:1). En la mayoría de los casos, la persona infectada se aisló junto con su mascota. Las frecuencias epidemiológicas de estas variables se muestran en el cuadro 2.

De las 80 mascotas, 31 (38,8 %) fueron gatos y (61,2%) 49 perros. La edad fue de 4 (\pm 3) años en promedio, incluyéndose desde un cachorro de 6 meses hasta un geriátrico, de 17 años para el caso de los gatos y de 12 años para los perros.

En 56,3 % de las mascotas no se diagnosticaron comorbilidades, mientras que 11,3 % presentaron, enfermedades infecciosas gastrointestinales y trastornos digestivos en algún momento de su historia clínica. Por otra parte, en el 32,4 % restante se reportaron trastornos metabólicos o infecciones respiratorias. En el examen médico veterinario previo a la toma de la muestra, el 71,2 % no presentó signos clínicos aparentes, el 18,8 % tuvo episodios de tos y estornudos, el 7,5 % mostró signos gastroentéricos como diarrea y vómito, y el 2,5 %, secreciones conjuntivales (cuadro 3).

Cuadro 2. Características epidemiológicas de los participantes del estudio en el área metropolitana del Valle de Aburrá, Antioquia

Características	n (%)
Sexo	
Hombres	33 (41,2)
Mujeres	47 (58,8)
Edad en años de vida, median (IQR)	
Hombres	37 (IQR 20,2) [22-59]
Mujeres	29 (IQR 14,5) [21-81]
Nivel de educación, n (%)	
Posgrado	36 (45,0)
Título universitario	10 (12,5)
Formación técnica o tecnológica	27 (33,8)
Básica secundaria	7 (8,7)
Morbilidad asociada, n (%)	
Enfermedades asociadas al sistema respiratorio	13 (16,3)
Enfermedades asociadas al sistema cardiovascular	14 (17,5)
Trastornos metabólicos	7 (8,8)
Trastornos del sistema digestivo	6 (6,5)
Sin reporte de enfermedad	40 (50,9)
Gravedad de los cuadros clínicos n (%)	
Asintomático	7 (8,8)
Manejable en casa	68 (84,9)
Hospitalizado en UCI	5 (6,3)
Signos y síntomas del curso de la infección por SARS-CoV-2, n (%)	
Tos con ronquera	39 (48,8)
Xerostomía	42 (52,5)
Congestión nasal	39 (48,8)
Dolor orofaríngeo	45 (56,3)
Dolor o presión para respirar	72 (90,0)
Dificultad para respirar	10 (12,5)
Dolor de cabeza	27 (33,8)
Fiebre	35 (43,8)
Pérdida del gusto	34 (42,5)
Pérdida del olfato	34 (42,5)
Diarrea	37 (46,3)
Náusea	39 (48,8)
Vómitos	37 (46,3)
Prueba diagnóstica confirmatoria para COVID-19 y promedio de días entre el inicio de síntomas y el resultado de la prueba (dps)	
RT-qPCR	53 (66,3) / 4 dps (1-9)
Antígeno neutralizador	23 (28,7) / 4 dps (0-13)
Serológica	4 (5) / 7 dps
Vínculo epidemiológico de contacto con la mascota (n %)	
Contacto directo sin medidas de autoprotección	30 (37,5)
En aislamiento	50 (62,5)

IQR: rango intercuartílico; UCI: unidad de cuidados intensivos; dps: días después de presentar signos clínicos

Pruebas diagnósticas para confirmar la infección natural en mascotas

En todas las muestras de gatos y perros se amplificó el fragmento de β -actina como control interno, asegurándose la recuperación de material genético del animal, con una mediana de umbrales de ciclos de 30,45 (RIQ=1,8-24,5) y temperatura de fusión de 73,2 °C para muestras de gatos y de 82,2 °C para las de perros.

Cuatro muestras de gatos (Cat 010, Cat 014, Cat 017 y Cat 025) y dos de perros (Dog 042 y Dog 043) extraídas con la solución tampón *vNAT Viral Nucleic Acid Buffer*, amplificaron en el primer tamizaje por RT-qPCR para el gen *RdRp*. Además, el material extraído por el método *MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation*, además de amplificar las anteriores muestras, identificó otros tres gatos positivos (Cat 004, Cat 015 y Cat 019) y

otros ocho perros positivos (Dog 005, Dog 007, Dog 010, Dog 015, Dog 019, Dog 024, Dog 034 y Dog 040).

Las medidas simétricas presentaron una moderada concordancia entre los dos métodos ($p=0,000$; $IC_{95\%} \kappa=0,462$). Para confirmar los casos, las muestras positivas se analizaron con los cebadores (*primers*) de los genes *E* y *N*. De los siete resultados no concluyentes en gatos, seis se confirmaron con los genes *E* y *N*; y, de los 10 no concluyentes en perros, únicamente tres se confirmaron amplificando el gen *E* y, en dos de ellos, también se amplificó el gen *N* (cuadro 4).

Cuadro 3. Variables epidemiológicas predictivas para los casos del estudio de infección natural de SARS-CoV-2 en gatos y perros del Valle de Aburrá

Características	PC (n=9)	NC (n=8)	N (n=63)
Mascota (% respecto al total por tipo)			
Gatos (n 31)	6 (19,4)	1 (3,2)	24 (77,4)
Perros (n 49)	3 (6,12)	7 (14,3)	39 (79,6)
Sexo de la mascota			
Machos	6 (66,7)	4 (50,0)	26 (41,3)
Hembras	3 (33,3)	4 (50,0)	37 (58,7)
Promedio de edad en años de vida			
Mínimo	0,5	0,5	0,5
Máximo	7	17	12
Promedio \pm DE	3 \pm 0,5	5 \pm 2	4 \pm 0,5
Morbilidad asociada en la mascota			
Enfermedad respiratoria	0 (0,0)	2 (25,0)	5 (7,9)
Enfermedad infecciosa	1 (11,1)	0 (0,0)	8 (12,7)
Trastornos metabólicos	1 (11,1)	1 (12,5)	4 (6,3)
Trastornos del sistema digestivo	1 (11,1)	0 (0,0)	8 (12,7)
Sin antecedentes	6 (66,7)	5 (62,5)	34 (54,0)
Plan vacunal de la mascota			
Completas y vigentes	3 (33,3)	2 (25,0)	40 (63,5)
Incompletas	5 (55,6)	6 (75,0)	18 (28,6)
Sin vacunas	1 (11,1)	0 (0,0)	5 (7,9)
Estado de salud del animal al examen general			
Aparentemente saludable	5 (55,5)	1 (12,5)	24 (38,1)
Medianamente saludable	3 (33,3)	2 (25,0)	27 (42,9)
Aparentemente enfermo	1 (11,1)	5 (62,5)	12 (19,0)
Promedio de días poscontacto COVID-19			
Mínimo	8	5	1
Máximo	13	14	14
Promedio DE	10 \pm 2	11 \pm 1	6 \pm 3
Vínculo epidemiológico de contacto con la mascota			
Contacto directo	4 (44,4)	6 (75,0)	19 (30,2)
En aislamiento	5 (55,6)	2 (25%)	43 (68,3)
Gravedad del cuadro clínico del propietario			
Asintomático	1 (11,1)	2 (25,0)	4 (6,3)
Manejable en casa	8 (88,9)	6 (75,0)	53 (84,1)
Hospitalizado en UCI	0	0	5 (7,9)
Sexo del propietario			
Mujer	5 (55,6)	3 (37,5)	39 (61,9)
Hombre	4 (44,4)	5 (62,5)	23 (36,5)
Pico de la pandemia en Colombia			
Primer pico	4 (44,4)	3 (37,5)	31 (49,0)
Segundo pico	4 (44,4)	2 (25,0)	15 (23,8)
Tercer pico	1 (11,2)	3 (37,5)	17 (27,0)

PC: positivo confirmado; NC: no concluyente (sospechoso); N: negativo; DE: desviación estándar; UCI: unidad de cuidados intensivos

Cuadro 4. Amplificación de los genes RdRp, N y E mediante RT-qPCR, para los casos confirmados y no concluyentes de SARS-CoV-2 en los gatos y perros incluidos en el estudio

Código de animal	Concordancia entre dos métodos de extracción para la detección de SARS-CoV-2				Confirmación de los positivos a otros genes de SARS-CoV-2				Definición de Caso
	Logix Smart™				1copy™ COVID-19				
	vNAT*		MagMAX*		Gen N		Gen E		
	RdRp	Ct	RdRp	Ct	Gen N	Ct	Gen E	Ct	
	Índice Kappa 0,462				Valor p 0,000				
Cat 004	-	-	+	35,21	+	36,51	+	37,85	PC
Cat 010	+	34,29	+	23,38	+	26,3	+	28,51	PC
Cat 014	+	30,23	+	25,19	+	25,5	+	28,65	PC
Cat 015	-	-	+	31,54	+	32,37	+	34,58	PC
Cat 017	+	34,69	+	22,89	+	24,02	+	26,96	PC
Cat 019	-	-	+	32,65	+	33,95	+	36,21	PC
Cat 025	+	35,45	+	35,13	-	-	-	-	NC
Dog 005	-	-	+	34,85	+	36,56	+	38,32	PC
Dog 007	-	-	+	34,84	-	-	-	-	NC
Dog 010	-	-	+	36,25	-	-	-	-	NC
Dog 015	-	-	+	35,62	-	-	-	-	NC
Dog 019	-	-	+	31,97	+	34,18	+	35,56	PC
Dog 024	-	-	+	36,02	-	-	-	-	NC
Dog 034	-	-	+	35,0	-	-	-	-	NC
Dog 040	-	-	+	31,04	-	-	+	35,56	PC
Dog 042	+	36,01	+	33,88	-	-	-	-	NC
Dog 043	+	35,43	+	29,67	-	-	-	-	NC

Ct: umbral de ciclos de amplificación; PC: positivo confirmado que amplificó para mínimo dos genes objetivos; NC: no concluyente (sospechoso), amplificó únicamente para un gen objetivo.

El promedio del umbral de ciclos fue de $32,16 \pm 4,4$ para el gen *RdRp*, de $31,17 \pm 5,1$ para el *N* y de $33,57 \pm 4,3$ para el *E* (figura 1). En cuanto a la RT-PCR anidada para el gen *RdRp*, de entre las anteriores muestras que amplificaron para mínimo dos genes, las muestras Cat 010, Cat 014, Cat 015, y Cat 017 generaron una banda entre 600 y 700 pb. La muestra Cat 019 generó una banda de aproximadamente 100 pb. Ninguna de las tres muestras de perros positivos confirmados PC amplificaron mediante esta prueba.

Secuenciación y análisis filogenético

Dos de los seis productos positivos de gatos lograron secuenciarse. Al ingresarlas en el programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), las secuencias virales del *RdRp* de las muestras Cat 010 (OK444145 - EPI_ISL_5155468) y Cat 017 (OK556702 - EPI_ISL_5321779), presentaron identidad genética, del 100 % (190/190) con respecto a la secuencia de referencia Wuhan-WIV04 (EPI_ISL_402124), y del 99 % (175-176) respectivamente para las secuencias Cat 010 y Cat 017. En la secuencia CAT 017, se encontró un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) con un cambio en la posición 647, con sustitución del aminoácido serina (S) por isoleucina (I), o sea, la mutación NSP12 S647I.

De las 53 secuencias genéticamente idénticas según mutaciones no sinónimas que incluye el árbol filogenético, 41 se recuperaron de los linajes de SARS-CoV-2 reportados en Antioquia hasta el 20 de octubre de 2021. La secuencia consenso de Cat 017 mantuvo una identidad genética del 99 % a tres secuencias virales de humano: EPI_ISL_1629756, EPI_ISL_4666420 y EPI_ISL_739668, de los linajes B.1.398, B.1.36.19 y B.1.575.1, respectivamente, y todas pertenecientes al clado GH de SARS-CoV-2 (figura 2). Las secuencias humanas corresponden a pacientes del mismo municipio donde se encontraron los gatos positivos.

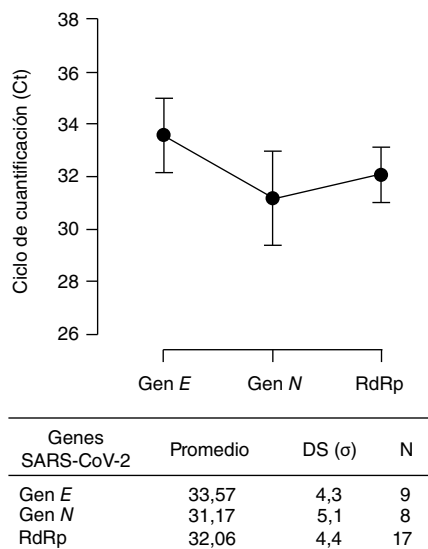


Figura 1. Distribución de los ciclos de cuantificación para los genes objetivos de SARS-CoV-2 en las muestras de gatos y perros

La primera secuencia humana fue recolectada el 17 de diciembre de 2020 en el Hospital Universitario San Vicente Fundación, de una mujer de 19 años; la segunda data del 21 de octubre de 2020, adquirida de un joven de 21 años y registrada por el Laboratorio Departamental de Salud Pública de Antioquia, y la tercera se obtuvo el 22 de octubre de 2020 de una mujer de 61 años en el Instituto Nacional de Salud. Al ensamblar las secuencias de aminoácidos en Jalview 2.11.1.4, la misma posición de SNP S6471 se presentó en las mismas tres secuencias de mayor identidad (figura 3).

Descripción epidemiológica de los casos confirmados en animales

De los casos confirmados, el 66,7 % fueron animales machos y el 33,3 % hembras. La edad promedio fue de tres años de vida.

Respecto a enfermedades preexistentes, en un caso, el propietario reportó que su gato presentó peritonitis infecciosa felina un año atrás; en un perro de raza *American bully* se reportó hipotiroidismo y, en un pastor alemán, síndrome de mala absorción. Sin embargo, en el examen clínico general, el 55,5 % de los casos presentó un estado general aparentemente saludable, excepto un gato y un perro que presentaron vómito y diarrea en los cinco días anteriores a la toma de la muestra.

Cuatro de los 9 casos estuvieron en contacto directo con sus dueños positivos para COVID-19, de los cuales uno fue asintomático y los otros humanos presentaron signos leves de la enfermedad, al igual que los que cumplieron con el aislamiento. Cuatro casos de los animales positivos se presentaron al finalizar el primer pico de la pandemia en el país (octubre 2020), otros cuatro, a finales de diciembre de 2020 y enero 2021 (segundo pico), y uno, a mediados de abril (tercer pico) (cuadro 4).

Discusión

Según los criterios establecidos por la Oficina Internacional de Epizootias, en este estudio se reportan los primeros hallazgos confirmatorios de infección por SARS-CoV-2 en seis gatos y tres perros, en el área Metropolitana del

Valle de Aburrá (Colombia). Esto corresponde a una frecuencia de 11,2 % entre las mascotas expuestas a una persona positiva para COVID-19; dos de cada 10 gatos y tres de cada 50 perros, expuestos ambos, podrían infectarse bajo las condiciones epidemiológicas de transmisión del virus.

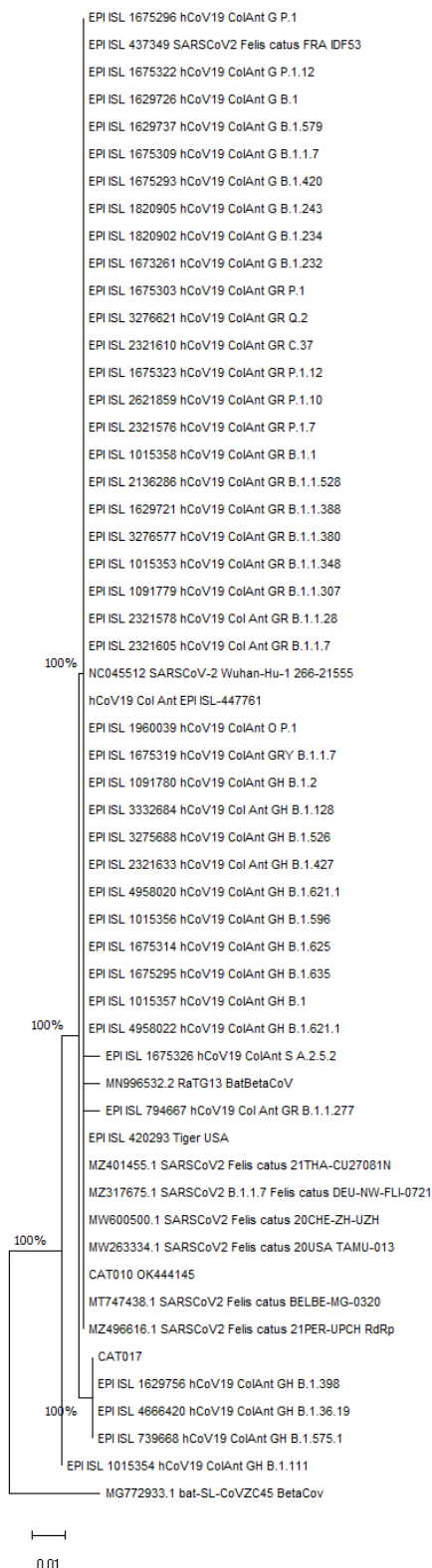


Figura 2. Árbol filogenético inferido utilizando las 54 secuencias previamente recuperadas en el GenBank y GISAD, mediante el método de máxima verosimilitud. Se muestra el árbol con la mayor probabilidad logarítmica (-1.141,39). Este análisis involucró 58 secuencias de aminoácidos. Hubo un total de 197 posiciones en el conjunto final de datos. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos Neighbour-Join y BioNJ a una matriz de distancias por pares, estimadas utilizando el modelo JTT, y luego seleccionando la topología con un valor de probabilidad logarítmico superior.

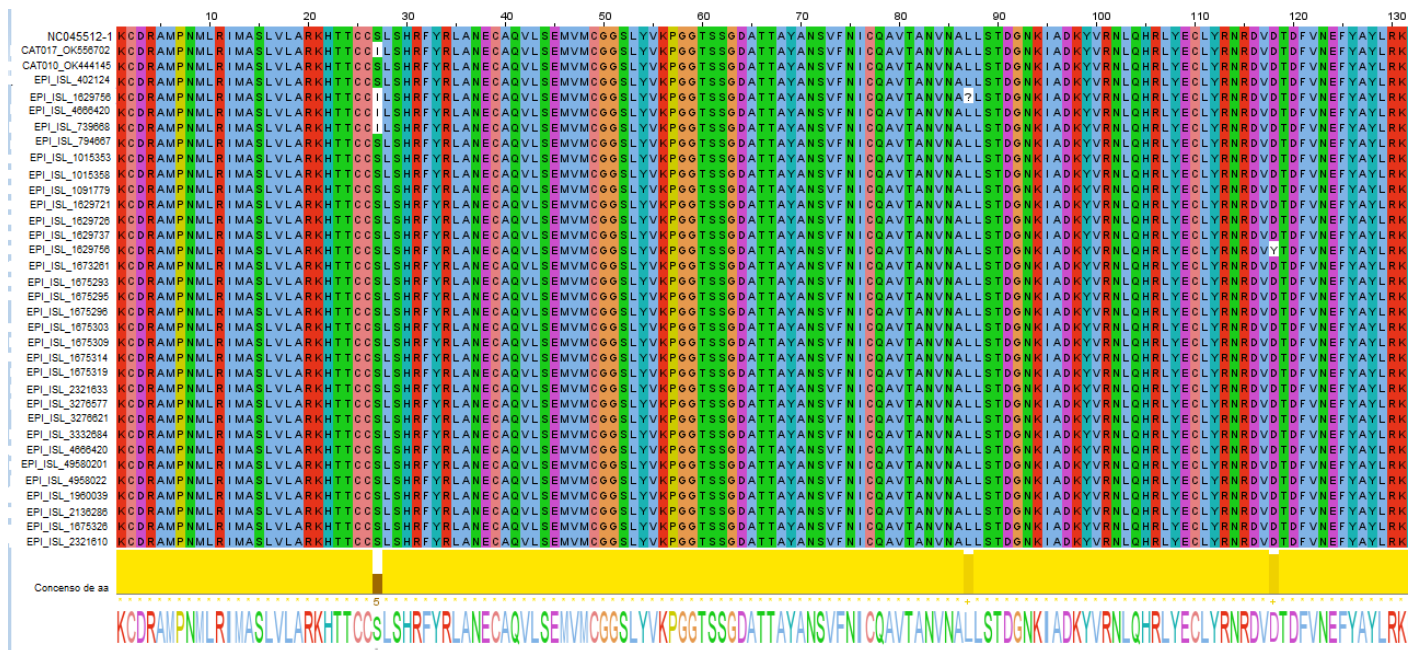


Figura 3. Alineamiento de residuos visualizada con Jalview (<http://www.jalview.org/>) que muestra la secuencia referencia de SARS-CoV-2 (NC045512), algunos de los linajes reportados en Antioquia (EPI tomados de la base de datos EpiFlu™ de GISAID) y las secuencias de los gatos del estudio. Los aminoácidos en la posición 27, resaltados en blanco con el esquema de coloración de Clustalx, muestran los cambios de serina (S) por isoleucina (I); siendo la posición donde el aminoácido se conserva mínimamente.

Estos resultados concuerdan con las frecuencias recopiladas por Bonilla-Aldana, *et al.*, quienes sugieren que la infección se puede presentar en alrededor de un animal por cada 8 con sospecha diagnóstica por la RT-qPCR (7); también concuerdan con lo encontrado por Muñoz, *et al.*, en la recopilación de secuencias genéticas de animales y abióticas, estudio en el cual las cepas virales se propagaron ampliamente en los animales domésticos *Felis catus* y *Canis lupus familiaris* (24). Sin embargo, la frecuencia de infección en los gatos del estudio (19,4 %) fue 11 veces mayor comparada con la frecuencia acumulada de infección reportada por Bonilla-Aldana, *et al.*, que fue de 7,4 % (7).

No obstante, al igual que en los reportes recientes de infección natural en gatos en Rio de Janeiro (Brasil) (40 %) (25) y en Buenos Aires, Argentina (5,6 %) (26), la frecuencia de infección fue mayor que las presentadas en perros (9 % y 0 %, respectivamente).

La mayor frecuencia de infección en los gatos podría explicarse por las secuencias de los receptores de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) de la célula del huésped, que únicamente se diferencian en tres residuos entre los felinos y el humano; además, como estos receptores no solo se encuentran en el pulmón y el intestino delgado, sino también, en los tejidos de la piel, las orejas y la retina, facilitarían una ruta de infección directa con las partículas virales expulsadas por las personas (27). La adaptabilidad del virus a estos huéspedes accidentales es mediada por la variabilidad genómica de la subunidad S1 y uno de sus dominios de unión al receptor (RBD) de la glucoproteína S, que le otorga propiedades estructurales y bioquímicas adaptativas a los receptores ACE2 de humanos y otras especies animales, incluidas las mascotas de compañía, perros y gatos (28-30).

Estos casos de infección natural en las mascotas, como han documentado varios autores, se dan por la relación estrecha entre los humanos y sus animales de compañía, la cual aumenta las probabilidades de transmisión (29,31,32). Se estima que, en 2020, en los diez municipios del Área Metropolitana del Valle de Aburrá, la población de gatos era de 310.051 y la de perros era de 740.739 (33); además, aproximadamente el 70 % de los hogares colombianos tiene, al menos, una mascota (11).

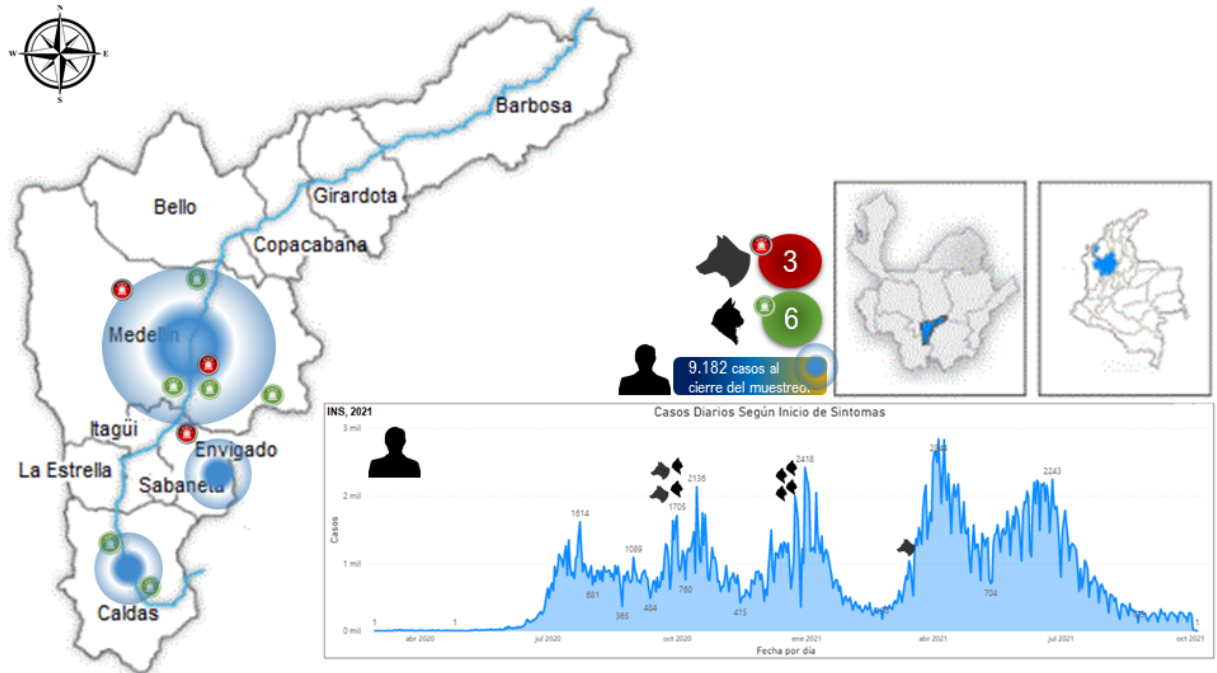
Estas interacciones cercanas entre humanos y animales son propicias para la transmisión zoonótica bidireccional y, como se encontró en este estudio, 4 de los 9 casos tenían estrechos vínculos epidemiológicos con propietarios positivos para COVID-19. Los cinco casos restantes, en los que las mascotas mantuvieron el aislamiento con su propietario positivo, el contagio se pudo haber presentado en los primeros días de infección del humano, al ingerir el virus lamiendo una superficie o su propio pelaje contaminado por partículas emitidas al toser, estornudar, hablar o respirar (34), de la misma manera en que se han presentado contagios entre humanos de un mismo hogar (35).

Al momento de publicar este artículo, se desconoce si los gatos y perros infectados con el SARS-CoV-2 podrían transmitir el virus de forma natural a otros animales o de regreso a los humanos; sin embargo, algunos autores lo consideran improbable por las bajas cargas virales que llegan a presentar (7,26,36,37). Particularmente en el caso de los gatos, en estudios experimentales sobre la infección natural, se encontró que, a pesar de presentar mayor riesgo de infección en espacios ventilados y con renovación del aire, no logran transmitir el virus (38).

La incidencia de la COVID-19 en humanos y los casos confirmados en las mascotas, correspondieron a las muestras tomadas en las fechas del primer y del segundo pico de la pandemia en Colombia (figura 4), alcanzando en el primer pico los 1.705 nuevos contagios reportados por día en Medellín, Envigado y Caldas, y pasando a 2.418 en el segundo pico (39); esto podría tener relación con la presentación de infección en las mascotas, como lo sugieren Bonilla, *et al.* (7). No obstante, gracias al avance mundial de la vacunación contra la COVID-19 y la disminución de la incidencia de nuevos casos positivos, probablemente, el riesgo de infección accidental en los animales de compañía igualmente sea menor.

Los casos confirmados en este estudio se detectaron entre 8 y 13 días después de iniciarse los síntomas en la persona positiva para COVID-19, lo cual concuerda con el periodo de incubación y virulencia del SARS-CoV-2 en humanos (5,2 días; IC_{95%} 4,1 a 7,0 días) (34), y con la sensibilidad de las pruebas moleculares diagnósticas, como la RT-qPCR (40).

No obstante, los métodos diagnósticos tienen limitaciones específicas, y se han notificado varios casos de falsos positivos y de falsos negativos (41), especialmente, durante las primeras etapas de la infección o con pequeñas cargas infecciosas (42), como se pudo inferir con el promedio del umbral de ciclos de las muestras positivas en este estudio. Por otro lado, si bien el índice de concordancia fue moderado (generalmente considerado como indulgente para lo exigido en los estudios de salud) (43), ello puede deberse a interferencias propias de la técnica que deben ser constatados mediante estudios de validación y verificación diagnóstica.



Tomado de: <https://www.ins.gov.co/Noticias/Paginas/coronavirus-filtro.aspx>

Figura 4. Distribución de los casos de infección natural de SARS-CoV-2 en perros y gatos de personas con diagnóstico de COVID-19 en los municipios del área metropolitana del Valle de Aburrá, en un estudio transversal realizado en el segundo semestre de 2020 y el primer semestre de 2021. Datos de contagio de COVID 19

Aunque otros autores han reportado que más del 41 % de los animales pueden llegar a presentar manifestaciones clínicas indicativas de compromiso respiratorio y gastroentérico (7,43), en el presente estudio, los signos presentados por dos de los animales infectados no son concluyentes y no se pueden asociar con la infección; sin embargo, en otros estudios se han reportado episodios ocasionales de diarrea al segundo día de la infección en gatos (38). No obstante, la ausencia de signos o síntomas en la mayoría de las mascotas infectadas, podría explicarse si estos tienen la facultad de ser huéspedes intermedios silenciosos de SARS-CoV-2 (26), lo cual podría considerarse un riesgo sanitario de comprobarse su capacidad de transmisión a otros animales o al humano (32).

Si bien el pelaje de la mascota podría ser un vector pasivo (fómite), por adhesión de partículas virales expulsadas por una persona infectada en estornudos o saliva, aún no se ha reportado este tipo de transmisión. No obstante, la infección natural de SARS-CoV-2 en un nuevo huésped podría ocasionar cambios nucleotídicos de adaptabilidad evolutiva (44) que produzca posibles impactos negativos emergentes del virus (45), por lo cual es importante incluir estas secuencias encontradas en animales, dentro de la Red Regional de Vigilancia Genómica de COVID-19 para vigilar o predecir posibles variantes de interés (VOI) o variantes de preocupación (VOC) que llegasen a evolucionar en estos nuevos huéspedes a medida que aumenta su prevalencia (43,46)

La mutación NSP12 S647I se ha reportado en secuencias de humanos en 80 países (47), incluido Colombia y particularmente Antioquia. Esta mutación, al estar extendida en la población humana, probablemente sea una adaptación evolutiva del virus en humanos y no una adaptación específica del virus en las células del gato, como se reportó con la mutación P323L

presente en una secuencia de un gato infectado naturalmente en el Reino Unido (48). Además, esta mutación puede corresponder a una sustitución natural evolutiva, ya que la tasa de cambio de nucleótidos estimada para el SARS-CoV-2 varía entre 10^{-3} y 10^{-4} sustituciones por sitio y por año (46).

Es necesario realizar estudios en otras regiones del genoma como la región codificante de la proteína S, en la cual, por ejemplo, la mutación D614G (compartida por los genomas felinos) confiere adaptabilidad en humanos y, por consiguiente, favorece la capacidad infecciosa del virus (49). A pesar de esto, hasta el presente, no se ha estudiado si esta mutación u otras pueden causar adaptabilidad o patogenicidad en los animales.

Los resultados del presente estudio, al ser no probabilístico, deben interpretarse con prudencia. No obstante, en la escala de evidencia, los estudios experimentales de Shi, *et al.* (14), y Schlottau, *et al.* (50), confirman la vulnerabilidad de los gatos y perros a la infección por SARS-CoV-2, y las circunstancias epidemiológicas similares a los casos de transmisión natural reportadas en otros países (7). Esto hace que este estudio, para esta región del país, sirva para fortalecer los estudios epidemiológicos en Colombia y se continúe impulsando los estudios genómicos virales, que permitan plantear hipótesis de asociación epidemiológica e inferir si realmente existen factores de riesgo en la incidencia de estos casos de transmisión natural.

Si bien, a la fecha se desconocen los impactos epidemiológicos de estos casos de zoonosis inversa, este tipo de evaluación diagnóstica bajo el concepto de 'Una salud' es un paso importante en la vigilancia epidemiológica veterinaria en el país.

Agradecimientos

A la Universidad de Antioquia, por su liderazgo interinstitucional que converge en la Red Regional de Laboratorios de Antioquia. A cada uno de los participantes del proyecto que nos confiaron sus animales de compañía para ser parte del estudio.

Referencias

1. Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17:181-92. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>
2. Wu D, Wu T, Liu Q, Yang Z. The SARS-CoV-2 outbreak: What we know. *Int J Infect Dis.* 2020;94:44-8. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.004>
3. Instituto Nacional de Salud. COVID-19 en Colombia. Fecha de consulta: 22 de octubre de 2021. Disponible en: <https://www.ins.gov.co/Noticias/paginas/coronavirus.aspx>
4. Global Change Data Lab. Statistics and Research Coronavirus Pandemic (COVID-19). Fecha de consulta: 22 de octubre de 2021. Disponible en: <https://ourworldindata.org/coronavirus>
5. Leroy EM, Ar Gouilh M, Brugère-Picoux J. The risk of SARS-CoV-2 transmission to pets and other wild and domestic animals strongly mandates a one-health strategy to control the COVID-19 pandemic. *One Health.* 2020 10:100133. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2020.100133>
6. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Sistema Mundial de Información Zoonosaria (OIE-WAHIS). Fecha de consulta: 22 de octubre de 2022. Disponible en: <https://wahis.oie.int/#/home>
7. Bonilla-Aldana DK, García-Barco A, Jiménez-Díaz SD, Bonilla-Aldana JL, Cardona-Trujillo MC, Muñoz-Lara F, *et al.* SARS-CoV-2 natural infection in animals: A systematic review of studies and case reports and series. *Vet Q.* 2021;41:250-67. <https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1970280>

8. Rivero R, Garay E, Serrano-Coll H, Ramírez JD, Martínez-Bravo C, Mattar S, *et al.* Human-to-dog transmission of SARS-CoV-2 Iota variant: Should COVID-19 patients avoid close contact with their pets during illness? *Sci Rep.* 2021;1:15. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-821033/v1>
9. Wang H, Wang F, Wang H, Zhao Q. Potential infectious risk from the pets carrying SARS-CoV-2. *Travel Med Infect Dis.* 2020;35:101737. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101737>
10. Boklund A, Hammer AS, Quaade ML, Rasmussen TB, Lohse L, Strandbygaard B, *et al.* SARS-CoV-2 in Danish mink farms: Course of the epidemic and a descriptive analysis of the outbreaks in 2020. *Animals (Basel).* 2021;11:164. <https://doi.org/10.3390/ani11010164>
11. Departamento Administrativo Nacional de Estadística DANE. Censo Nacional de Población y Vivienda 2018 Colombia. Fecha de consulta: 20 de octubre de 2021. Disponible en: <https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas>
12. Ministerio de Salud y Protección Social. Lineamientos para el uso de pruebas diagnósticas de laboratorio durante la pandemia del SARS-CoV-2 (Covid-19) en Colombia. Fecha de consulta: 20 de octubre de 2021. Disponible en : https://www.minsalud.gov.co/Ministerio/Institucional/Procesos_y_procedimientos/GIPS21.pdf
13. Ministerio de Salud y Protección Social. Orientaciones para el uso adecuado de los elementos de protección personal por parte de los trabajadores de la salud expuestos a COVID-19 en el trabajo y en su domicilio. Fecha de consulta: 20 de junio de 2021. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/Ministerio/Institucional/Procesos_y_procedimientos/GIPS20.pdf
14. Shi J, Wen Z, Zhong G, Yang H, Wang C, Liu R, *et al.* Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and different domestic animals to SARS-coronavirus-2. *Science.* 2020;368:1016-20. <https://doi.org/10.1126/science.abb7015>
15. World Organisation for Animal Health. Considerations for sampling, testing, and reporting of SARS-CoV-2 in animals. Fecha de consulta: 20 junio de 2021. Disponible en: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/COV-19/Sampling_Testing_and_Reporting_of_SARS-CoV-2_in_animals_final_7May_2020.pdf
16. Attelia-Dawn H. Diagnostic testing for COVID-19 bridging study for QIAamp viral RNA extraction vs Beckman RNAdvance vs Thermofisher MagMAX. Oak Ridge: U.S. Department of Energy; 2021. <https://doi.org/10.2172/1766984>
17. Kaya H, Çalışkan A, Okul M, Sarı T, Akbudak İH. Detection of SARS-CoV-2 in the tears and conjunctival secretions of Coronavirus disease 2019 patients. *J Infect Dev Ctries.* 2020;14:977-81. <https://doi.org/10.3855/jidc.13224>
18. Peleg O, Baneth G, Eyal O, Inbar J, Harrus S. Multiplex real-time qPCR for the detection of *Ehrlichia canis* and *Babesia canis vogeli*. *Veterinary Parasitology.* 2010;173:292-9. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.039>
19. Yamashita-Kawanishi N, Sawanobori R, Matsumiya K, Uema A, Chambers JK, Uchida K, *et al.* Detection of *Felis catus* papillomavirus type 3 and 4 DNA from squamous cell carcinoma cases of cats in Japan. *J Vet Med Sci.* 2018;80:1236-40. <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0089>
20. Hall T. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium* 1999;40:95-8.
21. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Mol Biol Evol.* 2021;38:3022-7. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
22. Trifinopoulos J, Nguyen L, von Haeseler A, Minh B. W-IQ-TREE: A fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucl Acids Res.* 2016;44:W232-5. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw256>
23. Letunic I, Bork P. Interactive Tree of Life iTOL v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucl Acids Res.* 2021;49:W293-6. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
24. Muñoz M, Patiño LH, Ballesteros N, Castañeda S, Luna N, Delgado L, *et al.* Striking lineage diversity of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 from non-human sources. *One Health.* 2022;14:100363. <https://doi.org/10.1016/j.onehit.2021.100363>
25. Calvet GA, Pereira SA, Ogrzewalska M, Pauvolid-Corrêa A, Resende PC, Tassinari W de S, *et al.* Investigation of SARS-CoV-2 infection in dogs and cats of humans diagnosed with COVID-19 in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS ONE.* 2021;16:e0250853. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250853>

26. Fuentealba NA, Moré G, Bravi ME, Unzaga JM, De Felice L, Salina M, *et al.* First detection and molecular analysis of SARS-CoV-2 from a naturally infected cat from Argentina. *Vet Microbiol.* 2021;260:109179. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109179>
27. Li R, Qiao S, Zhang G. Analysis of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) from different species sheds some light on cross-species receptor usage of a novel coronavirus 2019-nCoV. *J Infect.* 2020;80:469-96. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.02.013>
28. Lukassen S, Chua RL, Trefzer T, Kahn NC, Schneider MA, Muley T, *et al.* SARS-CoV-2 receptor ACE 2 and TMPRSS 2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells. *EMBO J.* 2020;39:e105114. <https://doi.org/10.15252/emboj.20105114>
29. Damas J, Hughes G, Keough K, Painter C, Persky N, Corbo M, *et al.* Broad host range of SARS-CoV-2 predicted by comparative and structural analysis of ACE2 in vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117:22311-22. <https://doi.org/10.1073/pnas.2010146117>
30. Rendon-Marín S, Martínez-Gutiérrez M, Whittaker GR, Jaimes JA, Ruiz-Saenz J. SARS CoV-2 spike protein in silico interaction with ACE2 receptors from wild and domestic species. *Front Genet.* 2021;12:571707. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.571707>
31. Bonilla-Aldana K, Ruiz-Sáenz J, Martínez-Gutiérrez M, Tiwari R, Dhama K, Jaimes J, *et al.* Concerns on the emerging research of SARS-CoV-2 on felines: Could they be significant hosts/reservoirs? *J Pure Appl Microbiol.* 2020;14(Suppl.1):703-8. <https://doi.org/10.22207/JPAM.14.SPL1.04>
32. Leroy EM, Ar Gouilh M, Brugère-Picoux J. The risk of SARS-CoV-2 transmission to pets and other wild and domestic animals strongly mandates a One-Health strategy to control the COVID-19 pandemic. *One Health.* 2020;10:100133. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2020.100133>
33. Ministerio de Salud y Protección Social. Cobertura nacional de vacunación antirrábica de perros y gatos por departamento año 2018. Fecha de consulta 20 de junio de 2021. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/SA/coberturas-vacunacion-antirrabica-perros-gatos-2018.zip>
34. Shereen MA, Khan S, Kazmi A, Bashir N, Siddique R. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *J Adv Res.* 2020;24:91-8. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.03.005>
35. Maestre JP, Jarma D, Yu JRF, Siegel JA, Horner SD, Kinney KA. Distribution of SARS-CoV-2 RNA signal in a home with COVID-19 positive occupants. *Sci Total Environ.* 2021;778:146201. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146201>
36. Shervani Z, Khan I, Siddiqui NY, Khan T, Qazi UY. Risk of SARS-CoV-2 transmission from humans to pets and viceversa. *Eur J Med Health Sci.* 2021;3:34-8. <https://doi.org/10.24018/ejmed.2021.3.1.684>
37. Abdel-Moneim AS, Abdelwhab EM. Evidence for SARS-COV-2 infection of animal hosts. *Pathogens.* 2020;9:529. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070529>
38. Barroso-Arévalo S, Sánchez-Morales L, Barasona JA, Rivera B, Sánchez R, Risalde MA, *et al.* Evaluation of the clinical evolution and transmission of SARS-CoV-2 infection in cats by simulating natural routes of infection. *Vet Res Commun.* 2022;43:837-52. <https://doi.org/10.1007/s11259-022-09908-5>
39. Oxford Coronavirus Government Response Tracker. COVID-19 Tracker Global, América Latina y el Caribe, Colombia. Fecha de consulta: 20 de septiembre de 2021. Disponible en: <https://graphics.reuters.com/world-coronavirus-tracker-and-maps/es/countries-and-territories/colombia/>
40. World Health Organization. Diagnostic testing for SARS-CoV-2: Interim guidance. Fecha de consulta: 16 de marzo de 2021. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/334254>
41. Afzal A. Molecular diagnostic technologies for COVID-19: Limitations and challenges. *J Adv Res.* 2020;26:149-59. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.08.002>
42. McHugh ML. Lessons in biostatistics interrater reliability: The kappa statistic. *Biochem Med (Zagreb).* 2012;22:276-82.
43. Giraldo-Ramírez S, Rendón-Marín S, Jaimes JA, Martínez-Gutiérrez M, Ruiz-Sáenz J. SARS-CoV-2 clinical outcome in domestic and wild cats: A systematic review. *Animals.* 2021;11:2056. <https://doi.org/10.3390/ani11072056>
44. Hulswit R, de Haan C, Bosch B. Coronavirus spike protein and tropism changes. In: Ziebuhr J, editor. *Advances in virus research.* Washington D. C.: Elsevier Inc.; 2016. p. 94-5. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.08.004>

45. Muñoz M, Patiño LH, Ballesteros N, Paniz-Mondolfi A, Ramírez JD. Characterizing SARS-CoV-2 genome diversity circulating in South American countries: Signatures of potentially emergent lineages? *Int J Infect Dis.* 2021;105:329-32. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.02.073>
46. Buitrago SP, Garzón-Ospina D. Genetic diversity of SARS-CoV-2 in South America: Demographic history and structuration signals. *Arch Virol.* 2021;166:3357-71. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05258-w>
47. Singer J. CoV-GLUE. nsp12 replacement S647I. Fecha de consulta: 23 de octubre de 2021. Disponible en: <http://cov-glue.cvr.gla.ac.uk/#/project/replacement/NSP12:S:647:I>
48. Hosie MJ, Epifano I, Herder V, Orton RJ, Stevenson A, Johnson N, *et al.* Detection of SARS-CoV-2 in respiratory samples from cats in the UK associated with human-to-cat transmission. *Vet Rec.* 2021;188:e247. <https://doi.org/10.1002/vetr.247>
49. Korber B, Fischer WM, Gnanakaran S, Yoon H, Theiler J, Abfalterer W, *et al.* Tracking changes in SARS-CoV-2 spike: Evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus. *Cell.* 2020;182:812-27.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.043>
50. Schlottau K, Rissmann M, Graaf A, Schön J, Sehl J, Wylezich C, *et al.* SARS-CoV-2 in fruit bats, ferrets, pigs, and chickens: An experimental transmission study. *Lancet Microbe.* 2020;1:e218-25. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30089-6](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30089-6)

Artículo original

Validación clínica de la prueba RT-LAMP para el diagnóstico rápido del SARS-CoV-2

Leidy Hurtado¹, Diana Díaz², Katherine Escorcía², Laura Flórez², Yesit Bello³, Yirys Díaz¹, Elkin Navarro^{3,4}, Leonardo C. Pacheco^{3,4}, Nataly Galán^{3,4}, Ronald Maestre^{4,5}, Antonio Acosta^{4,5}, Lisandro A. Pacheco^{4,5}

¹ División Ciencias de la Salud, Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia

² Programa de Microbiología, Universidad Simón Bolívar, Barranquilla, Colombia

³ Unidad de Genética y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Básicas y Biomédicas, Universidad Simón Bolívar, Barranquilla, Colombia

⁴ Centro de Investigaciones en Ciencias de la Vida, Universidad Simón Bolívar, Barranquilla, Colombia

⁵ Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Simón Bolívar, Barranquilla, Colombia

Introducción. Desde el primer reporte en la provincia de Wuhan (China) en el año 2019, el SARS-CoV-2 se ha diseminado por todo el mundo, provocando un enorme impacto en la salud pública. Para su diagnóstico, la Organización Mundial de la Salud ha incentivado el desarrollo de pruebas rápidas, de simple ejecución, sensibles y específicas, que complementan la RT-qPCR como prueba de referencia. La prueba RT-LAMP ha mostrado ser una excelente alternativa para la detección del SARS-CoV-2 en diferentes biofluidos.

Objetivo. Validar la técnica RT-LAMP colorimétrica en muestras de hisopado nasofaríngeo previamente confirmadas por RT-qPCR, usando el protocolo Charité, Berlín, Alemania.

Materiales y métodos. Un total de 153 muestras de hisopado nasofaríngeo de individuos con sospecha de COVID-19 se sometieron a RT-qPCR y RT-LAMP, usando un estuche comercial colorimétrico (NEB, Germany). La RT-LAMP se practicó con las muestras de ARN extraídas del hisopado nasofaríngeo y con muestras crudas sin previa extracción de ARN. El resultado fue evaluado por un simple cambio de color en la reacción.

Resultados. La sensibilidad y especificidad de la técnica RT-LAMP para detectar el gen *N* del SARS-CoV-2 mediante un set de cebadores previamente reportados (set de Broughton), arrojó valores de 0,97 (0,85-1,00) y 0,81 (0,65-0,92), respectivamente, con un intervalo de confianza del 95%. Otro set de cebadores dirigidos contra otra región del mismo gen (set de Lalli) arrojó valores de sensibilidad y especificidad de 0,96 (0,78-1,00) y 0,77 (0,55-0,92), respectivamente. Sin previa extracción de ARN, se encontró que la sensibilidad fue del 0,95 (0,74-1,00) y la especificidad del 0,88 (0,64-0,99).

Conclusiones. Estos resultados evidencian que la técnica RT-LAMP podría considerarse una prueba diagnóstica rápida, de fácil ejecución, libre de equipos sofisticados, sensible y específica, para el diagnóstico del SARS-CoV-2 en muestras de hisopados nasofaríngeos.

Palabras clave: COVID-19/diagnóstico; técnicas de diagnóstico molecular; sensibilidad y especificidad; pruebas en el punto de atención

Clinical validation of the isothermal RT-LAMP test for rapid diagnosis of SARS-CoV-2

Introduction: Since the first report in Wuhan (China) in 2019, the SARS-CoV-2 virus has spread throughout the world, with a significant impact in public health. To contain its transmission, the WHO has encouraged the development of rapid, simple, sensitive and specific tests that complement qRT-PCR, as the gold standard. RT-LAMP has shown to be a good alternative to detect SARS-CoV-2 in different fluid samples.

Objective: To validate the colorimetric RT-LAMP technique using two sets of primers targeting *N* gene of SARS-CoV-2 in 117 nasopharyngeal swab samples previously confirmed by RT-qPCR, using the Charité/Berlin protocol.

Material and methods: A total of 153 nasopharyngeal swab samples from individuals with suspected COVID-19 were subjected to qRT-PCR and RT-LAMP using a commercial colorimetric kit (NEB, Germany). RT-LAMP was performed using both extracted RNA samples and raw samples without prior RNA extraction, and the result was assessed by a simple color change in the reaction.

Results: Sensitivity and specificity for the previously reported RT-LAMP primers (Broughton set) targeting *N* gene of SARS-CoV-2 were 0.97 (0.85-1.00) and 0.81 (0.65-0.92) respectively, with CI95%. The Lalli primers targeting another region of the *N* gene used showed a sensitivity value of 0.96 (0.78-1.00) and a specificity of 0.77 (0.55-0.92). Without RNA extraction we found a sensitivity value of 0.95 (0.74, 1.00) and a specificity of 0.88 (0.64, 0.99). A sensitivity value of 0.95 (0.74-1.00) and a specificity 0.88 (0.64-0.99) were found without prior RNA extraction.

Recibido: 10/03/2022

Aceptado: 09/09/2022

Publicado: 14/09/2022

Citación:

Hurtado L, Díaz D, Escorcía K, Flórez L, Bello Y, Díaz Y, *et al.* Validación clínica de la prueba RT-LAMP para el diagnóstico rápido del SARS-CoV-2. *Biomédica.* 2022;42(Supl.2):59-72. <https://doi.org/10.7705/biomedica.6523>

Correspondencia:

Lisandro Pacheco, Unidad de Genética y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Básicas y Biomédicas, Universidad Simón Bolívar, Barranquilla, Colombia
lpacheco28@unisimonbolivar.edu.co
Teléfono: (57) (301) 571 0104

Contribución de los autores:

Yirys Díaz, Antonio Acosta y Lisandro A. Pacheco: concepción de la propuesta y diseño del manuscrito
Leidy Hurtado, Diana Díaz, Katherine Escorcía, Laura Flórez, Yesit Bello, Elkin Navarro, Leonardo C. Pacheco, Nataly Galán y Ronald Maestre: adquisición, análisis e interpretación de los datos
Leidy Hurtado, Diana Díaz, Katherine Escorcía, Laura Flórez, Yesit Bello, Yirys Díaz, Antonio Acosta y Lisandro A. Pacheco: redacción del manuscrito

Financiación:

Este trabajo fue financiado por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación y el Sistema General de Regalías (Proyecto BPIN #202000100144). Diana Díaz, Katherine Escorcía y Laura Flórez fueron financiadas por un proyecto del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación (contrato #462, convocatoria #874).

Conflicto de intereses:

Los autores manifiestan no tener conflicto de intereses.

Conclusion: Taking together, the results showed that RT-LAMP technique could be considered as a rapid diagnostic test, easy to perform, free of sophisticated equipment, sensitive and specific to diagnose SARS-CoV-2 in nasopharyngeal swabs with and without prior RNA extraction, allowing its implementation in places with scarce resources.

Keywords: COVID-19/diagnosis; molecular diagnostic techniques; sensitivity and specificity; point-of-care testing

La aparición de un nuevo síndrome respiratorio agudo y grave (COVID-19), ocasionado por el virus SARS-CoV-2, se ha desarrollado como un evento pandémico que produjo graves problemas de salud pública, con un amplio impacto en la economía global. Desde el inicio de la pandemia en diciembre del 2019 hasta agosto del 2022, la COVID-19 ha sido responsable de más de 6,4 millones de muertes y sobrepasa los 600 millones de personas infectadas a nivel mundial desde el primer reporte en la provincia de Wuhan, China (1).

Es de resaltar que el SARS-CoV-2 es un virus perteneciente a la familia Coronaviridae, género *Betacoronavirus* y subgénero *Sarbecoronavirus* o *Sarbecovirus* (2).

El diagnóstico molecular del SARS-CoV-2 se basa en la detección de proteínas virales en pruebas serológicas o de antígenos, o a partir del ARN viral en muestras clínicas de individuos con sospecha de COVID-19. Las pruebas de antígenos se consideran como las menos sensibles y con menor especificidad para diagnosticar la enfermedad (3).

En la actualidad, la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con transcriptasa inversa (RT-qPCR) se considera la técnica molecular más sensible y específica para diagnosticar el SARS-CoV-2 (4). Sin embargo, la RT-qPCR es una técnica compleja y laboriosa que requiere de equipos eficientes y costosos, y de personal entrenado e infraestructura específica para su ejecución. En concordancia con la aparición de nuevas variantes del virus con un potencial de diseminación mucho mayor a la cepa original del SARS-CoV-2, la Organización Mundial de la Salud (OMS) está incentivando el desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico molecular que soslayan las dificultades antes mencionadas de la RT-qPCR, y que mantengan su buen grado de sensibilidad y especificidad.

Algunas metodologías de diagnóstico molecular han surgido en los últimos tiempos, como RT-LAMP, DETECTR y SHERLOCK (basado en el sistema CRISPR/Cas) (5), y amplificación por polimerasas y recombinasas (RPA), entre otras (6-10), todas con sensibilidad y especificidad variables. De todas las metodologías anteriormente mencionadas, la técnica RT-LAMP ha demostrado un enorme potencial en el diagnóstico de SARS-CoV-2 y podría ser una metodología útil para complementar el diagnóstico de COVID-19 en centros de salud con bajos recursos.

La técnica molecular LAMP (*Loop Mediated Isothermal Amplification*) es una prueba de principio isotérmico; es decir, se ejecuta a una única temperatura. Por lo tanto, las pruebas diagnósticas basadas en ella pueden practicarse en cualquier lugar, inclusive en aquellos con recursos limitados, debido a que solo se requiere un equipo que pueda ser ajustado a una única temperatura. Los abordajes colorimétricos de la LAMP incluyen la detección de la turbidez de la reacción, provocada por la acumulación de pirofosfato de magnesio (10), y también, cambios de color que ocurren cuando colorantes

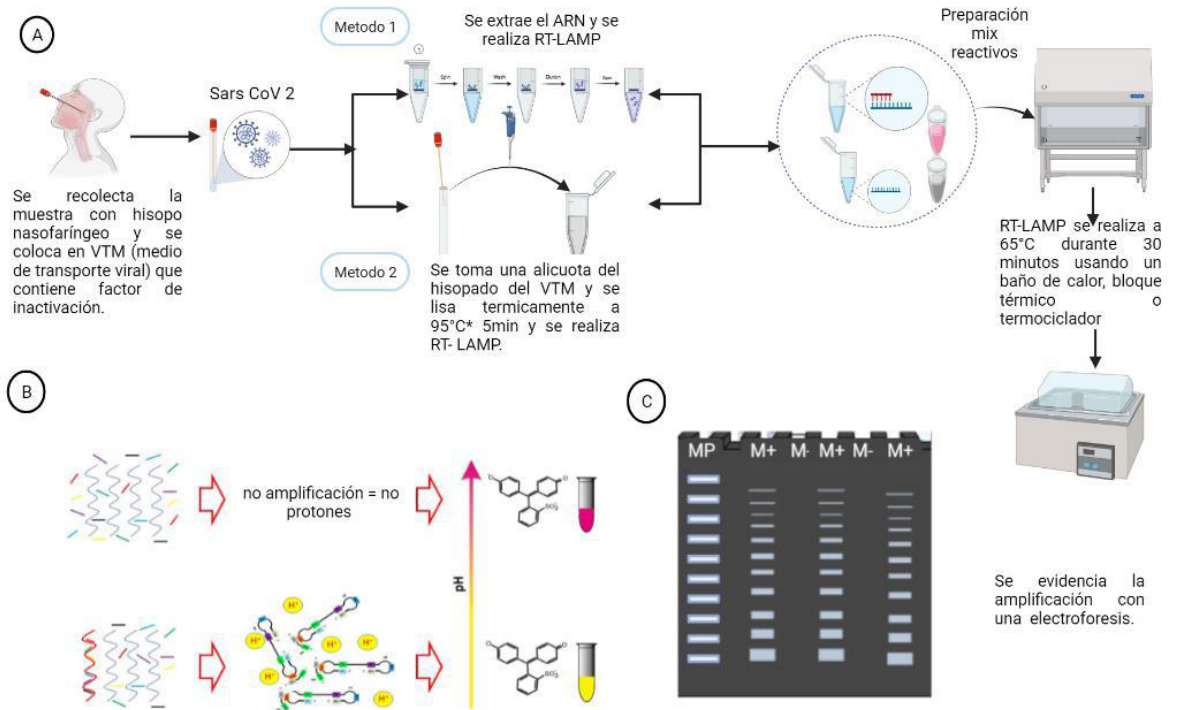


Figura creada usando el software Biorender.

Figura 1. Flujo de la prueba LAMP para detectar SARS-CoV-2 en muestras de hisopado nasal. A) La reacción de RT-LAMP a partir de muestras de hisopado nasofaríngeo de individuos con sospecha de Covid-19 se ejecuta a partir de: i) ARN extraído o ii) directamente de las muestras sin extracción de ARN, con un previo paso de inactivación a 95 °C por 5 minutos. B) La RT-LAMP hace uso de 6 cebadores (marcados aquí en colores) que, en presencia del ARN diana (espiral de color rojo), inician la amplificación isotérmica, generando protones que inducen un cambio de pH en la reacción, con la subsecuente virada de color de rosa a amarillo. C) La reacción de amplificación en RT-LAMP genera productos de diferentes masas moleculares en forma de concatámeros que pueden observarse fácilmente en un gel de agarosa.



Figura 2. Resultado colorimétrico de RT-LAMP. Reacción color rosa: muestra negativa para SARS-CoV-2. Reacción color amarillo: resultado positivo para el gen N del SARS-CoV-2

sensibles a cambios de pH o incluso, colorantes interpuestos de ADN, se incorporan en la reacción (11-14) (figura 1 y 2).

En la técnica LAMP se emplea una ADN polimerasa termoestable, conocida como Bst, aislada de la bacteria *Bacillus stearothermophilus*, cuya actividad enzimática se da a temperaturas entre 60 y 65 °C, y un conjunto de 4 a 6 cebadores que permite identificar 6 a 8 secuencias distintas en el gen diana de interés; una DNA polimerasa con actividad de desplazamiento de hebra inicia la síntesis y dos de los cebadores forman estructuras en bucle para facilitar las subsecuentes rondas de amplificación (15) (figura 1B).

Esta ADN polimerasa tiene actividad helicasa y actividad exonucleasa 3-5' (16), además de ser mucho más robusta que la Taq ADN polimerasa (*Thermus aquaticus*), empleada en la PCR convencional, debido a que la Bst puede actuar normalmente en presencia de inhibidores presentes en muestras biológicas o medios de transporte viral, que habitualmente interfieren con el desempeño de la técnica. Cuando la diana que se quiere amplificar es de ARN, se incorpora una transcriptasa inversa a la reacción, por lo cual se denomina RT-LAMP.

En el presente trabajo, se evalúa el desempeño de la prueba isotérmica RT-LAMP a partir de ARN extraído de muestras nasofaríngeas de pacientes con sospecha de COVID-19, remitidas a la Unidad de Genética y Biología Molecular de la Universidad Simón Bolívar de Barranquilla. De igual forma, se reportan los resultados preliminares de la detección del ARN viral por RT-LAMP directamente en hisopados nasofaríngeos sin previa extracción de ARN.

Materiales y métodos

Muestras

Se recolectaron 153 muestras de hisopados nasofaríngeos de pacientes con sospecha de COVID-19, en la Unidad de Genética y Biología Molecular de la Universidad Simón Bolívar de Barranquilla, durante el período comprendido entre junio de 2021 y enero de 2022. Las muestras se inactivaron rápidamente en medio de transporte viral y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Extracción de ARN

De ellas, 117 muestras se sometieron a extracción de ARN a partir de 200 µl de hisopado nasofaríngeo contenido en medio de transporte viral, con el kit de extracción Quick-RNA Viral Kit™ (ZYMO Research), que emplea perlas magnéticas de sílice para la purificación del ARN total, siguiendo las recomendaciones del fabricante. En seguida, se adicionaron 400 µl de solución tampón de ARN viral a cada 200 µl de muestra (2:1) y se mezcló suavemente. Posteriormente, se realizaron lavados sucesivos para, finalmente, eluir el ARN en 15 µl de agua libre de ADNasa/RNasa.

RT-qPCR

Para llevar a cabo la RT-PCR, se utilizó el kit SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase™ (Invitrogen, catálogo: 1257401). Se emplearon 8 µl de solución tampón de reacción 2X que contenía 0,4 mM de cada dNTP, 3,2 mM de MgSO₄, 0,3 µl de transcriptasa inversa (SuperScript III RT/Platinum Taq Mix), 200 nM de cada cebador dirigido contra el gen E del SARS-CoV-2 y 100 nM de sonda TaqMan conjugada al fluoróforo CAL Red 610. Además, se introdujo un control endógeno a la reacción (gen RNase P humano), 100 nM de cada cebador y 100 nM de sonda TaqMan-Hex, para su amplificación. Los cebadores empleados para amplificar un fragmento del gen E que codifica para la envoltura del virus (específico del subgénero *Sarbecovirus*) fueron proporcionados por Biosearch Technologies™, con base en el protocolo descrito por Corman, *et al.* (17). Las secuencias se muestran en el cuadro 1.

La RT-qPCR se practicó con el equipo CFX96™ Bio-Rad, bajo las siguientes condiciones de amplificación: 50 °C por 20 minutos, seguido de 95 °C por 3 minutos, y finalizando con 45 ciclos de 95 °C por 15 s y 58 °C por 30 s.

RT-LAMP

Esta técnica de amplificación isotérmica se preparó con el kit Warmstart colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA) (NEB), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. En ella, se emplea un conjunto de seis cebadores para lograr la amplificación mediada por lazos. En este estudio de validación clínica, se emplearon los cebadores reportados por Broughton, *et al.* (18), y por Lalli, *et al.* (19); ambos juegos de cebadores amplifican un segmento del gen N del SARS-CoV-2, con 229 pares de bases para el primero y con 217 pares para el segundo. Como control positivo, en las reacciones de RT-LAMP se incluyó un plásmido que tiene clonado un fragmento del gen N del SARS-CoV-2, adquirido de la casa comercial New England Biolabs (NEB, Germany). Los cebadores usados en este estudio fueron sintetizados en Macrogen (Korea) (cuadro 1) (figura 3).

Antes de cada reacción LAMP, se preparó una mezcla 10X de cebadores de único uso y se procedió a realizar una corta incubación a 95 °C por 5 minutos, para eliminar cualquier formación de estructuras secundarias que pudieran afectar el cambio de color de la reacción. La concentración final de los cebadores en la reacción, después de agregar los demás reactivos, fue de 1X (cuadro 1).

La reacción LAMP se preparó empleando 10 µl del reactivo colorimétrico Warmstart colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA), 5 µl de agua, 3 µl del ARN previamente extraído y 2 µl de la mezcla maestra 10X del respectivo set de cebadores que anteriormente había sido incubado a 95 °C. La mezcla de cebadores 10X se adicionaba siempre en la tapa del tubo de la reacción, con la finalidad de evitar su degradación, así como amplificaciones inespecíficas que pudiesen empezar antes de la temperatura óptima de amplificación.

La reacción se iniciaba con un *spin* de los tubos a 65 °C por 30 minutos, en un termociclador (SimpliAmp Thermal Cycler™, Thermo Fisher Scientific). Transcurrido el tiempo de incubación, se visualizaba el resultado por colorimetría y se registraba fotográficamente con la cámara de un teléfono celular. El cambio de color de rosa a amarillo era indicativo de una reacción positiva, mientras que, si el color rosa se mantenía en la reacción, era señal de un resultado negativo para SARS-CoV-2 (figuras 1B y 2).

Cuadro 1. Cebadores utilizados en este trabajo para la detección colorimétrica del gen N de SARS-CoV-2

Cebadores para amplificación	[] Inicial (10X)	[] en la LAMP (1X)	Set de iniciadores	
			Secuencia 5'-3' Gen N SARS-CoV-2	
			Broughton, <i>et al.</i> (1)	Lalli, <i>et al.</i> (2)
Cebadores RT-LAMP	F3 2 µ M	0,2 µ M	5'-AACACAAGCTTTTCGGCAG-3'	5'-TGGCTACTACCGAAGAGCT-3'
Gen N SARS-CoV-2	B3 2 µ M	0,2 µ M	5'-GAAATTTGGATCTTTGTCATCC-3'	5'-TGCAGCATTGTTAGCAGGAT-3'
	BL 8 µ M	0,8 µ M	5'-TTCCTTGTCTGATTAGTTC-3'	5'-GGACTGAGATCTTTCATTTTACCGT-3'
	FL 8 µ M	0,8 µ M	5'-ACCTTCGGAACGTGGTT-3'	5'-ACTGAGGGAGCCTTGAATACA-3'
	FIP 16 µ M	1,6 µ M	5'-TGCGGCCAATGTTTGTATCAGC CAAGGAAATTTGGGGAC-3'	5'-TCTGGCCAGTTCCTAGGTAGTCCAGAC GAATTCGTGGTGG-3'
	FIB 16 µ M	1,6 µ M	5'-CGCATTGGCATGGAAGTCACTTT GATGGCACCTGTGTAG-3'	5'-AGACGGCATCATATGGGTTGCACGGGTG CCAATGTGATCT-3'
Cebadores RT-qPCR	Cebador delantero-gen E		5'ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT3	
Gen E	Cebador inverso-gen E		5'ATATTGCAGCAGTACGCACACA3'	
	sonda TaqMan CAL FLUOR RED-gen E		610-5'ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG3'-BBQ-2	
	cebador delantero		5'-AGATTTGGACCTGCGAGCG-3'	
	cebador inverso		5'-GAGCGGCTGTCTCCACAAGT-3'	
	sonda TaqMan		HEX-5'TTCTGACCT-Nova-GAAGGCTCTGCGCG3'-BHQ-1	

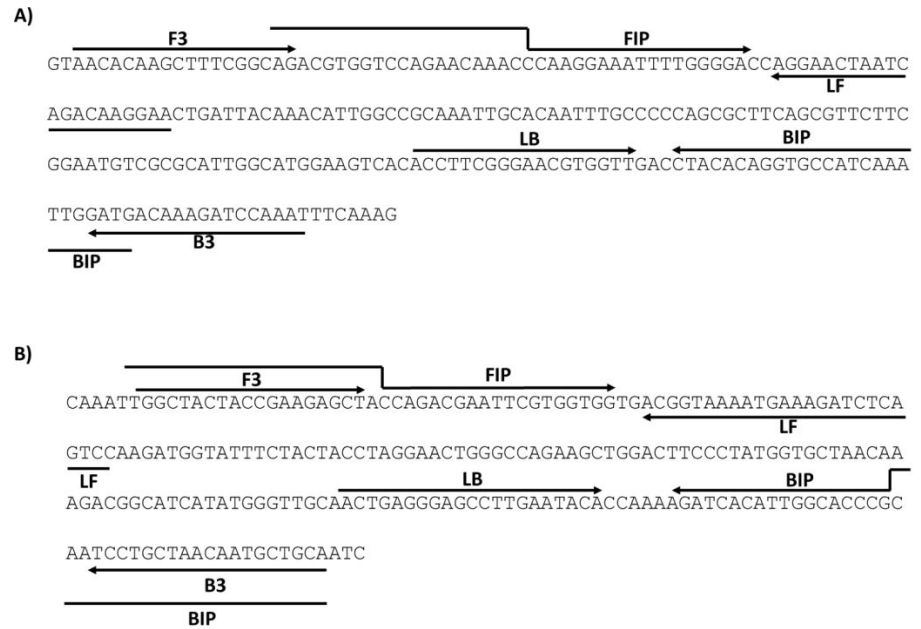


Figura 3. Localización de los sets de cebadores en el gen N del SARS-CoV-2. F3: cebador sentido; B3: cebador inverso o antisentido; FIP: cebador sentido interno; BIP: cebador inverso interno; LF: cebador lazo sentido; LB: cebador lazo inverso

Para practicar la RT-LAMP en 36 muestras sin previa extracción de ARN, el protocolo fue bastante similar, con la siguiente modificación: la muestra provenía directamente del medio de transporte viral con un previo paso de incubación a 95 °C por 5 minutos. De ese volumen inactivado por calor, se utilizaron 3 µl para la reacción de RT-LAMP en lugar de ARN extraído con estuche comercial.

Análisis

Para el análisis estadístico de los resultados, se empleó el programa estadístico Rstudio (versión 1.2.50033). La especificidad de la prueba RT-LAMP se calculó de la fracción de muestras con RT-qPCR negativas que también resultaron negativas en las pruebas de RT-LAMP. La sensibilidad se expresó como la fracción de muestras que resultaron positivas en la qRT-PCR y, también, en la RT-LAMP. Se calcularon el valor predictivo positivo y el negativo, además del índice kappa (κ) para determinar la concordancia de los resultados de la RT-LAMP con los de la RT-qPCR.

Resultados

En este trabajo se analizaron 153 muestras de individuos con sospecha de COVID-19, que asistieron a la Unidad de Genética y Biología Molecular de la Universidad Simón Bolívar entre los meses de junio de 2021 y enero de 2022. En 117 muestras se extrajo el ARN a partir de hisopados nasofaríngeos. De estas, 60 resultaron negativas, y 57 resultaron positivas para SARS-CoV-2 según la RT-qPCR (cuadro 2).

Las amplificaciones cuyo umbral de ciclos (*Cycle Threshold*, Ct) estuviera en un rango de 12 a 38, se consideraron positivas para SARS-CoV-2 (20). En estas mismas muestras, la RT-LAMP fue positiva en 58 y negativa en 59 (cuadro 2). Finalmente, el rendimiento de la RT-LAMP se evaluó bajo condiciones menos complejas en 36 muestras de hisopado nasofaríngeo, es decir, sin extracción previa de ARN (cuadro 2).

Cuadro 2. Comparación del rendimiento de los dos sets de cebadores y muestras sin previa extracción de ARN, para la ejecución de la prueba RT-LAMP y la RT-qPCR

Comparación de los resultados RT-qPCR con RT-LAMP		Positivo	Negativo	Total
Set de Broughton	RT-qPCR	35	37	72
	RT-LAMP	41	31	72
Set de Lalli	RT-qPCR	22	23	45
	RT-LAMP	17	28	45
Sin extracción de ARN	RT-qPCR	19	17	46
	RT-LAMP	20	16	46

Para validar la prueba RT-LAMP en muestras de hisopado nasofaríngeo, se utilizaron los dos sets ya mencionados, cada uno con seis cebadores y ambos diseñados para amplificar un fragmento del gen *N* del SARS-CoV-2, que en adelante se denominan el “set de Broughton” y el “set de Lalli”. Los cebadores del primero reconocen una porción C-terminal del gen *N* (18) y los del segundo set fueron diseñados contra la región N-terminal del gen *N* (19) (figura 3 y cuadro 1).

Todas las reacciones fueron ejecutadas a una única temperatura de 65 °C por un tiempo de 30 minutos. En seguida, se registraron fotográficamente con la cámara de un teléfono celular (figuras 1 y 4).

Una característica de la prueba LAMP, que se sustenta en su propio fundamento, es la generación de productos de diferentes masas moleculares que pueden visualizarse en un gel de agarosa como una escalera, patrón típico de bandeo de la LAMP (figura 1C) (21). Las RT-LAMP positivas muestran un patrón de bandeo de diferentes masas moleculares, correspondiente a los diferentes fragmentos obtenidos por amplificación isotérmica mediada por lazos (LAMP) (figura 4). Al contrario, en las muestras negativas no se evidencia ningún patrón de amplificación.

De las 117 muestras de ARN extraídas a partir de hisopados nasofaríngeos, los resultados de la RT-LAMP en 17 no correspondieron con los obtenidos por RT-qPCR, pero en las otras 100 muestras, sí lo hicieron (cuadro 2).

Para determinar su rendimiento de manera individual, se calcularon la sensibilidad y la especificidad de ambos sets de cebadores dirigidos contra el gen *N*. Para la reacción RT-LAMP con el set de Broughton, se incluyeron 72 muestras de ARN, de las cuales 64 fueron concordantes entre RT-LAMP y qRT-PCR, y 8 fueron discordantes. Hubo un falso negativo y 7 falsos positivos, de acuerdo con lo observado en la tabla de contingencia. Para el set de Lalli, se analizaron 45 muestras de ARN: 22 muestras positivas y 23 muestras negativas para RT-qPCR, en seis de las cuales no correspondieron con los resultados de la RT-LAMP (cuadro 3).

Con base en lo anterior, se encontró que la reacción colorimétrica RT-LAMP, con los cebadores del set de Broughton para detección del SARS-CoV-2, tuvo una sensibilidad de 0,97 y una especificidad del 0,81. El valor predictivo positivo fue de 0,83 y el valor predictivo negativo fue de 0,97. Por otro lado, empleando el set de Lalli para la RT-LAMP, la sensibilidad fue de 0,96 y la especificidad fue de 0,77, con un valor predictivo positivo de 0,81 y valor predictivo negativo de 0,94 (cuadro 4).

Además, para los dos sets de cebadores evaluados, se analizó la concordancia entre los resultados para la técnica RT-LAMP usando la índice kappa (κ) (22).

El índice κ , para la reacción de RT-LAMP empleando el set de Broughton, fue de 0,76, mientras que, para el set de Lalli fue de 0,73 (cuadro 4). Estos valores demuestran que ambos grupos de cebadores le permitieron a la técnica RT-LAMP discriminar entre muestras positivas y negativas para SARS-CoV-2, con una buena concordancia entre los dos métodos diagnósticos, RT- qPCR y RT-LAMP, evidenciando su potencial diagnóstico para el SARS-CoV-2.

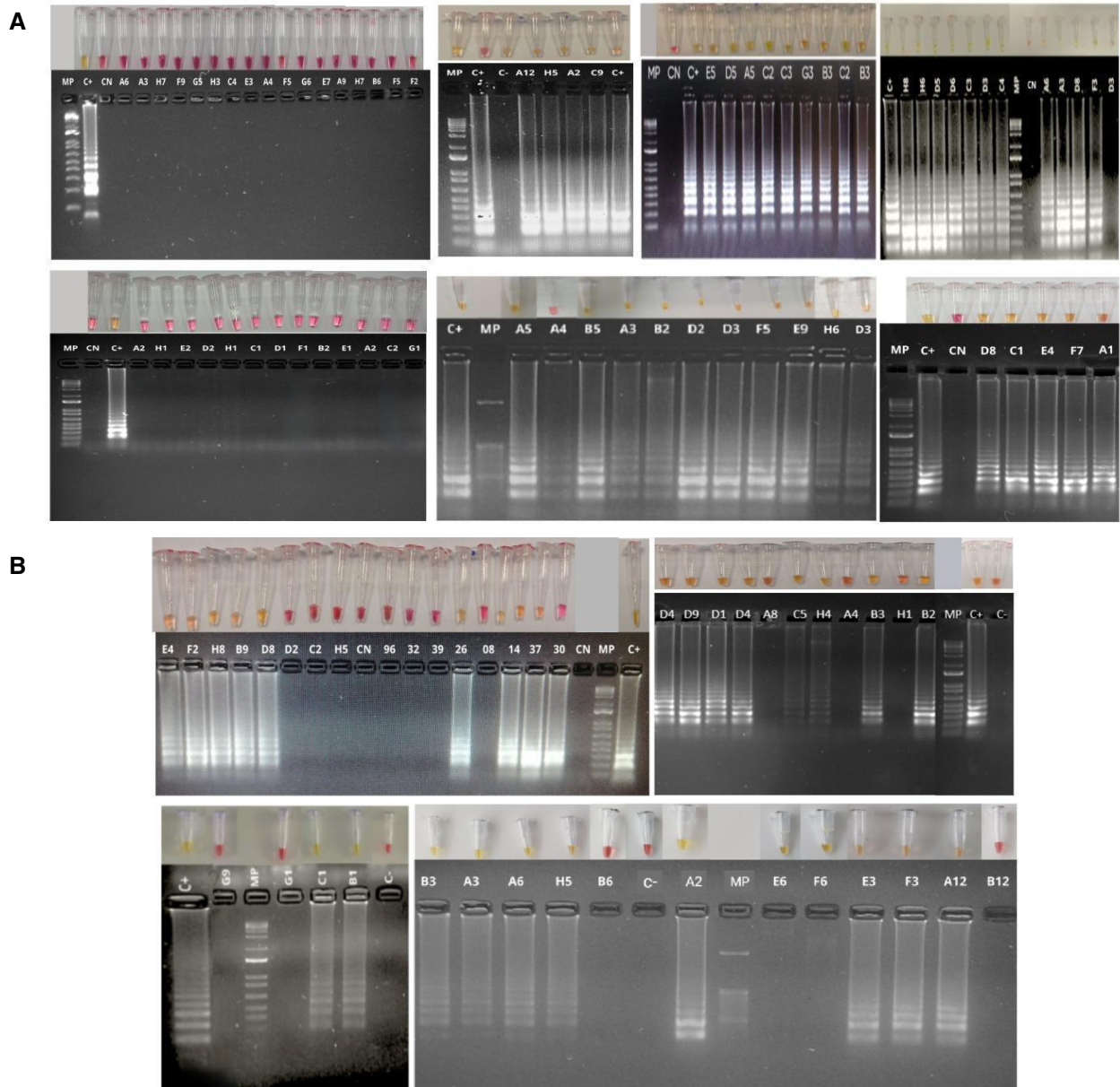


Figura 4. Detección colorimétrica de SARS-CoV-2 por RT-LAMP; empleando dos sets de cebadores, Broughton (A) y Lalli (B). Se recolectaron 117 muestras de ARN purificado a partir de hisopado nasofaríngeo de individuos sintomáticos para COVID-19. La reacción fue ejecutada a una temperatura de 65 °C durante 30 minutos, usando el estuche comercial Warmstart colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA) (NEB) en 20 μ l de volumen final. La reacción de RT-LAMP tenía como diana el gen *N* del SARS-CoV-2. Las muestras negativas para SARS-CoV-2 se muestran en color rosa y las muestras positivas se visualizan por un cambio de color de rosa a amarillo. Los amplicones producto de la reacción de amplificación fueron separados en un gel de agarosa al 2 % y teñidos con SYBR Safe (Invitrogen). El patrón de tipo escalera observado en las muestras positivas, es coherente con una amplificación positiva y el subsecuente viraje de color en las muestras con presencia del SARS-CoV-2, en tanto que los productos de amplificación están ausentes en las muestras negativas. CP: fragmento sintético del gen *N* del SARS-CoV-2. CN: reacciones incubadas con agua de grado para biología molecular en lugar de ARN.

Cuadro 3. Tabla de contingencia RT-LAMP Vs. RT-qPCR correspondiente a los dos sets de cebadores dirigidos contra el gen *N* del SARS-CoV-2, set de Broughton y set de Lalli, y muestras sin extracción de ARN previa

Tabla de contingencia				
	RT-LAMP	RT-qPCR		Total
		Positivos	Negativos	
Set de Broughton	Positivos	34	7	41
	Negativos	1	30	31
	Total	35	37	72
Set de Lalli	Positivos	22	5	27
	Negativos	1	17	18
	Total	23	22	45
Sin extracción de ARN	Positivos	18	2	20
	Negativos	1	15	16
	Total	19	17	36

Cuadro 4. Validación de RT-LAMP para diagnóstico del gen *N* de SARS-CoV-2. Sensibilidad, especificidad; valores predictivos de muestras positivas y negativas; concordancia por conformidad mediante el índice kappa (κ) con intervalo de confianza del 95 %.

Set de cebadores	Sensibilidad	Especificidad	Valor predictivo positivo	Valor predictivo negativo	Índice kappa	Po	Pe
Set de Broughton	0,97 (0,85-1,00)	0,81 (0,65-0,92)	0,83 (0,68-0,93)	0,97 (0,83-1,00)	0,778	0,88	0,49
Set de Lalli	0,96 (0,78-1,00)	0,77 (0,55-0,92)	0,81 (0,62-0,94)	0,94 (0,73-1,00)	0,73	0,86	0,50
Sin extracción de ARN	0,95 (0,74-1,00)	0,88 (0,64-0,99)	0,90 (0,68-0,99)	0,94 (0,70;-1,00)	0,83	0,91	0,50

Índice κ : valores de $0 \geq 0,2$ mínima concordancia, $0,2 \geq 0,4$ escasa concordancia, $0,4 \geq 0,6$ moderada, $0,6 \geq 0,8$ buena concordancia, $0,8 \geq 1$ muy buena concordancia

El desarrollo actual de técnicas de diagnóstico de agentes patógenos apunta a la implementación de técnicas que permitan su utilización a gran escala y en laboratorios con infraestructura limitada, así como, favorecer su uso y utilidad en los puntos de atención primaria. En ese contexto, la prueba RT-LAMP ha demostrado buenos resultados al incluir ácidos nucleicos purificados, así como, muestras directas sin previa extracción de ARN (19,23).

El siguiente paso en la validación de la técnica de RT-LAMP fue evaluar su rendimiento empleando el set de Broughton en muestras sin previa extracción de ARN. Para ello, se validaron 36 muestras de hisopado nasofaríngeo de individuos sintomáticos con sospecha de COVID-19, a las cuales se les hizo un pretratamiento térmico por 5 minutos a 95 °C, sin ningún tipo de proteasa ni químicos adicionales. Posteriormente, se practicó la RT-LAMP, siguiendo las mismas condiciones descritas anteriormente, para la amplificación del gen *N* del SARS-CoV-2. Los resultados obtenidos arrojaron buenos niveles de sensibilidad y especificidad: 0,94 y 0,88, respectivamente, inclusive con un índice κ superior a los análisis, usando el ARN extraído de las muestras de hisopado nasofaríngeo (figura 5 y cuadro 4).

Discusión

La pandemia de COVID-19 motivó al gobierno nacional a fortalecer las capacidades científicas y tecnológicas de los laboratorios de biología molecular del país, para apoyar el diagnóstico molecular del SARS-CoV-2 y otros agentes patógenos de interés en salud pública. No obstante, en Colombia el diagnóstico molecular de agentes infecciosos sigue siendo centralizado, debido a los pocos laboratorios que cuentan con infraestructura y equipos especializados para realizar dichas pruebas.

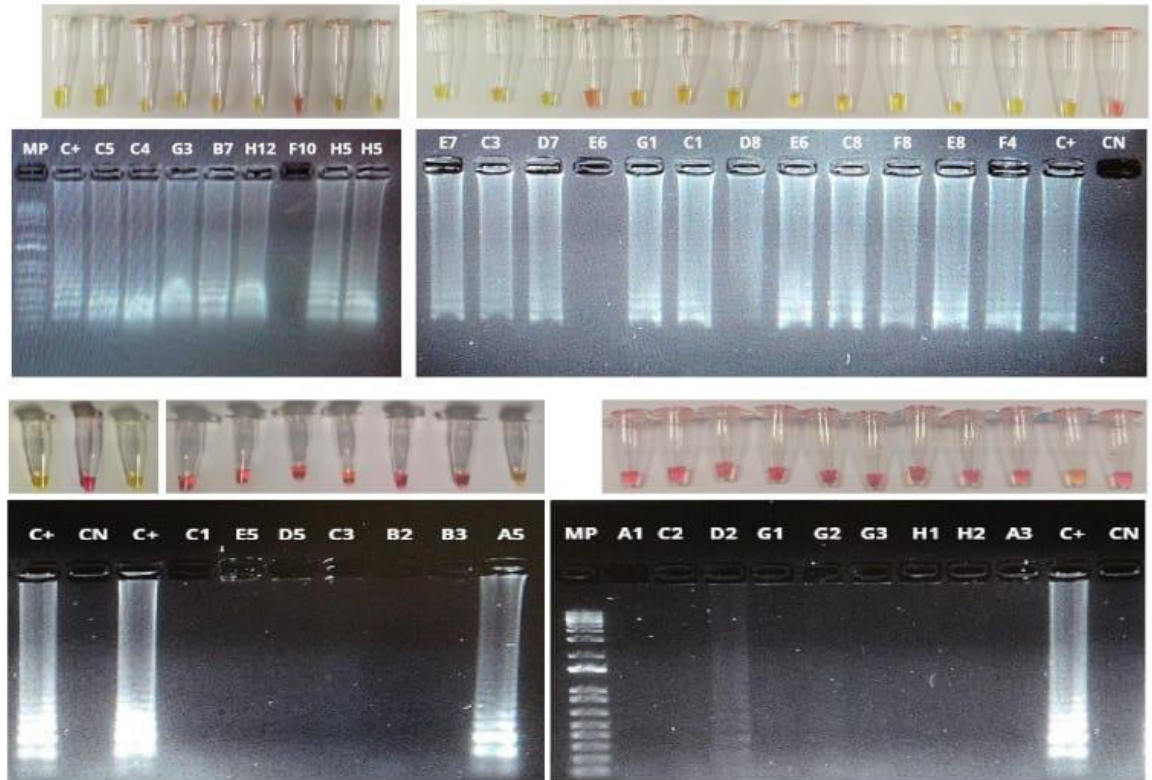


Figura 5. Detección colorimétrica de SARS-CoV-2 por RT-LAMP en muestras de hisopado nasofaríngeo, sin previa extracción de ARN. Se precalentaron 36 muestras de hisopado nasofaríngeo durante 5 minutos a 95 °C; posteriormente, se agregaron 3 µl de muestra a la reacción RT-LAMP usando el estuche comercial Warmstart colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA) (NEB) en 20 µl de volumen final. La RT-LAMP tenía como diana el gen N del SARS-CoV-2. Las muestras negativas para este virus se muestran en color rosa y las muestras positivas se visualizan por un cambio de color de rosa a amarillo. Los amplicones producto de la reacción de amplificación fueron resueltos en un gel de agarosa al 2 % y teñidos con SYBR Safe (Invitrogen). Se muestra el patrón típico de amplificación de la técnica RT-LAMP en muestras positivas y el cambio de color en la reacción; en muestras negativas, la mezcla reactiva permanece de color rosa y no se observan bandas en el gel electroforético. CP: fragmento sintético del gen N del SARS-CoV-2. CN: reacciones incubadas con agua de grado para biología molecular en lugar de muestras de hisopado.

Los métodos de diagnóstico rápido y a gran escala son necesarios para prevenir y contrarrestar la propagación, no solo del SARS-CoV-2 en esta pandemia, sino también de brotes por otros agentes emergentes y reemergentes. En estos casos, pruebas como la LAMP se convierten en alternativas viables para apoyar el diagnóstico molecular de patógenos en lugares apartados con poco desarrollo, en donde no es posible confirmar el diagnóstico de ciertas enfermedades y las muestras de los pacientes deben enviarse a otros laboratorios, lo cual retrasa la obtención de los resultados y, por consiguiente, el tratamiento del paciente.

Debido a su facilidad de ejecución, la RT-LAMP está siendo ampliamente usada para detectar un gran número de agentes patógenos. Algunas de las ventajas inherentes a la técnica, incluyen: a) rapidez de amplificación de ácidos nucleicos, tanto de ADN como de ARN; b) buena especificidad debido al uso de seis cebadores; y c) gran tolerancia a los inhibidores (24). En el caso específico del SARS-CoV-2, se han reportado diversos protocolos en los que se utilizan varios sets de cebadores dirigidos contra diferentes genes del genoma viral, con diversa sensibilidad y especificidad (18,19,25-27). Características como velocidad, costo, tiempo de entrega del resultado, y la simplicidad de la ejecución de la prueba y de su lectura colorimétrica hacen de la técnica molecular RT-LAMP una solución efectiva para impulsar

la capacidad de testeo, sobre todo en circunstancias como las actuales, en las cuales nuevas variantes virales con gran capacidad de transmisión están sobrepasando la capacidad de los laboratorios de referencia. Además, debido a que esta amplificación no requiere equipos sofisticados ni personal muy entrenado para su ejecución, es una excelente alternativa para implementarla en puntos estratégicos de atención en salud como aeropuertos, centros de salud locales, hospitales y otros.

La sensibilidad y especificidad de esta prueba en el diagnóstico del SARS-CoV-2 nos permite sugerirla como una alternativa viable para el diagnóstico rápido de la COVID-19.

Con relación al set de Broughton, los autores reportaron valores de sensibilidad y especificidad superiores a los reportados en el presente trabajo. Sin embargo, ellos emplearon una técnica de diagnóstico basado en el sistema CRISPR-Cas12a para detección del SARS-CoV-2. La RT-LAMP solo se usó para la amplificación inicial de la diana; la lectura o análisis de los resultados se hizo por fluorimetría, una metodología mucho más sensible en comparación con la simple inspección visual, lo que podría explicar dichos valores (18). El segundo set de cebadores validado en este estudio fue el reportado por Lalli, *et al.*, quienes, además, incluyen un protocolo para detectar el genoma del SARS-CoV-2 directamente en muestras de saliva, sin necesidad de extraer antes ARN (19). Se ha demostrado que la saliva es un biofluido mucho mejor que los lavados nasofaríngeos para diagnosticar este virus, probablemente por su estabilidad y la mayor carga viral (28).

Una potencial limitación de este trabajo es el uso de ARN como matriz de diagnóstico, lo que no siempre es posible en centros de atención con infraestructura limitada. No obstante, según otros reportes previos, es posible adaptar la extracción de ARN mediante protocolos basados en perlas magnéticas, sin necesidad de centrifugas u otros equipos complejos, lo cual permite practicar a gran escala esta técnica diagnóstica (29).

En el presente estudio, se usaron muestras sin previa extracción de ARN viral, las cuales se sometieron a altas temperaturas por un corto período, para evaluar el rendimiento de uno de los sets de cebadores, escogido de forma aleatoria (set de Broughton). El protocolo de la RT-LAMP utilizado directamente en muestras sin previa extracción de ARN, demostraron gran sensibilidad y especificidad, 0,947 y 0,88, respectivamente (figura 5) (cuadro 4).

Se evaluó la sensibilidad de la técnica RT-LAMP para la detección del SARS-CoV-2 en relación con el número de copias virales en la muestra. Para ello, los valores CT (umbral de ciclo de amplificación) obtenidos en RT-qPCR se convirtieron a números de copias a partir de una curva de calibración de PCR con el plásmido pUC RdRp-E 3180pb (este plásmido fue donado gentilmente por el Dr. Jaime Castellanos de la Universidad El Bosque, y contiene un inserto con los genes virales E y RdRP de SARS-CoV2). Se realizaron diluciones seriadas en base 10 del plásmido a partir de una concentración inicial de 10 ng/μl, obteniendo por PCR el valor CT. El número de copias inicial del plásmido se halló en función de su longitud en pares de bases (pb), concentración inicial y %G/C (50%) según la fórmula de la Figura 6. De esta manera, se relacionó CT (basado en concentración) con el número de copias. El número de copias se determinó por medio de la ecuación lineal, $Y = (-3.120X) + 40.676$, donde X es el número de copias y Y el umbral de ciclos de amplificación, para un $R^2 = 0,993$. El número de copias estará expresado en \log_{10} por volumen de muestra (figura 6).

Respecto a la sensibilidad de la prueba RT-LAMP en relación con la carga viral, se encontró que, para ambos sets de cebadores utilizados, la sensibilidad de la técnica llega a 1 con un umbral de ciclos entre 25 y 35, es decir, en muestras cuya carga viral sea superior a 13 copias/ μl y alcance las 21.130 copias/ μl . Sin embargo, la sensibilidad cae significativamente, a 0,75 en el set Broughton y a 0,50 en el de Lalli, cuando la carga viral es muy inferior a 13 copias/ μL o dicho umbral es mayor de 35.

Teniendo en cuenta la dinámica de la pandemia y la aparición de variantes con un mayor potencial de diseminación, consideramos que la prueba RT-LAMP reportada en este trabajo se convierte en una excelente alternativa para el diagnóstico del SARS-CoV-2 en Colombia, con la ventaja de poder utilizarse en territorios con escasez de recursos (sin necesidad de equipos sofisticados ni personal entrenado), así como en lugares con grandes tasas de transmisibilidad, como los aeropuertos.

Respecto a los costos, la prueba RT-LAMP es significativamente más económica que la RT-qPCR. Por muestra, la RT-LAMP tiene un costo aproximado de USD\$ 7,95 si se utiliza el ARN, valor que cae a menos de USD\$ 3,85 si se practica directamente sin extracción previa de ARN viral a partir de un hisopado nasofaríngeo. Por el contrario, la reacción de PCR en tiempo real tiene un valor en el mercado que oscila entre USD\$ 41 y USD\$ 56, un costo considerablemente más elevado que el estimado para la RT-LAMP.

Al momento del inicio de la pandemia por Covid-19, muy pocos laboratorios a nivel nacional y local cumplían con las condiciones de infraestructura y equipamiento para detectar este agente patógeno y, claramente, fueron insuficientes en el momento crítico de la pandemia cuando los casos superaban los miles por día. En la actualidad, en el departamento del Atlántico (Colombia), además de los laboratorios clínicos particulares, existen tres laboratorios públicos avalados por el Instituto Nacional de Salud para apoyar el diagnóstico del SARS-CoV-2.

El desarrollo de métodos diagnósticos de principio isotérmico sería una alternativa donde la infraestructura y la capacidad de adecuación sean limitadas. Además, pueden servir como prueba de tamizaje molecular, con la ventaja de poder llevarse a sitios con gran flujo de personas e, incluso, adaptarse rápidamente para identificar otros patógenos.

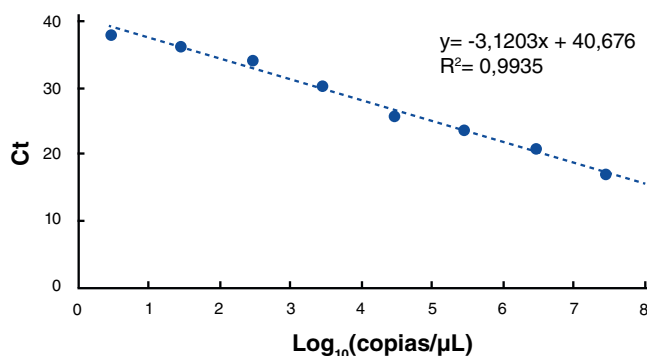


Figura 6. Curva de calibración número de copias gen E del SARS-CoV-2.

Se confirmó el número de copias encontrado a partir de la fórmula:

$$\text{Número de copias (moléculas)} = (X \text{ ng} * 6.0221 * 10^{23} \text{ moléculas/mol}) \div ((N * 660 \text{ g/mol}) * 1 * 10^9 \text{ ng/g})$$

Donde, X = concentración del amplicón (ng); N = longitud del amplicón dsDNA
660 g/mol = masa media de 1 pb de dsDNA

En conclusión, se reporta una metodología isotérmica para la amplificación del genoma del SARS-CoV-2 en muestras de hisopado nasofaríngeo con gran sensibilidad y aceptable especificidad. Esta prueba puede adaptarse y practicarse de forma rápida en instituciones con escasos recursos, para apoyar masivamente en la pandemia actual por COVID-19.

Agradecimientos

Agradecemos a la Secretaría de Salud del Distrito de Barranquilla, a la Secretaría de Salud del Departamento del Atlántico y al Instituto Nacional de Salud, por el apoyo logístico en relación con las muestras clínicas y su remisión a la Unidad de Genética y Biología Molecular de la Universidad Simón Bolívar. Agradecemos también a Ludis Oliveros, Leonardo Arrieta, Martha Guerra, Janni Gómez, Ibeth Luna, Erika Álvarez, Jhon Amador, Bryan Sarria y Roberto Romero, personal técnico encargado del desembalaje, extracción de ARN, montaje de la PCR en tiempo real y trabajo administrativo.

Referencias

- Dong E, Du H, Gardner L. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *Lancet Infect Dis.* 2020;20:533-4. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30120-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30120-1)
- Chiem K, Morales-Vásquez D, Park JG, Platt RN, Anderson T, Walter MR, *et al.* Generation and characterization of recombinant SARS-CoV-2 expressing reporter genes. *J Virol.* 2021;95:e02209-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.02209-20>
- Jegerlehner S, Suter-Riniker F, Jent P, Bittel P, Nagler M. Diagnostic accuracy of a SARS-CoV-2 rapid antigen test in real-life clinical settings. *Int J Infect Dis.* 2021;109:118-22. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.07.010>
- Maricic T, Nickel O, Aximu-Petri A, Essel E, Gansauge M, Kanis P, *et al.* A direct RT-qPCR approach to test large numbers of individuals for SARS-CoV-2. *PLoS ONE.* 2020;15:e0244824. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244824>
- Mustafa MI, Makhawi AM. SHERLOCK and DETECTR: CRISPR-Cas systems as potential rapid diagnostic tools for emerging infectious diseases. *J Clin Microbiol.* 2021;59:e00745-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00745-20>
- Xiong D, Dai W, Gong J, Li G, Liu N, Wu W, *et al.* Rapid detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas12a. *PLOS Biol.* 2020;18:e3000978. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000978>
- Ghosh P, Chowdhury R, Hossain ME, Hossain F, Miah M, Rashid MdU, *et al.* Evaluation of recombinase-based isothermal amplification assays for point-of-need detection of SARS-CoV-2 in resource-limited settings. *Int J Infect Dis.*;114:105-11. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.11.007>
- Liang Y, Lin H, Zou L, Zhao J, Li B, Wang H, *et al.* CRISPR-Cas12a-based detection for the major SARS-CoV-2 variants of concern. *Microbiol Spectr.* 2021;9:e01017-21. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.01017-21>
- Ma L, Yin L, Li X, Chen S, Peng L, Liu G, *et al.* A smartphone-based visual biosensor for CRISPR-Cas powered SARS-CoV-2 diagnostics. *Biosens Bioelectron.* 2022;195:113646. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113646>
- Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes.* 2002;16:223-9. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415>
- Tanner NA, Zhang Y, Evans TC. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *BioTechniques.* 2015;58:59-68. <https://doi.org/10.2144/000114253>
- Lamb LE, Bartolone SN, Ward E, Chancellor MB. Rapid detection of novel coronavirus/ Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *PLoS ONE.* 2020;15:e0234682. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234682>
- Fischbach J, Xander NC, Frohme M, Glöckler JF. Shining a light on LAMP assays. A comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine. *BioTechniques.* 2015;58:189-94. <https://doi.org/10.2144/000114275>

14. Park GS, Ku K, Baek SH, Kim SJ, Kim SI, Kim BT, *et al.* Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays targeting severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *J Mol Diagn.* 2020;22:729-35. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.03.006>
15. Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:63e-63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
16. Aliotta JM, Pelletier JJ, Ware JL, Moran LS, Benner JS, Kong H. Thermostable Bst DNA polymerase I lacks a 3'→5' proofreading exonuclease activity. *Genet Anal Biomol Eng.* 1996;12:185-95. [https://doi.org/10.1016/S1050-3862\(96\)80005-2](https://doi.org/10.1016/S1050-3862(96)80005-2)
17. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance.* 2020;25:2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
18. Broughton JP, Deng X, Yu G, Fasching CL, Servellita V, Singh J, *et al.* CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol.* 2020;38:870-4. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0513-4>
19. Lalli MA, Langmade JS, Chen X, Fronick CC, Sawyer CS, Burcea LC, *et al.* Rapid and extraction-free detection of SARS-CoV-2 from saliva by colorimetric reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification. *Clin Chem.* 2021;67:415-24. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa267>
20. Aranha C, Patel V, Bhor V, Gogoi D. Cycle threshold values in RT-PCR to determine dynamics of SARS-CoV-2 viral load: An approach to reduce the isolation period for COVID-19 patients. *J Med Virol.* 2021;93:6794-7. <https://doi.org/10.1002/jmv.27206>
21. Soni S, Salhotra A, Suar M. Handbook of research on diverse applications of nanotechnology in biomedicine, chemistry, and engineering. Hershey, PA: Engineering Science Reference; 2015. p. 820.
22. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977;33:159-74. <https://doi.org/10.2307/2529310>
23. Wei S, Kohl E, Djandji A, Morgan S, Whittier S, Mansukhani M, *et al.* Direct diagnostic testing of SARS-CoV-2 without the need for prior RNA extraction. *Sci Rep.* 2021;11:2402. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81487-y>
24. Francois P, Tangomo M, Hibbs J, Bonetti EJ, Boehme CC, Notomi T, *et al.* Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011;62:41-8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00785.x>
25. Zhang Y, Odiwuor N, Xiong J, Sun L, Nyaruaba RO, Wei H, *et al.* Rapid molecular detection of SARS-CoV-2 (COVID-19) virus RNA using colorimetric LAMP. *medRxiv.* 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.02.26.20028373>
26. Dao Thi VL, Herbst K, Boerner K, Meurer M, Kremer LP, Kirrmaier D, *et al.* A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples. *Sci Transl Med.* 2020;12:eabc7075. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abc7075>
27. Flynn MJ, Snitser O, Flynn J, Green S, Yelin I, Szwarcwort-Cohen M, *et al.* A simple direct RT-LAMP SARS-CoV-2 saliva diagnostic. *medRxiv.* 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.11.19.20234948>
28. Savela ES, Vilorio Winnett A, Romano AE, Porter MK, Shelby N, Akana R, *et al.* Quantitative SARS-CoV-2 viral-load curves in paired saliva samples and nasal swabs inform appropriate respiratory sampling site and analytical test sensitivity required for earliest viral detection. *J Clin Microbiol.* 2022;60:e01785-21. <https://doi.org/10.1128/jcm.01785-21>
29. Klein S, Müller TG, Khalid D, Sonntag-Buck V, Heuser AM, Glass B, *et al.* SARS-CoV-2 RNA extraction using magnetic beads for rapid large-scale testing by RT-qPCR and RT-LAMP. *Viruses.* 2020;12:863. <https://doi.org/10.3390/v12080863>

Brief communication

Incidence of acute respiratory symptoms and COVID-19 infection in children in public schools in Bogotá, Colombia, from July to November, 2020

José Moreno-Montoya¹, Diana Benavides-Arias², Luz Amparo Pérez³, Jennifer Ruiz⁴, Deidamia García⁵, Iván Osejo⁶, Edwin A. Ussa^{7,8,9}, Camilo Pino¹⁰, Fernando Pío de La Hoz²

¹ Subdirección de Estudios Clínicos, Fundación Santa Fe de Bogotá, Bogotá, D.C., Colombia

² Departamento de Salud Pública, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

³ Departamento de Psicología, Universidad Nacional de Colombia Bogotá, D.C., Colombia

⁴ Subsecretaría de Gestión Institucional, Secretaría de Educación Distrital, Bogotá, D.C., Colombia

⁵ Subsecretaría de Integración Interinstitucional, Secretaría de Educación Distrital, Bogotá, D.C., Colombia

⁶ Dirección de Bienestar Estudiantil, Secretaría de Educación Distrital, Bogotá, D.C., Colombia

⁷ Laboratorio de Zoología y Ecología Acuática LaZoea, Universidad de los Andes, Bogotá, D.C., Colombia

⁸ Grupo de Investigación en Artrópodos Kumangui, Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá, D.C., Colombia

⁹ Dirección de Participación y Relaciones Interinstitucionales, Secretaría de Educación Distrital, Bogotá, D.C., Colombia

¹⁰ Laboratorio de Investigación en Sistemas Inteligentes, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

Introduction: More than 90% of children infected with COVID-19 worldwide developed mild to moderate disease. In Colombia, during 2020, COVID-19 infections in children stayed below 9.2% of the total cases, with no trends for age group or sex.

Objective: To estimate the incidence of acute respiratory symptoms and COVID-19 in children from public schools in Bogotá, Colombia during the second semester of 2020.

Material and methods: A telephone survey was conducted in over 5,000 scholar children. Antecedents and use of health services were informed. Descriptive statistics were used.

Results: A total of 151.470 persons per day accounting for an IR of 157,8 per 100,000 people; almost three times the rate reported by the official surveillance system in the city.

Conclusion: A lack of diagnosis and consultation in children was found compared to the general population. Further research is needed to elucidate the true burden of the disease in children.

Keywords: Coronavirus infections; respiratory tract infections; communicable diseases; epidemiology; surveillance; adolescent; child.

Incidencia de síntomas respiratorios agudos y COVID-19 en niños de escuelas públicas de Bogotá, Colombia, entre julio y noviembre de 2020

Introducción. Más del 90% de los niños infectados con COVID-19 en el mundo, desarrollaron enfermedad leve a moderada. En Colombia, durante el 2020, la infección del COVID-19 en niños se mantuvo por debajo de 9,2 % del total de los casos sin tendencias por grupo de edad o sexo.

Objetivo. Estimar la incidencia de síntomas respiratorios agudos y COVID19 en niños de escuelas públicas en Bogotá (Colombia) durante el segundo semestre de 2020.

Materiales y métodos. Se hizo una encuesta telefónica en más de 5.000 escolares. Se recolectó información de antecedentes médicos y uso de servicios de salud. La información obtenida se describió mediante estadística descriptiva.

Resultados. Se contabilizó un total de 151.470 personas al día para una tasa de incidencia de 157,8 en 100.000 personas, casi tres veces la tasa reportada por el sistema de vigilancia oficial de la ciudad.

Conclusión. Se encontraron deficiencias en el diagnóstico y consulta de los niños, al compararlos con la población general. Se necesita más investigación para dilucidar la verdadera carga de la enfermedad en la población infantil.

Palabras clave: infecciones por coronavirus; infecciones del sistema respiratorio; enfermedades transmisibles; epidemiología; vigilancia; adolescente; niño.

Received: 15/06/2021

Accepted: 25/11/2021

Published: 15/12/2021

Citation:

Moreno-Montoya J, Benavides-Arias D, Pérez LA, Ruiz J, García D, Osejo I, *et al.* Incidence of acute respiratory symptoms and COVID-19 infection in children in public schools in Bogotá, Colombia, from July to November, 2020. *Biomédica.* 2022;42(Supl.2):73-7.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.6166>

Corresponding author:

José Moreno-Montoya, Subdirección de Estudios Clínicos, Fundación Santa Fe de Bogotá, Bogotá, D.C., Colombia

Phone number: (+57) (320) 484 7588
josemoremomontoya@gmail.com

Author contributions:

José Moreno-Montoya, Diana Benavides-Arias y Fernando de La Hoz: conception and design of the article

Jennifer Ruiz, Deidamia García, Iván Osejo and Edwin Ussa: Collection of data

All authors participated in data analysis and discussion.

Funding:

The data of the article were collected within the framework of the inter-administrative agreement 1603740 of the year 2020 signed between the *Universidad Nacional de Colombia* and the *Secretaría de Educación del Distrito*, with funds from the two institutions.

Conflicts of interest:

None declared.

Introduction

It is estimated that children accounted for up to 15,7% of the total of COVID-19 infections around the world, with more than 90% of them developing mild to moderate symptoms (1). In Colombia, during 2020, COVID-19 infections stayed below 9,2% of the total cases, with no trends by age group or sex. Mild, and asymptomatic cases contributed to 96,2% of the infections, with a death proportion of 0,16% (2).

Despite this, SARS-CoV-2 infection seems to be less frequent and severe in children (3). Actions designed to control its transmission have required radical changes in children's normal lifestyles, including temporary shutdown of schools. However, it is partially unknown to what extent closing schools has protected children, since there is no specific data of its prevalence in this population, and national figures are based on general-population-based studies, especially in developing countries (4).

Here, we describe the incidence of COVID-19 infection in children enrolled in the public education system of Bogota, a large metropolitan area in Latin America (5), that closed schools in March, 2020.

Materials and methods

Bogotá is the capital and major city of Colombia, with an estimated population above 7 million inhabitants, of which 31% are under 18 years of age (6).

Telephone surveys were conducted between August 11 and November 30, 2020, in a fully random sample without replacement of students enrolled in Bogotá's public education system, which serves a population exceeding 800,000 students, and 62% of the city's total scholar population. According to official figures, 10% attended preschool, 44% primary school, 30% secondary school, and 7% adult programs. Of all scholars, 51,52% were females. In the public school system in Bogotá, 87,8% of the students come from low or middle-low income groups (7). The population included in this study was not selected by any specific criteria. Therefore, any child ascribed to the public education system could be part of the sample.

An expected sample of $n=4.784$ students was estimated (maximum error=0,03, prevalence=0,5) using as sampling frame the total official list of children ascribed to public schools in the city in January 2020. It was expected that more than 99% of the students or caregivers in Bogotá have an active phone line at the time of this study (5). The survey was part of routine promotion activities conducted by *Secretaría de Educación de Bogotá*, which includes activities for health promotion and disease prevention, academic remote assistance for students, and virtual meetings with parents and caregivers (5). Therefore, ethical committee approval was not required, though verbal consent was obtained from caretakers.

We obtained information about the clinical history of respiratory symptoms, use of health services, COVID-19 diagnosis in the last month, age, gender, and history of known household contacts with COVID-19 cases or deaths. No active surveillance was carried out, so children were only interviewed as ordered by their insurer. All the information was consolidated in an anonymized database. For children under 12 years old, responses were given by the caregiver or parent registered in the database. Children over 12 years old, answered the interview personally but were assisted by their parents in all cases.

Table 1. Symptoms and Covid-19 incidence

Symptoms ^a	Under 14 years old N=3674 (n) %	14+ years old N= 1375 (n) %	Total (P value)
Last month respiratory symptoms	182 (4.95)	57 (4.14)	4.73% (0.25)
In symptomatic children: Last month medical consultation from respiratory symptoms /people who attended medical consultation last month.	34/182 (18,68)	11/57 (19,29)	18.82% (0.93)
In symptomatic children: COVID-19 tests	15/182 (8.24%)	9/57 (15.79%)	10.04% (0.14)
Children with symptoms last month	n=182	n=57	n=239
Cough	14	1	
Fever	4	1	
Nasal congestion	19	7	
Respiratory distress	17	7	
Chest pain	1	2	
General discomfort	4	2	
Excessive tiredness	1	2	
Has had any contact with a COVID-19 patient?	229/3674 (6.23%)	92/1375 (6.69%)	6.35% (0.57)
If yes, the child was tested?	78/229 (34.06%)	40/92 (43.47%)	36.76% (0.28)
Does the child live with some COVID-19 patient?	176/3674 (4.79%)	63/1375 (4.65%)	5.75% (0.84)
If yes, the child was tested?	72/176 (40.9%)	30/63 (46.87%)	42.67% (0.56)
Somebody in your family has died from COVID-19?	114/3674 (3.1%)	33/1375 (2.4%)	2.91% (0.19)
COVID-19 Tests (Total)	151/3674 (4.1%)	88/1375 (6.4%)	4.73% (0.01)
Positives	37/151 (24.5%)	23/88 (26.13%)	25.1% (0.82)

^a Not all the respondents answered the symptoms questions and those who answered could choose one or more options.

Incidence rates (IR) of COVID-19-like illness and confirmed cases per child per day were estimated during the period between July 12 to November 30, 2020. To obtain the IR denominator, we assumed that every participant in the sample contributed during 30 days of observation and, subsequently, that number was added for each student interviewed, yielding 151.470 person days of follow-up. Thus, every person/caregiver was asked to provide information regarding respiratory symptoms or COVID-19 confirmed infection during the last 30 days prior to the interview. Also, Bogota's IR for COVID-19 confirmed cases was estimated using data from the city's surveillance system. There were 1,486,719 people from 3 to 17 years old living in Bogota during the 111 days of the study period, yielding 165,025,809 persons days of follow-up. Confidence intervals (CI_{95%}) were estimated using a Poisson approximation to the normal distribution.

Results

A total of 5.049 students were included in the sample (the excluding rate was lower than 20%, which included wrong registered numbers. No other additional information was provided regarding exclusion criteria). The ages ranged from 3 to 17 years old (average=10,56 years; CI_{95%} 10,51–10,61), being around 50,58% males.

Acute respiratory symptoms presented during the last month were reported by 239 participants, resulting in an IR of 157,8 cases per 105 person-days (CI_{95%} 138,4–179,1). Forty-five (18,81%) individuals attended health services, and 18,82% of the children who seemed to be ill, searched for medical assistance (Table 1). In total, 239 children underwent molecular assays for

COVID-19 infection detection. Reasons for being tested included: having a confirmed case of a household contact (n=118), being symptomatic (n=24), and for unknown reasons (n=97). Sixty out of 239 (25,1%, CI_{95%} 19,74-31,52%) resulted positive which yielded an IR of 39,61 cases per 105 person-days (CI_{95%} 30,23-50,99 per 105 person-days). Testing was performed by the surveillance system of the *Secretaría de Salud de Bogotá*.

Table 2 shows acute respiratory disease and COVID-19 monthly incidents in children. No severe infections, hospitalization, or deaths were reported. In Bogota, the surveillance system detected 24,878 cases for the same age group during the study period (IR: 15,1 cases per 105 person-days, CI_{95%} 14,89-15,26 per 105 person-days) which was 61,87% lower than the estimated value from the survey.

Discussion

This is one of the few studies, if any, reporting the incidence of COVID-19 in children using a population-based survey. The main finding is that children and adolescents staying home because of school closures are not at zero risk of acquiring COVID-19 infection. The incidence was 2,62 times bigger than the value reported by the city's surveillance system for general population in the same group age and period.

These results raise the question of the effectiveness of school closure to protect children from COVID-19 infection and highlights the need for surveillance studies regarding other related problems derived from this measure such as mental health, decrease in physical activity, dietary changes, and social performance difficulties (8).

On the other hand, it showed a potential important underestimation of COVID-19 infection among children and adolescents in Colombia, given the low number of people who were tested even being symptomatic (24/239: 10,04%). Likewise, only 42.67% of children living with COVID-19 positive adults underwent molecular detection, adding-up to the underestimation proportion.

Besides this, unexplored barriers to access to health services and molecular testing contributes substantially to underrating (5). These findings could be associated with the fact that during pandemics, the screening efforts were concentrated on elderly, and morbid people. In addition, underrepresented minorities, immigrants, and low-income families could have been disproportionately affected by COVID-19 pandemics, worsening living and health conditions of school-age children (9).

Table 2. Monthly incidence of ARS and COVID-19 among children during the period July and November 2020 per 105 persons day.

Month	Cases ARS	Cases COVID-19	Persons at risk	IR-ARS*	IR-COVID-19**	n
July	35	1	17580	199.09	5.69	586
August	75	8	51810	144.76	15.44	1727
September	145	24	79920	181.43	30.03	2664
October	196	34	113940	172.02	29.84	3798
November	239	60	151470	157.79	39.61	5049

* Incidence rate of Acute Respiratory Symptoms

** Incidence rate COVID-19

No severe disease was reported in our survey, which is consistent with low risk of complications reported for this age group by global literature. However, despite that in children the infection is milder, the prognosis is better, and the mortality rate is lower compared to adult patients, children are potential carriers that could easily transmit the infection among the entire population. Regarding the above, in age groups below and above 14 years old, the positivity proportion of COVID-19 tests were similar, alike as the number of children living with somebody diagnosed for COVID-19.

However, the proportion of tests performed for each group was different, revealing different levels of prioritization during the surveillance, when the role of the children regarding transmission was not completely clarified. This reinforces the importance of early identification and intervention of COVID-19 in pediatric patients to control the pandemic, with further screening for other symptoms, such as gastrointestinal or psychological ones, which are common among children.

Further research is needed to elucidate the true burden of disease among children and the extent of the damage associated with school closures and lockdown measures, aimed to control the spread of the SARS-Cov-2 virus. New public health strategies for diagnosing and reducing its transmission in children and adolescents are required in order to diminish the potential risk of infection underestimated in this population, as well as to prevent collateral damages in other populations at risk. In addition to the demands of homeschooling, families in Bogotá need to be taught to meet the additional, and often complex educational and medical requirements of their children regarding the new normality in pandemic times.

References

1. Bhuiyan MU, Stiboy E, Hassan Z, Chan M, Islam S, Haider N, *et al.* Epidemiology of COVID-19 infection in young children under five years: A systematic review and meta-analysis. *Vaccine*. 2021;39:667-77. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.11.078>
2. Bolaños-Almeida CE, Espitia-Segura OM. Clinical and epidemiologic analysis of COVID-19 children cases in Colombia PEDIACOVID. *Pediatr Infect Dis J*. 2021;40:e7-e11. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000002952>
3. Masih M, Moll S, Raza N. Paediatric case of prolonged COVID-19 manifesting as PMIS-TS and atypical Kawasaki. *BMJ Case Rep*. 2020;13:e237194. <https://doi.org/10.1136/bcr-2020-237194>
4. Riphagen S, Gómez X, González-Martínez C, Wilkinson N, Theocharis P. Hyperinflammatory shock in children during COVID-19 pandemic. *Lancet*. 2020;395:1607-8. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31094-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31094-1)
5. Secretaría de Educación de Distrito. La educación en primer lugar. Eventual reapertura segura y progresiva del sistema educativo en Bogotá D.C. Informe de avances y análisis para la toma de decisiones. Bogotá, D.C.: Secretaría de Educación de Distrito; 2020.
6. Departamento Administrativo Nacional de Estadística. Censo Nacional de Población y Vivienda 2018, Colombia. Cuántos somos. Bogotá, D.C.: DANE; 2018.
7. Secretaría de Educación de Distrito. Caracterización del sector educativo año 2017. Bogotá, D.C.: Secretaría de Educación de Distrito; 2017.
8. Myhr A, Naper LR, Samarawickrema I, Vesterbekkmo RK. Impact of COVID-19 pandemic lockdown on mental well-being of Norwegian adolescents during the first wave- socioeconomic position and gender differences. *Front Public Health*. 2021;9:717747. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.717747>
9. Vilar-Compte M, Gaitán-Rossi P, Félix-Beltrán L, Bustamante AV. "Pre-COVID-19 social determinants of health among Mexican migrants in Los Angeles and New York City and their increased vulnerability to unfavorable health outcomes during the COVID-19 pandemic. *J Immigr Minor Health*. 2021;1-13. <https://doi.org/10.1007/s10903-021-01283-8>

Revisión de tema

Controversias en neuroinmunología: esclerosis múltiple, vacunación, SARS-CoV-2 y otros dilemas

Saúl Reyes-Niño¹, Jaime Eduardo Rodríguez-Orozco², Habib Georges Moutran-Barroso², Hellen Kreinter-Rosembaun², Mariana Gaviria-Carrillo³, Vanessa Salej-Durán², Julián Mancera-Charry², Ana Claudia Villegas², David Cuéllar-Giraldo², Juan Sebastián Torres-Sandoval², Ángela Gómez-Mazuera¹, Aristides Duque-Samper¹, Jaime Toro-Gómez¹

¹ Departamento de Neurología, Fundación Santa Fe de Bogotá, Bogotá, D.C., Colombia

² Programa de Residente en Neurología Clínica, Universidad El Bosque, Bogotá, D.C., Colombia

³ Grupo NeURos, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Bogotá, D.C., Colombia

La neuroinmunología es una disciplina que cada vez amplía más sus horizontes en la comprensión de las enfermedades neurológicas. Contemporáneamente, y a la luz de los nexos fisiopatológicos de las enfermedades neurológicas y la inmunología, se han planteado enfoques diagnósticos y terapéuticos específicos. A pesar de los importantes avances de esta disciplina, existen múltiples dilemas que le conciernen y se filtran en la práctica clínica.

En esta revisión, se presentan y discuten 15 controversias, las cuales se construyen con la información clínica disponible más actualizada. Los temas incluidos son: disminución de esteroides en recaídas de esclerosis múltiple; recomendaciones terapéuticas en esclerosis múltiple a la luz de la pandemia por el SARS-CoV-2; evidencia de vacunación en esclerosis múltiple y en otras enfermedades desmielinizantes; panorama actual del síndrome clínico y radiológico aislado; y fallas terapéuticas en esclerosis múltiple; además, criterios para suspender las terapias modificadoras de la enfermedad; evidencia del manejo en recaídas leves; recomendaciones para la profilaxis contra *Strongyloides stercoralis*; utilidad de un segundo ciclo de inmunoglobulina en el síndrome de Guillain-Barré; criterios para diferenciar una polineuropatía crónica desmielinizante inflamatoria de inicio agudo de un síndrome de Guillain-Barré y, utilidad de la enzima convertidora de angiotensina en neurosarcoidosis. En cada una de las controversias, se presenta la problemática general y se ofrecen recomendaciones específicas que pueden adoptarse en la práctica clínica diaria.

Palabras clave: esclerosis múltiple; síndrome de Guillain-Barré; coronavirus; polirradiculoneuropatía crónica inflamatoria desmielinizante; sarcoidosis; vacunas; natalizumab

Controversies in neuroimmunology: multiple sclerosis, vaccination, SARS-CoV-2 and other dilemas

Neuroimmunology is a discipline that increasingly broadens its horizons in the understanding of neurological diseases. At the same time, and in front of the pathophysiological links of neurological diseases and immunology, specific diagnostic and therapeutic approaches have been proposed. Despite the important advances in this discipline, there are multiple dilemmas that concern and filter into clinical practice. This article presents 15 controversies and a discussion about them, which are built with the most up-to-date evidence available. The topics included in this review are: steroid decline in relapses of multiple sclerosis; therapeutic recommendations in MS in light of the SARS-CoV-2 pandemic; evidence of vaccination in multiple sclerosis and other demyelinating diseases; overview current situation of isolated clinical and radiological syndrome; therapeutic failure in multiple sclerosis, as well as criteria for suspension of disease-modifying therapies; evidence of the management of mild relapses in multiple sclerosis; recommendations for prophylaxis against *Strongyloides stercoralis*; usefulness of a second course of immunoglobulin in the Guillain-Barré syndrome; criteria to differentiate an acute-onset inflammatory demyelinating chronic polyneuropathy versus Guillain-Barré syndrome; and, the utility of angiotensin-converting enzyme in neurosarcoidosis. In each of the controversies, the general problem is presented, and specific recommendations are offered that can be adopted in daily clinical practice.

Keywords: Multiple sclerosis; Guillain-Barré syndrome; coronavirus; polyradiculoneuropathy, chronic inflammatory demyelinating; sarcoidosis; vaccines; natalizumab.

Recibido: 30/10/2021

Aceptado: 03/08/2022

Publicado: 09/08/2022

Citación:

Reyes-Niño S, Rodríguez-Orozco JE, Moutran Barroso HG, Kreinter-Rosembaun H, Gaviria-Carrillo M, Salej-Durán V, et al. Controversias en neuroinmunología: esclerosis múltiple, vacunación, SARS-CoV-2 y otros dilemas. Biomédica. 2022;42(Supl.2):78-99.
<https://doi.org/10.7705/biomedica.6366>

Correspondencia:

Habib Georges Moutran-Barroso, Calle 131A N° 9-20, Bogotá, D. C., Colombia
Teléfono: (57) (300) 457 6872
moutranhabib@gmail.com

Contribución de los autores:

Saúl Reyes-Niño, Jaime Eduardo Rodríguez-Orozco, Habib Georges Moutran-Barroso, Hellen Kreinter-Rosembaun, Mariana Gaviria-Carrillo, Vanessa Salej-Durán, Julián Mancera-Charry, Ana Claudia Villegas, David Cuéllar-Giraldo y Juan Sebastián Torres-Sandoval: escritura, asesoría y diseño
Ángela Gómez-Mazuera, Aristides Duque-Samper y Jaime Toro-Gómez: asesoría y diseño

Financiación:

Este trabajo no recibió ninguna subvención específica de agencias de financiamiento en los sectores público, comercial o sin fines de lucro.

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Controversias en Neuroinmunología

En los pacientes con esclerosis múltiple que presentan recaídas y han recibido pulsos intravenosos de metilprednisolona, ¿se deben disminuir gradualmente los esteroides?

En el estudio ONTT se demostró un beneficio en la disminución de los esteroides en un primer episodio de neuritis óptica.

En este estudio, aleatorizado, controlado y doble ciego, se incluyeron pacientes entre los 18 y los 46 años con un primer episodio de neuritis óptica, y se distribuyeron en tres grupos con el fin de evaluar los resultados en la visión: el grupo 1, con 250 mg de metilprednisolona intravenosa cada 6 horas por 3 días más 1 mg/kg/día de prednisolona oral por 11 días; el grupo 2, con 1 mg/kg/día de prednisolona oral por 14 días, y el grupo 3, con placebo.

Los sujetos del grupo 1 presentaron una recuperación más rápida en los campos visuales y la visión de contraste, en comparación con los grupos 2 y 3. Teniendo en cuenta lo anterior, aquellos pacientes que presentan neuritis óptica como primer síndrome clínico de la esclerosis múltiple, deberían recibir metilprednisolona intravenosa seguida de prednisolona oral, con el fin de acelerar la recuperación de la visión (1).

En contraste, para los pacientes que ya tienen diagnóstico de esclerosis múltiple y sufren una recaída clínica, los datos disponibles hasta el momento han demostrado que la disminución del esteroide oral después de la metilprednisolona intravenosa no mejora la discapacidad ni acelera la recuperación. Por esta razón, en estos casos, los esteroides orales no producen ningún beneficio adicional después de los pulsos de metilprednisolona (2).

Además, la metilprednisolona intravenosa durante las recaídas de la esclerosis múltiple no genera una supresión permanente del eje hipotálamo-hipófiso-suprarrenal. Levic, *et al.*, lograron demostrar que los pacientes con una dosis de 1 gramo diario durante siete días presentan una supresión transitoria del eje, el cual logra recuperarse de forma espontánea después de los pulsos sin necesidad de tratamientos adicionales. Por esta razón, no son necesarios los esteroides orales suplementarios (3).

¿Cuáles son las terapias modificadoras de la enfermedad que se asocian con mayor gravedad de la COVID-19? ¿Se deberían evitar o suspender?

Con el inicio de la pandemia por COVID-19, comenzaron a surgir varios interrogantes en relación con las terapias modificadoras de la enfermedad para la esclerosis múltiple.

En primer lugar, despertaba preocupación el hecho de que algunas de ellas (por ejemplo, alemtuzumab y ocrelizumab) producen linfopenia como un efecto particular. Además, los tratamientos que se administran por vía intravenosa implican el desplazamiento frecuente de los pacientes a los centros de salud, lo cual aumenta potencialmente su exposición y el riesgo de contagio. De forma similar, algunos de los tratamientos requieren un control frecuente con pruebas séricas que también implican asistir con frecuencia a los centros de salud.

En respuesta a la creciente incertidumbre, se establecieron varios registros poblacionales a nivel global, de los cuales surgen los datos con los que contamos hasta la fecha.

En abril de 2020, Sormani, *et al.*, publicaron su experiencia con el registro poblacional italiano MuSC-19. Este incluyó 784 pacientes con esclerosis múltiple y fuerte sospecha diagnóstica o diagnóstico definitivo de COVID-19. El resultado primario evaluado fue la gravedad de la COVID-19, demostrada por uno o más de los siguientes factores: muerte, necesidad de traslado a la unidad de cuidados intensivos, neumonía u hospitalización.

Entre los hallazgos más significativos, las terapias anti-CD20 (ocrelizumab y rituximab) se asociaron con un mayor riesgo de gravedad de la COVID-19 (OR=2,59; IC_{95%} 1,43-4,67; p<0,001). Además, se identificaron como factores de riesgo para enfermedad grave: la edad (OR=1,06; IC_{95%} 1,03-1,08; p<0,001), la forma progresiva de la enfermedad (OR=2,07; IC_{95%} 1,22-3,50; p<0,001) y el uso reciente (en el último mes) de metilprednisolona (OR=6,03; IC_{95%} 2,2-6,54; p<0,001) (4).

Posteriormente, Louapre, *et al.*, publicaron un estudio retrospectivo de cohorte realizado a partir del registro francés COVISEP, en el cual se incluyeron 347 pacientes con esclerosis múltiple y fuerte sospecha diagnóstica o diagnóstico definitivo de COVID-19.

Para evaluar el resultado primario de gravedad de la COVID-19, diseñaron una escala ordinal de 1 a 7, en la cual 1 correspondía a “no hospitalizado, no limitación funcional”, y 7, a “muerte”. Establecieron un punto de corte de 3 que significaba “hospitalizado sin necesidad de oxígeno suplementario”.

Los resultados no mostraron asociación de ninguna terapia en particular con una mayor gravedad de la COVID-19. De hecho, los pacientes que no recibían terapias modificadoras de la enfermedad tuvieron peores resultados (incluyendo mortalidad), en comparación con aquellos que sí recibían tratamiento (46,0 Vs. 15,5 %; p<0,001). Además, se encontró que la edad (OR=1,9; IC_{95%} 1,4-2,5), la escala EDSS (OR=6,3; IC_{95%} 2,8-14,4) y la obesidad (OR=3,0; IC_{95%} 1,0-8,7), eran factores de riesgo independientes para un puntaje de gravedad de la COVID-19 de 3 o más (5).

Durante la octava asamblea virtual de la ACTRIMS-ECTRIMS, se publicaron los datos preliminares obtenidos a partir del *MS Global Data Sharing Initiative*: un canal de recolección y unificación de datos, en el cual participan actualmente hasta 23 registros poblacionales a nivel global. Se tomaron datos de 1.540 pacientes con esclerosis múltiple, con sospecha diagnóstica o con diagnóstico confirmado de COVID-19.

En este estudio se confirmaron algunos hallazgos de los estudios previos: la edad avanzada, ser hombre, la discapacidad y la forma progresiva de la enfermedad, se asociaron con peores consecuencias de la COVID-19. Además, se concluyó que las terapias modificadoras de la enfermedad anti-CD20, particularmente rituximab y en menor medida ocrelizumab, se asociaron con peores consecuencias para COVID-19.

El rituximab se asoció de forma estadísticamente significativa con mayor frecuencia de hospitalizaciones, ingreso en la unidad de cuidados intensivos y mayor necesidad de asistencia respiratoria mecánica. El ocrelizumab no alcanzó significancia estadística para admisión hospitalaria o asistencia respiratoria, pero sí para admisión en la unidad de cuidados intensivos. Ninguno de los dos medicamentos anti-CD20 se asoció con muerte o comorbilidades (6).

Recientemente, en un panel internacional de expertos, se publicó una serie de recomendaciones sobre las terapias modificadoras de la enfermedad durante la pandemia y después de ella (7).

Estas recomendaciones se basaron en la mejor información disponible hasta el momento y se adoptan para los fines de este manuscrito:

- a. cualquier decisión de iniciar o administrar una terapia modificadora de la enfermedad debe evaluarse a la luz del estado epidemiológico local de la pandemia y las características individuales del paciente;
- b. los interferones, el acetato de glatiramer y la teriflunomida, se pueden prescribir de forma usual durante la pandemia;
- c. se recomienda la administración de natalizumab en esquema de dosis extendida (cada 5 a 6 semanas), para disminuir el número de viajes a los centros de infusión y, potencialmente, mitigar el riesgo de exposición al SARS-CoV-2;
- d. el dimetil fumarato, el fingolimod y la cladribina también pueden prescribirse de forma usual durante la pandemia, pero, si el paciente está gravemente linfopénico por efecto de la medicación, se recomienda ser particularmente cuidadoso con las medidas de protección para evitar el contagio;
- e. las terapias anti-CD20 pueden ofrecerse a pacientes con esclerosis múltiple muy activa, siguiendo estrictas medidas de prevención contra el contagio; sin embargo, puede considerarse otra de estas terapias modificadoras muy efectiva con un perfil más favorable en términos de consecuencias de la COVID-19;
- f. el alemtuzumab puede ofrecerse a pacientes con esclerosis múltiple muy activa y se deben considerar estrictas medidas de prevención contra el contagio en aquellos sujetos con linfopenia. Sin embargo, puede considerarse otra terapia modificadora muy efectiva con un perfil mejor establecido en términos de consecuencias de la COVID-19;
- g. no se recomiendan terapias de reconstitución inmunológica como la mitoxantrona y el trasplante de células madre hematopoyéticas cuando el riesgo de COVID-19 es grande.

¿Las terapias modificadoras de la enfermedad alteran la eficacia de las vacunas?

Algunas de estas terapias pueden influir en la respuesta inmunológica a las inmunizaciones (8,9). Hasta la fecha, no se han notificado problemas de eficacia para el interferón, el dimetil fumarato o la teriflunomida, en relación con las vacunas en general (8,10-12).

Para el acetato de glatiramer y el natalizumab, la información disponible es menos concluyente; algunos estudios demuestran que la vacuna inactivada contra la influenza puede ser menos efectiva en pacientes con esclerosis múltiple que utilizan estas terapias modificadoras de la enfermedad (8). Se ha descrito una respuesta inmunológica reducida a algunas vacunas en pacientes tratados con moduladores del esfingosina-1-fosfato, como lo son el fingolimod y el siponimod (13,14). También, se ha documentado una respuesta humoral reducida a las vacunas, pero no ausente, en pacientes tratados con ocrelizumab (15).

Finalmente, aquellos en tratamiento de reconstitución inmunológica (alemtuzumab, cladribina o trasplante de células madre hematopoyéticas) que

han reconstituido su sistema inmunológico, deberían poder reaccionar a las vacunas, teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

La vacunación dentro de los primeros seis meses de tratamiento con alemtuzumab puede resultar en una menor proporción de casos que responden (16).

Datos de los estudios MAGNIFY-MS y CLOCK-MS sugieren que los pacientes que reciben cladribina pueden generar respuestas a las vacunas contra la influenza y la varicela-zóster, independientemente del recuento de linfocitos (17).

Una proporción sustancial de pacientes que han recibido trasplante de células madre hematopoyéticas, pueden responder a las vacunas desde los tres meses de instaurado el tratamiento (18).

¿Qué tan temprano se debe empezar a considerar una falla terapéutica en pacientes con esclerosis múltiple que han iniciado recientemente una terapia modificadora de la enfermedad?

Uno de los principales objetivos terapéuticos en la esclerosis múltiple es controlar la actividad de la enfermedad y retrasar su progresión.

La definición de falla terapéutica en esclerosis múltiple, en particular aquella utilizada en las pruebas clínicas, ha sido criticada por los cortos tiempos en que se evalúa la reacción a la terapia modificadora de la enfermedad. En general, el tiempo mínimo para empezar a pensar en falla terapéutica es de seis meses después de iniciar dicha terapia (19).

Sin embargo, esta definición carece de especificidad y no refleja el tiempo de inicio de acción de todos los fármacos usados en esta enfermedad. La adopción de un periodo estándar de seis meses para evaluar la respuesta a la terapia modificadora de la enfermedad, podría afectar la toma de decisiones e impactar sobre las consecuencias clínicas de los pacientes con esclerosis múltiple a largo plazo (20).

Se hace imperativo, entonces, estar familiarizado con los tiempos adecuados para solicitar estudios de imágenes diagnósticas de control en aquellos pacientes que recientemente han iniciado una terapia modificadora de la enfermedad.

El primer examen de imágenes después de iniciarla, se practica usualmente dentro de los primeros 3 a 6 meses, teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

- a. La aparición de nuevas lesiones en T2 que no se realzan con el medio de contraste en comparación con la resonancia magnética (RM) previa al inicio del medicamento, no necesariamente refleja falla del tratamiento, pues estas lesiones pudieron haber aparecido en cualquier momento entre la toma de la RM previa y el inicio del efecto del medicamento.
- b. La gran mayoría de las lesiones nuevas se realzan con medio de contraste durante un periodo menor de dos meses y su interpretación se debe hacer con cautela, analizando el momento de la práctica de la RM frente a los tiempos de acción de las terapias modificadoras de la enfermedad (21). En general, se recomienda que esta primera imagen realizada poco después de iniciar la terapia modificadora se utilice como punto de referencia para comparar las RM subsecuentes (19).

A partir de los puntos anteriormente mencionados, surge la siguiente pregunta: ¿Cuándo se inicia el efecto de las terapias modificadoras de la enfermedad? En un estudio reciente, usaron la información de dos registros de pacientes con esclerosis múltiple que sumaron 125.000 participantes; trazaron una curva de densidades sobre la incidencia de recaídas o la detección de progresión de discapacidad, antes de iniciado el tratamiento y después de haberlo hecho.

De esta forma, determinaron cuánto tiempo después de iniciar cada terapia modificadora de la enfermedad se observa el mayor efecto y su estabilización. A este fenómeno lo denominaron “retraso terapéutico” (22) y, aunque es prometedor, requiere una mayor validación externa.

Con base en la evidencia disponible sobre los tiempos de inicio de acción de las terapias modificadoras de la enfermedad y el momento ideal para practicar una nueva RM, que será el examen de referencia para comparar las imágenes subsecuentes, se recomiendan los siguiente tiempos (23):

- a. Para las terapias modificadoras de la enfermedad de reconstitución inmunológica (cladribina y alemtuzumab), se considera un año después de la segunda dosis, o sea, a los dos años de iniciar la terapia.
- b. Para el acetato de glatiramer, se consideran nueve meses.
- c. Para los demás medicamentos, se consideran seis meses.

La recomendación basada en la evidencia científica, con un tiempo discordante para el acetato de glatiramer, sugiere que el medicamento alcanza su máximo efecto sobre los resultados radiológicos después de siete meses (23). Estos tiempos deben utilizarse como guía para la correcta definición de falla terapéutica en cada caso individual.

¿Cómo debe ser el seguimiento de un paciente con un síndrome radiológico aislado?

El síndrome radiológico aislado consiste en la detección incidental de imágenes indicativas de una enfermedad desmielinizante del tipo de la esclerosis múltiple en un paciente sin signos ni síntomas de esta enfermedad. Su diagnóstico se basa principalmente en la interpretación de la RM, considerando la más reciente revisión de los criterios de McDonald.

Una vez se presenta un evento neurológico clínico en un paciente con síndrome radiológico aislado, se pueden aplicar los criterios diagnósticos para soportar un diagnóstico definitivo de esclerosis múltiple. La historia natural del síndrome radiológico aislado y sus implicaciones en la práctica clínica, son objeto de debate constante en el campo de las enfermedades desmielinizantes (24).

Okuda, *et al.*, en el 2014, llevaron a cabo un estudio retrospectivo y evaluaron 451 sujetos con síndrome radiológico aislado obtenidos a partir de 22 bases de datos de cinco países. Hicieron el seguimiento desde la RM inicial hasta el primer evento clínico relacionado con desmielinización y calcularon el riesgo de que estos pacientes desarrollaran un evento clínico agudo o progresivo sugestivo de esclerosis múltiple a los cinco años.

Se detectaron eventos clínicos en 34 % (error estándar = 3 %) de los individuos dentro de un período de cinco años a partir del primer estudio de RM. En el modelo multivariado, la edad “menor de 37 años”, con un cociente

de riesgos instantáneos (*Hazard Rate*, HR) de 0,98 (IC_{95%} 0,96-0,99; p= 0,03), el sexo “hombre”, con un HR de 1,93 (IC_{95%} 1,24-2,99; p=0,004) y la presencia de lesiones en la médula espinal cervical o torácica, con un HR de 3,08 (IC_{95%} 2,06-4,62; p=0,001), se identificaron como factores predictores significativos para el desarrollo de un primer evento clínico y un mayor riesgo de desarrollar esclerosis múltiple (25).

Actualmente, con base en los hallazgos de este estudio, la vigilancia activa, clínica e imagenológica recomendada para estos pacientes, se debe hacer a los 6 y 12 meses en el primer año después del diagnóstico y, anualmente, durante cinco años (24, 25).

Más recientemente, Lebrun, *et al.*, realizaron un seguimiento extendido a 10 años sobre la misma población estudiada por Okuda en el 2014. Concluyeron que el riesgo de conversión de un síndrome radiológico aislado a una esclerosis múltiple aumentaba con el tiempo, siendo del 51,2 % a 10 años.

Los factores independientes relacionados con un mayor riesgo de progresión del síndrome a esclerosis múltiple fueron: tener una menor edad en el momento del diagnóstico del síndrome radiológico aislado, un líquido cefalorraquídeo con bandas oligoclonales positivas, y lesiones infratentoriales o en la médula espinal. La actividad radiológica durante el seguimiento de estos pacientes también se asoció con un mayor riesgo de presentar un evento clínico (HR=1,81) (IC_{95%} 1,31-2,52; p<0,001). A diferencia de los hallazgos previamente reportados a los cinco años, el sexo masculino ya no se consideró como un factor pronóstico para la evolución clínica, con un HR de 1,24 (IC_{95%} 0,88-1,77; p=0,25).

A la luz de estos hallazgos, se podría afirmar que el seguimiento clínico e imagenológico de los pacientes con síndrome radiológico aislado a futuro debería extenderse a 10 años (26).

Los pacientes con síndrome clínico aislado que no cumplen los criterios para esclerosis múltiple, ¿deben recibir terapias modificadoras de la enfermedad?

Un síndrome clínico aislado sugestivo de esclerosis múltiple es el primer episodio clínico monofásico en el que el paciente refiere síntomas típicos de esclerosis múltiple (por ejemplo, neuritis óptica unilateral, mielitis transversa, síndrome cerebeloso o síndrome de tallo). Hay hallazgos objetivos focales o multifocales que reflejan un evento desmielinizante en el sistema nervioso central (27). Al igual que una recaída típica de esclerosis múltiple, este episodio debe durar al menos 24 horas, con recuperación o sin ella, descartando la presencia de fiebre o infección. En este caso, si bien el paciente presenta un síntoma o signo típico de esclerosis múltiple, aún no cumple los criterios diagnósticos de McDonald de 2017 (27).

Los estudios controlados contra placebo, en que se ha evaluado el resultado en los pacientes con un primer evento desmielinizante y que han recibido terapias modificadoras de la enfermedad, sin cumplir los criterios para esclerosis múltiple, son:

1. CHAMPS (Interferón beta 1 a 30 µg una vez por semana)
2. ETOMS (Interferón beta 1 a 22 µg una vez por semana)
3. BENEFIT (Interferón subcutáneo beta 1 b 250 µg cada 24 horas)
4. REFLEX (Interferón beta 1 a 44 µg 3 veces por semana)

5. PreCISE (Acetato de glatiramer 20 μg una vez al día)
6. ORACLE (Cladribine)
7. TOPIC (Teriflunamida)

Estos estudios, en general, incluyeron adultos (>18 años hasta los 55 años) quienes, además de tener un síndrome clínico aislado, debían tener alguna lesión inflamatoria sugestiva de esclerosis múltiple en el sistema nervioso central evidenciada por RM cerebral. Los resultados muestran de forma constante que el inicio temprano de estas terapias modificadoras de la enfermedad retrasa la conversión a esclerosis múltiple definitiva (28-34).

Por ello, los pacientes entre los 18 y los 55 años con un síndrome clínico aislado típico de esclerosis, que no cumplan a cabalidad los criterios de McDonald de 2017, pero que presenten en la RM lesiones típicas de esclerosis múltiple, podrían ser candidatos para iniciar una terapia modificadora de la enfermedad. Su elección debe ser individualizada para cada paciente.

Finalmente, es importante aclarar que, en los estudios mencionados previamente, no se utilizaron los criterios diagnósticos actuales de esclerosis múltiple (McDonald, 2017) (27). Es de resaltar que se desconoce si, al usar los criterios actuales en esta población con síndrome clínico aislado, se puede confirmar un diagnóstico de esclerosis múltiple en algunos de ellos (27). Se requieren estudios aleatorizados controlados en que se utilicen los criterios actuales de McDonald y que incluyan seguimiento a largo plazo.

¿Puede la administración de natalizumab, en dosis extendidas, reducir el riesgo de leucoencefalopatía multifocal progresiva en pacientes con esclerosis múltiple?

En la actualidad, el natalizumab es uno de los tratamientos de gran eficacia más usados en la esclerosis múltiple. Actúa como inhibidor de la integrina alfa 4, evitando el ingreso de células T inflamatorias al sistema nervioso central.

En el año 2004, fue aprobado por primera vez por la *Food and Drug Administration* (FDA) para la esclerosis múltiple (35). Posteriormente, en 2005, fue retirado del mercado a raíz de dos casos de pacientes que desarrollaron leucoencefalopatía multifocal progresiva, otra enfermedad desmielinizante causada por

infección por el virus John Cunningham (JCV) en las células del sistema nervioso central. Finalmente, en 2006, fue reintroducido bajo un programa de prevención y mitigación de riesgos llamado *Tysabri Outreach Unified Commitment to Health* (TOUCH) (36).

A partir de la base de datos de este programa, se han podido aclarar los factores de riesgo relacionados con el desarrollo de la leucoencefalopatía multifocal progresiva. Los principales tres son:

1. tratamiento por más de 24 meses (37),
2. uso previo de inmunosupresores, y
3. exposición previa al virus JC (anticuerpos anti-JCV positivos) (38).

Recientemente, se ha venido investigando si el disminuir la frecuencia de la infusión intravenosa del medicamento podría reducir el riesgo

de leucoencefalopatía multifocal progresiva. Esta forma de dosificar el fármaco se ha denominado dosis de intervalo extendido, la cual consiste en administrar las infusiones separadas por periodos de más de cuatro semanas, que es el tiempo establecido en la dosis de intervalo estándar.

La administración de las dosis en periodos estándar lleva a que se saturen más del 80 % de los receptores de integrina alfa 4 después de un mes de su administración (39). Se ha propuesto que una dosis en un rango intermedio, que vaya de 4 a 10 semanas, podría resultar en una reducción en la concentración valle del medicamento (al no posponer tanto su administración) y, a su vez, en una reducción de la cantidad de receptores de integrina saturados, con el fin de que siga existiendo algo de transmigración celular que evite la entrada del JCV al sistema nervioso central (40).

En 2014, se publicó una revisión retrospectiva de 361 pacientes que recibieron natalizumab durante, por lo menos, seis meses. De estos pacientes, 96 lo recibieron con intervalos extendidos, cada 6 a 8 semanas, en algún momento de su tratamiento. Se encontró que la tasa de recaídas de la enfermedad no fue diferente entre los dos grupos (con intervalo extendido y con intervalo estándar), por lo cual se concluyó que el extender el intervalo de las dosis no compromete de forma estadísticamente significativa la efectividad del tratamiento (39).

De manera similar, en otra revisión retrospectiva publicada en 2016, se incluyeron 2.004 pacientes, de los cuales 905 recibieron las dosis con intervalos extendidos, hasta cada 8 semanas. Se encontró que no hubo diferencias significativas entre los grupos según el intervalo de las dosis, en cuanto a la ausencia de actividad (clínica y radiológica) de la enfermedad y la tasa anual de recaídas.

En cuanto a casos de leucoencefalopatía multifocal progresiva, la cantidad de pacientes fue muy pequeña para aclarar este punto con un poder estadístico suficiente. Sin embargo, es de resaltar que en el grupo con dosis en intervalos estándar, hubo 4 casos de leucoencefalopatía multifocal progresiva, mientras que, en el de intervalos extendidos, no hubo ningún caso (41).

Solo en aquel momento se pudo establecer, con la información disponible, que las dosis en intervalos extendidos no alteraban la eficacia del tratamiento con natalizumab; sin embargo, persistía la duda de si el extender los intervalos podría reducir el riesgo de leucoencefalopatía multifocal progresiva.

Posteriormente, en 2019, se publicó un estudio de cohorte retrospectivo, basado en la base de datos TOUCH, cuyo objetivo principal era evaluar si las dosis de intervalo extendido podían reducir el riesgo de leucoencefalopatía multifocal progresiva en pacientes con factores de riesgo. Este estudio incluyó un total de 35.521 pacientes positivos para anticuerpos anti-JCV y con historia de uso previo de inmunosupresores.

En el análisis primario, hubo una reducción del 94 % en el riesgo de leucoencefalopatía multifocal progresiva en los últimos 18 meses de tratamiento al extender los intervalos, en comparación con las dosis en intervalos estándar, y una diferencia estadísticamente significativa en el cociente de riesgos instantáneos o *hazards rates* (HR), el cual fue menor con la extensión de los intervalos.

En el análisis secundario, hubo una reducción del 88 % del riesgo de leucoencefalopatía multifocal progresiva en cualquier momento durante

el tratamiento, con la dosis de intervalo extendido en comparación con el estándar, y una diferencia estadísticamente significativa en el cociente de riesgos instantáneos (HR), cuyo valor fue menor con la extensión del intervalo.

En el análisis terciario se evaluaron 815 pacientes que habían recibido dosis de intervalo extendido en algún momento a lo largo de toda su historia de tratamiento, comparándolos con los que solo recibieron dosis de intervalo estándar, y ninguno presentó leucoencefalopatía multifocal progresiva.

Los resultados de los tres análisis mostraron reducción del riesgo de desarrollar esta leucoencefalopatía con los intervalos extendidos, con valores clínica y estadísticamente significativos (42).

El análisis de la base de datos TOUCH se repitió en 2018, agregándole 4.888 nuevos pacientes con un aumento relativo del número de pacientes con dosis de intervalo extendido, en comparación con aquellos con intervalo estándar. Se siguieron encontrando diferencias significativas en el riesgo relativo (RR) en el análisis primario y el secundario (disminución de 94 % y 88 %, respectivamente) y, en el terciario, siguieron sin aparecer casos de leucoencefalopatía multifocal progresiva.

Además, los factores de riesgo para desarrollar la leucoencefalopatía siguieron siendo los mismos que con las dosis de intervalo estándar, pues la mayoría de los casos que ocurrieron con dosis de intervalo extendido tenían un índice de JCV mayor o igual a 1,5, o exposición previa a inmunosupresores. En conclusión, el nuevo análisis corroboró los datos del original y que ambos tipos de dosis, con intervalo extendido o estándar, comparten los mismos factores de riesgo para desarrollar leucoencefalopatía multifocal progresiva (42).

Los datos indican que el riesgo de leucoencefalopatía se reduce al administrar las dosis de natalizumab en intervalos extendidos. Sin embargo, se requiere un seguimiento en el tiempo con análisis periódicos de los datos del TOUCH, para asegurarse de que, efectivamente, sí lo reduce y no solo lo retrasa. La información actualmente disponible es puramente observacional y, por lo tanto, no se ha emitido una recomendación formal al respecto; sin embargo, se encuentra en curso una prueba clínica aleatorizada en fase 3, denominada NOVA (43).

¿Se deben tratar las recaídas leves de esclerosis múltiple?

Actualmente, no hay una definición ampliamente aceptada sobre qué es una recaída leve de esclerosis múltiple. Las definiciones actuales hacen referencia a la afectación de un solo sistema (idealmente, sin compromiso motor o cerebeloso), la cual no compromete la capacidad de llevar a cabo de forma independiente las actividades de la vida diaria y tiende a recuperarse de forma completa (44).

Las recaídas con síntomas visuales, sensitivos y de tallo, suelen recuperarse de forma más completa que cuando se presentan síntomas cerebelosos, motores y de esfínteres, los cuales suelen causar más secuelas a largo plazo (45). También, se ha utilizado una definición basada en el cambio en el puntaje EDSS durante la crisis como un marcador de gravedad, dado que las recaídas que cambian en 1 o menos puntos el EDSS respecto al basal, producen menor riesgo de discapacidad a largo plazo (46).

La información disponible ha demostrado de forma constante que se logra una recuperación más rápida del déficit neurológico, cuando se incluyen bolos de metilprednisolona durante el tratamiento de una recaída de la enfermedad (47). Sin embargo, este manejo no ha demostrado prevenir recaídas o cambiar la acumulación de discapacidad a largo plazo (48).

Aunque los bolos de metilprednisolona no han demostrado tener un impacto sobre los resultados clínicos a largo plazo, se ha observado mediante imágenes avanzadas (*Magnetization Transfer Ratios*) que producen una mayor recuperación del tejido neuronal, la cual se mantiene hasta por 19 meses (49). Además, es importante tener en cuenta los resultados de importancia para el paciente, pues las recaídas también producen carga emocional, psicológica, económica y familiar, entre otras (46).

Por último, como para toda decisión clínica, es fundamental analizar los riesgos, costos y beneficios. En general, los bolos de corticoides en esquemas cortos, como se utilizan en las recaídas de la esclerosis múltiple, no se consideran muy costosos, no se asocian con mayores efectos secundarios, y han demostrado beneficios clínicos y radiológicos; estos están mejor demostrados a corto plazo, pero también, se ha encontrado que persisten a mediano y probablemente a largo plazo.

Por esta razón, se recomienda tener un umbral bajo para el tratamiento de las recaídas leves de esclerosis múltiple. No obstante, cuando las recaídas se consideran clínicamente muy leves, se podría considerar omitir su tratamiento inmediato. La disponibilidad de tratamiento oral o intravenoso domiciliario, inclinaría aún más la balanza hacia tratar hasta las recaídas más leves de esclerosis múltiple.

Los pacientes que reciben pulsos de metilprednisolona intravenosa, ¿requieren tratamiento preventivo para evitar la hiperinfección por *Strongyloides stercoralis*?

La infección por *Strongyloides stercoralis* es frecuente en regiones del trópico y subtropical. Colombia se considera un área endémica, con una prevalencia reportada de 16 a 19 % (50).

La larva filiforme de *S. stercoralis* que se encuentra en los suelos, ingresa a través de la piel, alcanza los alvéolos por vía sanguínea, asciende por la vía respiratoria y es deglutida; ya en el intestino delgado, madura y deposita sus huevos. Posteriormente, se liberan las larvas rhabditiformes en las heces y, de esta manera, los sujetos se pueden reinfectar si las larvas penetran la piel perianal, lo cual ocurre con mayor frecuencia en sujetos inmunosuprimidos.

En personas inmunocompetentes, puede causar infecciones asintomáticas crónicas durante décadas. Sin embargo, los pacientes inmunosuprimidos tienen el riesgo de presentar una hiperinfección con diseminación a pulmón, hígado y cerebro. La hiperinfección produce, además, una sepsis sistémica secundaria a la translocación de bacterias del tubo digestivo causada por la invasión de la larva en la pared intestinal. Este cuadro clínico se acompaña de gran mortalidad, la cual varía entre 85 y 100 % (51).

En efecto, la hiperinfección puede ocurrir con grandes o pequeñas dosis de esteroides, incluso con su aplicación local. Se ha descrito en pacientes que han recibido dexametasona a dosis de 1 mg/día durante ocho semanas y con cursos cortos de prednisolona durante 6 a 17 días (52,53). A la fecha, no se han reportado casos de hiperinfección por *S. stercoralis* en pacientes

que hayan recibido pulsos de metilprednisolona para tratar las recaídas de esclerosis múltiple.

Idealmente, antes de formular esteroides, se debería averiguar si el paciente tiene una infección crónica por *S. stercoralis*, con el fin de erradicar el nematodo y prevenir la hiperinfección. Sin embargo, el reconocer sujetos con infección crónica es un reto diagnóstico, pues la mayoría son asintomáticos clínicamente. Además, la sintomatología puede ser inespecífica y consistir en vómito intermitente, diarrea, estreñimiento, borborigmos, prurito e hiperreactividad bronquial (51).

La prueba serológica parece ser el examen más sensible en áreas endémicas, pero las pruebas de laboratorio son costosas y sus resultados pueden tardar hasta dos semanas. Por esto, algunos autores recomiendan el tratamiento empírico para erradicar al nematodo en pacientes con grandes riesgos, como vivir en áreas endémicas, tener un bajo nivel socioeconómico, consumir alcohol, trabajar en el campo o estar expuesto por la minería de carbón.

Como Colombia se considera un área endémica para *S. stercoralis*, antes de administrar esteroides es importante analizar cada caso en particular y, según los factores de riesgo y el criterio médico, decidir si se usa empíricamente un antiparasitario contra el nematodo. Uno de los esquemas terapéuticos más recomendados es el de 400 mg de albendazol cada 12 horas durante tres días; asimismo, se pueden utilizar la ivermectina y el tiabendazol (54).

¿Las vacunas aumentan el riesgo de enfermedades desmielinizantes tales como la encefalomiелitis aguda diseminada, la esclerosis múltiple y el síndrome de Guillain-Barré?

La primera manifestación neurológica asociada con la vacunación fue el síndrome neuromuscular posterior a la inmunización contra la rabia en el año 1889. Desde entonces, las vacunas se han asociado con encefalitis, síndrome de Guillain-Barré, crisis convulsivas, cefalea, neuropatía y otros síndromes neurológicos (55).

La asociación entre el síndrome de Guillain-Barré y la vacunación data del año 1976 durante la inmunización contra la influenza porcina en Estados Unidos. En este periodo de vacunación, se identificó un riesgo de un caso por cada 100.000 pacientes vacunados (56). Asimismo, en un metanálisis publicado en 2015, se concluyó que existe un riesgo de 1,41 de que se presente un síndrome de Guillain-Barré después de la vacunación contra influenza. Sin embargo, en un estudio anglosajón no se encontró asociación en los primeros 90 días después de la inmunización (RI=0,76) (57).

En general, se considera que el riesgo de síndrome de Guillain-Barré por la vacuna de influenza es de 1 a 2 casos extra por cada millón de personas vacunadas. Esta pequeña contingencia no supera los beneficios de la vacunación y, además, el riesgo de desarrollar un síndrome de Guillain-Barré es 4 a 7 veces mayor que el asociado con la vacunación. Otras vacunas, como aquellas contra sarampión, paperas, rubéola, conjugado meningocócico, poliomiелitis, neumococo, varicela, *Haemophilus influenzae* de tipo B, rabia, tétanos, difteria, hepatitis A y hepatitis B, no incrementan el riesgo de sufrir este síndrome (57).

Por otra parte, la incidencia posvacunal de encefalomiелitis aguda diseminada es de 0,1 a 0,2 por cada 100.000, y el riesgo parece ser mayor

con la vacuna contra el sarampión (58). En un estudio poscomercialización en Japón, entre 1994 y 2004, se documentaron 7 casos de encefalomiелitis aguda diseminada por cada 67,2 millón de vacunas (59). Sutton, *et al.*, describieron cinco casos de encefalomiелitis aguda diseminada después de la dosis de refuerzo de la vacuna contra el virus del papiloma humano (HPV) (60).

Por el contrario, en un estudio realizado en Dinamarca y Suecia, no se encontró una relación causal entre la vacuna contra el HPV y la aparición de enfermedades desmielinizantes (61). Asimismo, en otro estudio de casos y controles entre 2011 y 2015, no se encontró aumento en el riesgo de encefalomiелitis aguda diseminada en adultos vacunados contra hepatitis B, influenza, poliomiелitis, difteria, tétano, paperas, sarampión, rubéola, hepatitis A, varicela o rabia (62).

En Francia, en el año 1990, se documentaron casos de esclerosis múltiple después de la vacunación contra la hepatitis B (62). Sin embargo, en estudios más recientes, no se ha encontrado una asociación causal y la revisión sistémica de la literatura lo confirma con un OR de 0,965 de esclerosis múltiple posterior a la vacunación contra la hepatitis B (62). En otros estudios, se ha encontrado que las vacunas contra HPV, influenza, tétanos, difteria, tosferina, poliomiелitis y fiebre tifoidea, y la triple viral, no aumentan el riesgo de esclerosis múltiple (61,62).

Respecto a la vacuna contra la fiebre amarilla, en un estudio se reportó que cinco de siete pacientes con esclerosis múltiple vacunados desarrollaron una recaída después de la vacunación (63). Sin embargo, más recientemente en un estudio retrospectivo, se demostró que la vacunación no se asoció con mayores tasas de recaídas, ni con nuevas lesiones inflamatorias evidenciadas por RM (64).

En conclusión, la vacuna contra la influenza ha demostrado tener muy poco riesgo de inducir un síndrome de Guillain-Barré, que no supera sus beneficios a nivel poblacional. No existe información suficiente para confirmar que la vacunación aumente el riesgo de encefalomiелitis aguda diseminada en adultos. Las vacunas contra hepatitis B, HPV, influenza, tétanos, difteria, tosferina, poliomiелitis y fiebre tifoidea, y la triple viral, no aumentan el riesgo de esclerosis múltiple.

Respecto a la vacuna contra la fiebre amarilla y las recaídas de esclerosis múltiple, hay datos contradictorios y es necesario sumar nuevas investigaciones en este campo.

¿Cuándo suspender la terapia modificadora de la enfermedad en pacientes con esclerosis múltiple?

El papel de las terapias modificadoras de la enfermedad en la esclerosis múltiple es modular o disminuir la actividad del sistema inmunológico, con el fin de atenuar la inflamación que afecta el sistema nervioso central. Constantemente, el beneficio de estas ha demostrado ser mayor en pacientes con enfermedad inflamatoria activa (65,66). Históricamente, se han cuestionado las terapias modificadoras de la enfermedad en pacientes de mayor edad, no sólo por aspectos de seguridad, sino también, por la historia natural de la esclerosis múltiple, cuyo riesgo de nuevos episodios de inflamación tiende a ser menor con el paso de los años (67). En efecto, se ha visto que a partir de los 50 años, la tasa anual de recaídas es inferior al 10 % (66). Este fenómeno podría ser secundario a la inmunosenescencia

y convoca a la discusión sobre la posibilidad de suspender la terapia modificadora de la enfermedad en algunos pacientes con esclerosis múltiple.

Los resultados de un metaanálisis reciente sugieren que la mitad de los sujetos menores de 53 años con terapias modificadoras de la enfermedad, están expuestos a efectos adversos acumulativos, con poco o ningún beneficio terapéutico (68). Además, los datos provenientes de *MSBase* han demostrado que los sujetos más jóvenes con menor discapacidad y con lesiones en la RM realizadas con el medio de contraste en los últimos tres años, son aquellos que tienen un mayor riesgo de recurrencia de recaídas al suspender la terapia modificadora de la enfermedad (66). Actualmente, con el estudio DISCOMS, que se encuentra en curso, se busca evaluar la seguridad de suspender la terapia modificadora de la enfermedad en sujetos con diagnóstico de esclerosis múltiple de tipo recaída-remisión, que no hayan presentado recaídas en los últimos cinco años y que no tengan nuevas lesiones evidenciadas por RM en los últimos tres años (69).

La suspensión de la terapia modificadora de la enfermedad podría considerarse en pacientes de mayor edad (probablemente, mayores de 53 años), con una enfermedad quiescente clínica y radiológicamente por periodos significativos de cuatro años, por lo menos, y cuando los riesgos superen los beneficios del tratamiento. Los resultados del estudio DISCOMS permitirán tener una información más sólida para soportar o refutar esta consideración. De forma similar, en pacientes con formas progresivas de la enfermedad y sin signos de inflamación, podría considerarse retirar la terapia modificadora de la enfermedad cuando los riesgos superen los beneficios.

¿Cuál es el conocimiento actual sobre un segundo ciclo de inmunoglobulina intravenosa en pacientes con síndrome de Guillain-Barré?

El síndrome de Guillain-Barré es una de las causas más frecuentes de ingreso a la unidad de cuidados intensivos, por debilidad muscular y parálisis aguda. La inmunoglobulina (Ig) intravenosa se considera efectiva para el tratamiento temprano del síndrome de Guillain-Barré. El esquema estándar de Ig intravenosa (2 g/kg en 2 a 5 días) acelera el tiempo de recuperación si se administra dentro de las primeras dos semanas después de iniciarse el cuadro clínico (70,71). A pesar del tratamiento inmunomodulador, la evolución clínica es desfavorable en algunos pacientes y se ha interrogado la necesidad de otras aproximaciones terapéuticas (72), incluyendo un segundo esquema de inmunoglobulina intravenosa (71).

Verboon, *et al.*, realizaron un estudio observacional, prospectivo y multicéntrico, para evaluar la efectividad de un segundo esquema de inmunoglobulina intravenosa. En este estudio, se tuvo en cuenta el estudio internacional de pronóstico del síndrome de Guillain-Barré (*International GBS Outcome Study*, IGOS) y se seleccionaron sujetos cuyo puntaje en la escala modificada de pronóstico EGOS (*Erasmus GBS Outcome Score*) en la primera semana, predijera un pronóstico desfavorable.

Los pacientes que recibieron un segundo esquema de inmunoglobulina intravenosa se dividieron en dos grupos: en el primero, aquellos que lo habían recibido de forma temprana (antes de dos semanas), y en el segundo, aquellos con administración tardía (2 a 4 semanas).

En el estudio se evaluaron los resultados primarios y secundarios en ambos grupos, comparándolos con un grupo control. Entre los primarios, se evaluó el resultado funcional de la escala de discapacidad del síndrome de Guillain-Barré. Entre los resultados secundarios, se incluyeron: la capacidad de caminar de forma independiente a las 26 semanas; la necesidad de asistencia respiratoria mecánica durante cualquier momento del seguimiento; el tiempo de estancia en la unidad de cuidado intensivo; el tiempo de necesidad de soporte respiratorio; la mortalidad relacionada con el síndrome de Guillain-Barré a los 6 meses; las fluctuaciones relacionadas con el tratamiento, y otras complicaciones.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, para los resultados estudiados. Aunque en el análisis se incluyó un grupo reducido de pacientes, este estudio refleja la práctica clínica actual en pacientes con síndrome de Guillain-Barré con un pronóstico desfavorable; un segundo esquema de inmunoglobulina intravenosa no mostró ningún efecto positivo en su resultado funcional (72).

Recientemente, en el estudio clínico doble ciego, aleatorizado y controlado con placebo, titulado SID-GBS y publicado por Walgaard, *et al.*, se evaluó nuevamente el beneficio del segundo esquema de inmunoglobulina intravenosa (2 g/kg por 5 días). Se incluyeron 327 pacientes con diagnóstico de síndrome de Guillain-Barré, de los cuales 112 tenían un pronóstico desfavorable según la puntuación para discapacidad Erasmus. El análisis por intención de tratar incluyó 93 pacientes con mal pronóstico: 49 (53 %) recibieron un segundo esquema de inmunoglobulina intravenosa y 44 (47 %) recibieron placebo.

Los resultados demostraron que este segundo esquema no era superior al placebo, con una razón de probabilidades común ajustada para mejorar la discapacidad a las cuatro semanas de 1,4 (IC_{95%} 0,6-3,3; p=0,45). Además, los pacientes que recibieron el segundo esquema presentaron más reacciones adversas en los primeros 30 días después del tratamiento (35 Vs. 16 %), incluyendo eventos tromboembólicos. Por lo tanto, este estudio reafirma que los pacientes con síndrome de Guillain-Barré y con criterios de mal pronóstico, no se benefician de esta intervención, la cual puede condicionar una mayor tasa de eventos adversos (73).

Actualmente, solo se considera administrar un segundo esquema de inmunoglobulina intravenosa en aquellos pacientes con síndrome de Guillain-Barré que cursan con fluctuaciones relacionadas con el tratamiento (74,75).

¿Como diferenciar el síndrome de Guillain-Barré de una polineuropatía crónica inflamatoria desmielinizante de inicio agudo?

Generalmente, los pacientes con síndrome de Guillain-Barré tienen un curso clínico monofásico con un nadir a las 4 semanas, a diferencia de los sujetos con polineuropatía crónica inflamatoria desmielinizante, quienes presentan un curso clínico progresivo en 8 semanas. Sin embargo, el 5 % de aquellos que padecen el síndrome de Guillain-Barré pueden progresar a una polineuropatía crónica inflamatoria desmielinizante y, de estos últimos, el 16 % pueden hacerlo de forma aguda (70).

Aunque diferenciar un síndrome de Guillain-Barré de una polineuropatía crónica inflamatoria desmielinizante de inicio agudo puede ser un reto

diagnóstico complejo, es de vital importancia pues estas enfermedades tienen diferentes implicaciones terapéuticas y pronósticas.

Los resultados de estudios de series de casos y de estudios retrospectivos, indican que los signos sensitivos, como ataxia e hipopalestesia, se presentan con mayor frecuencia en pacientes con sospecha diagnóstica de polineuropatía crónica inflamatoria desmielinizante de inicio agudo o síndrome de Guillain-Barré. Además, en los pacientes con esta polineuropatía de inicio agudo es poco frecuente documentar disautonomías o debilidad facial y, además, por lo general no requieren asistencia respiratoria mecánica (76,77). El pródromo infeccioso y el compromiso motor más grave ocurren con mayor frecuencia en los pacientes con el síndrome de Guillain-Barré (76).

La evolución de la enfermedad es un elemento clave para hacer el diagnóstico diferencial. Si el paciente tiene tres o más fluctuaciones relacionadas con el tratamiento, o presenta deterioro después de la octava semana, es más probable que se trate de una polineuropatía crónica inflamatoria desmielinizante de inicio agudo (78). Los hallazgos tempranos de electromiografía y neuroconducción, así como el estudio de líquido cefalorraquídeo, no permiten diferenciar de forma confiable estas dos enfermedades(76-78).

¿Cuál es el rol de la enzima convertidora de angiotensina en líquido cefalorraquídeo para el diagnóstico de neurosarcoidosis?

La sarcoidosis es una enfermedad granulomatosa sistémica, que puede llegar a comprometer el sistema nervioso central en 5 a 25 % de los casos (79). Su presentación clínica variable y su curso heterogéneo frecuentemente dificultan y retrasan su diagnóstico. Actualmente, el diagnóstico de neurosarcoidosis se clasifica de acuerdo con el grado de certeza, en *posible*, *probable* o *definitivo*. Es de mencionar que, en el contexto particular de la confirmación diagnóstica definitiva, la cual requiere de una biopsia de tejido nervioso, surge la necesidad de descubrir un biomarcador menos invasivo y con mejor rendimiento.

La enzima convertidora de angiotensina (ECA) es una glucoproteína de membrana producida por las células epitelioides del tejido granulomatoso, que cumple un rol esencial en la fisiopatología de la sarcoidosis. La ECA se eleva en suero en 30 a 80 % de los casos, con una sensibilidad y especificidad variables entre 22 y 86 % y entre 54 y 95 %, respectivamente (80). A la fecha, la información sobre su utilidad en el diagnóstico de la neurosarcoidosis se basa, principalmente, en estudios observacionales.

En 1985, se publicó en *Neurology* la primera serie retrospectiva de casos, en que se estudió el aumento de la ECA en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con neurosarcoidosis. Se encontró que, de 20 pacientes con neurosarcoidosis, 11 (55 %) presentaban niveles elevados de la ECA, en comparación con 1 de 12 pacientes con sarcoidosis sistémica sin neurosarcoidosis. A pesar de las limitaciones del estudio y el bajo poder estadístico, se concluyó que los niveles de la ECA en el líquido cefalorraquídeo podían ser potencialmente útiles en el diagnóstico de neurosarcoidosis (81).

Posteriormente, en 1999, Dale, *et al.*, publicaron una revisión retrospectiva de 110 pacientes, en quienes se cuantificó la ECA en el líquido

cefalorraquídeo para descartar neurosarcoidosis. Encontraron que el 56 % de pacientes con aumento de la ECA no cursó con neurosarcoidosis y, a su vez, que el 76 % de aquellos con diagnóstico de neurosarcoidosis tenían valores normales, cuestionándose así la utilidad clínica de este biomarcador (82).

Más recientemente, Tahmouh, *et al.*, publicaron una serie retrospectiva de 207 casos. Realizaron la medición de la ECA en el líquido cefalorraquídeo de 11 pacientes que cumplían con los criterios para un diagnóstico probable de neurosarcoidosis y los compararon con 207 controles. Encontraron que, por radioensayo, la actividad promedio de la ECA en el líquido cefalorraquídeo era significativamente mayor ($p < 0,05$) en los 11 casos de probable neurosarcoidosis ($9,5 \pm 6,9$ nmol/ml/minuto), en comparación con el grupo control ($2,9 \pm 2,7$ nmol/ml/minuto). También, encontraron que el punto de corte óptimo discriminador de actividad de ECA en el líquido cefalorraquídeo fue de 8 nmol/ml/minuto, para una sensibilidad del 55 % y una especificidad del 94 %. Se concluyó, entonces, que la ECA en líquido cefalorraquídeo podría ser un biomarcador útil para el diagnóstico de neurosarcoidosis probable, en especial, cuando hay lesiones que se realzan en la neuroimagen (83).

Teniendo en cuenta la evidencia hasta el año 2009, Khoury, *et al.*, publicaron una evaluación del tema de interés con base en los dos artículos primarios (82,83). Concluyeron que la prueba de ECA en líquido cefalorraquídeo tiene una baja sensibilidad (24-55 %), pero, que es razonablemente específica (94-95 %) para el diagnóstico de neurosarcoidosis, pudiéndose utilizar para aumentar la probabilidad pretest. Sin embargo, también concluyeron que su precisión diagnóstica no está claramente establecida y no supera la del diagnóstico histopatológico (84).

Más adelante, en 2015, Bridel, *et al.*, llevaron a cabo un estudio retrospectivo que incluyó 440 pacientes sometidos a punción lumbar por sospecha diagnóstica de neurosarcoidosis. Del total de sujetos estudiados, 8 cumplieron con los criterios para neurosarcoidosis probable y, uno, para neurosarcoidosis definitiva. Se encontró que no hubo diferencias estadísticamente significativas en los valores de la ECA en líquido cefalorraquídeo entre los 9 pacientes con diagnóstico de neurosarcoidosis (media=4,3 y desviación estándar=4,7) y los controles (media=2,3 y desviación estándar=2,7) ($p=0,11$). A su vez, los valores séricos de ECA fueron significativamente más altos en los 9 pacientes con neurosarcoidosis (media=77,2 y desviación estándar=4,9,5) que en los controles (media=32,8 y desviación estándar=2,7) ($p=0,11$).

Además, trazaron las curvas ROC para determinar el punto de corte de la ECA en líquido cefalorraquídeo como prueba diagnóstica, y encontraron el corte de mayor discriminación en 2, para una sensibilidad y especificidad de apenas 66,7 % y 67,3 %, respectivamente; sin tampoco vislumbrar una buena razón de verosimilitud (85).

Hasta el momento, la información disponible está basada en pequeñas series retrospectivas de casos y la mayoría incluyen controles con comparadores sanos. El estudio con el mayor número de pacientes es el publicado por Bridel, *et al.* (85), en el cual los controles fueron pacientes clínicamente sospechosos de neurosarcoidosis, lo cual lo convierte en el más similar a los casos clínicos reales.

Los resultados entre estudios son contradictorios, pero, en su mayoría, indican que la ECA en líquido cefalorraquídeo tiene poca sensibilidad y una

especificidad muy variable, y su rendimiento diagnóstico es pobre debido a una pequeña razón de verosimilitud y a una pequeña área bajo la curva ROC. Por lo tanto, es una prueba de poco valor diagnóstico y no reemplaza la biopsia, y la información actual es insuficiente para recomendar su uso clínico.

Referencias

1. Optic Neuritis Treatment Trial Headquarters, University of South Florida College of Medicine. The clinical profile of optic neuritis. *Arch Ophthalmol*. 1991;109. <https://doi.org/10.1001/archophth.1991.01080120057025>
2. Perumal JS, Caon C, Hreha S, Zabad R, Tselis A, Lisak R, *et al*. Oral prednisone taper following intravenous steroids fails to improve disability or recovery from relapses in multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 2008;15:677. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2008.02146.x>
3. Lević Z, Micić D, Nikolić J, Stojisavljević N, Sokić D, Janković S, *et al*. Short-term high dose steroid therapy does not affect the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in relapsing multiple sclerosis patients. Clinical assessment by the insulin tolerance test. *J Endocrinol Invest*. 1996;19:30-4. <https://doi.org/10.1007/BF03347855>
4. Sormani MP, De Rossi N, Schiavetti I, Carmisciano L, Cordioli C, Muiola L, *et al*. Disease modifying therapies and COVID-19 severity in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2021;89:780-9. <https://doi.org/10.1002/ana.26028>
5. Louapre C, Collongues N, Stankoff B, Giannesini C, Papeix C, Bensa C, *et al*. Clinical characteristics and outcomes in patients with coronavirus disease 2019 and multiple sclerosis. *JAMA Neurol*. 2020;77:1079-88. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.2581>
6. Peeters LM, Parciak T, Walton C, Geys L, Moreau Y, De Brouwer E, *et al*. COVID-19 in people with multiple sclerosis: A global data sharing initiative. *Mult Scler J*. 2020;26:1157-62. <https://doi.org/10.1177/1352458520941485>
7. Reyes S, Cunningham AL, Kalincik T, Havrdová EK, Isobe N, Pakpoor J, *et al*. Update on the management of multiple sclerosis during the COVID-19 pandemic and post pandemic: An international consensus statement. *J Neuroimmunol*. 2021;357:577627. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2021.577627>
8. Reyes S, Ramsay M, Ladhani S, Amirthalingam G, Singh N, Cores C, *et al*. Protecting people with multiple sclerosis through vaccination. *Pract Neurol*. 2020;20:435-45. <https://doi.org/10.1136/practneurol-2020-002527>
9. Ciotti JR, Valtcheva MV, Cross AH. Effects of MS disease-modifying therapies on responses to vaccinations: A review. *Mult Scler Relat Disord*. 2020;4:102439. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2020.102439>
10. Bar-Or A, Freedman MS, Kremenchutzky M, Menguy-Vacheron F, Bauer D, Jodl S, *et al*. Teriflunomide effect on immune response to influenza vaccine in patients with multiple sclerosis. *Neurology*. 2013;81:552-8. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31829e6fbf>
11. Bar-Or A, Wiendl H, Miller B, Benamor M, Truffinet P, Church M, *et al*. Randomized study of teriflunomide effects on immune responses to neoantigen and recall antigens. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2015;2:e70. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000070>
12. von Hehn C, Howard J, Liu S, Meka V, Pultz J, Mehta D, *et al*. Immune response to vaccines is maintained in patients treated with dimethyl fumarate. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2018;5:e409. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000409>
13. Kappos L, Mehling M, Arroyo R, Izquierdo G, Selmaj K, Curovic-Perisic V, *et al*. Randomized trial of vaccination in fingolimod-treated patients with multiple sclerosis. *Neurology*. 2015;84:872-9. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001302>
14. Ufer M, Shakeri-Nejad K, Gardin A, Su Z, Paule I, Marbury TC, *et al*. Impact of siponimod on vaccination response in a randomized, placebo-controlled study. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2017;4:e398. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000398>
15. Bar-Or A, Calkwood JC, Chognot C, Evershed J, Fox EJ, Herman A, *et al*. Effect of ocrelizumab on vaccine responses in patients with multiple sclerosis. *Neurology*. 2020;95:e1999-e2008. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000010380>
16. McCarthy CL, Tuohy O, Compston DAS, Kumararatne DS, Coles AJ, Jones JL. Immune competence after alemtuzumab treatment of multiple sclerosis. *Neurology*. 2013;81:872-6. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182a35215>

17. Achiron A, Mandel M, Dreyer-Alster S, Harari G, Magalashvili D, Sonis P, *et al.* Humoral immune response to COVID-19 mRNA vaccine in patients with multiple sclerosis treated with high-efficacy disease-modifying therapies. *Ther Adv Neurol Disord.* 2021;14:17562864211012835. <https://doi.org/10.1177/17562864211012835>
18. Cordonnier C, Einarsdottir S, Cesaro S, Di Blasi R, Mikulska M, Rieger C, *et al.* Vaccination of haemopoietic stem cell transplant recipients: Guidelines of the 2017 European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL 7). *Lancet Infect Dis.* 2019;19:e200-e12. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30600-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30600-5)
19. Prosperini L, Mancinelli C, Haggiag S, Cordioli C, De Giglio L, De Rossi N, *et al.* Minimal evidence of disease activity (MEDA) in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2020;91:271-7. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2019-322348>
20. Cristiano E, Alonso R, Alvez Pinheiro A, Bacile EA, Balbuena ME, Ballario C, *et al.* Argentinean recommendations on the identification of treatment failure in relapsing remitting multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci.* 2018;385:217-24. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2018.01.004>
21. Tsantes E, Curti E, Collura F, Bazzurri V, Fiore A, Granella F. Five- and seven-year prognostic value of new effectiveness measures (NEDA, MEDA and six-month delayed NEDA) in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2020;414:116827. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2020.116827>
22. Roos I, Leray E, Frasca F, Casey R, Brown JW, Horakova D, *et al.* Delay from treatment start to full effect of immunotherapies for multiple sclerosis. *Brain.* 2020;143:2742-56. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa231>
23. Giovannoni G, Turner B, Gnanapavan S, Offiah C, Schmierer K, Marta M. Is it time to target no evident disease activity (NEDA) in multiple sclerosis? *Mult Scler Relat Disord.* 2015;4:329-33. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2015.04.006>
24. De Stefano N, Giorgio A, Tintoré M, Pia Amato M, Kappos L, Palace J, *et al.* Radiologically isolated syndrome or subclinical multiple sclerosis: MAGNIMS consensus recommendations. *Mult Scler J.* 2018;24:214-21. <https://doi.org/10.1177/1352458517717808>
25. Okuda DT, Siva A, Kantarci O, Inglese M, Katz I, Tutuncu M, *et al.* Radiologically isolated syndrome: 5-year risk for an initial clinical event. *PLoS ONE.* 2014;9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090509>
26. Lebrun-Frenay C, Kantarci O, Siva A, Sormani MP, Pelletier D, Okuda DT, *et al.* Radiologically isolated syndrome: 10-year risk estimate of a clinical event. *Ann Neurol.* 2020;88 407-17. <https://doi.org/10.1002/ana.25799>
27. Grzegorski T, Losy J. What do we currently know about the clinically isolated syndrome suggestive of multiple sclerosis? An update. *Rev Neurosci.* 2020;31:335-49. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2019-0084>
28. Galetta SL. The Controlled High Risk Avonex® Multiple Sclerosis trial (CHAMPS STUDY). *J Neuroophthalmol.* 2001;21:292-5. <https://doi.org/10.1097/00041327-200112000-00013>
29. Comi G, Filippi M, Barkhof F, Durelli L, Edan G, Fernández O, *et al.* Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: A randomised study. *Lancet.* 2001;357:1576-82. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04725-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04725-5)
30. Kappos L, Polman CH, Freedman MS, Edan G, Hartung HP, Miller DH, *et al.* Treatment with interferon beta-1b delays conversion to clinically definite and McDonald MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology.* 2006;67:1242-9. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000237641.33768.8d>
31. Comi G, Martinelli V, Rodegher M, Muioli L, Bajenaru O, Carra A, *et al.* Effect of glatiramer acetate on conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndrome (PreCISE study): A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2009;374:1503-11. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61259-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61259-9)
32. Comi G, De Stefano N, Freedman MS, Barkhof F, Polman CH, Uitdehaag BM, *et al.* Comparison of two dosing frequencies of subcutaneous interferon beta-1a in patients with a first clinical demyelinating event suggestive of multiple sclerosis (REFLEX): A phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Neurol.* 2012;11:33-41. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70262-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70262-9)
33. Leist TP, Comi G, Cree BAC, Coyle PK, Freedman MS, Hartung H-P, *et al.* Effect of oral cladribine on time to conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with a first

- demyelinating event (ORACLE MS): A phase 3 randomised trial. *Lancet Neurol.* 2014;13:257-67. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70005-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70005-5)
34. Miller AE, Wolinsky JS, Kappos L, Comi G, Freedman MS, Olsson TP, *et al.* Oral teriflunomide for patients with a first clinical episode suggestive of multiple sclerosis (TOPIC): A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Neurol.* 2014;13:977-86. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70191-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70191-7)
 35. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, *et al.* A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2006;354:899-910. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa044397>
 36. Rudick RA, Stuart WH, Calabresi PA, Confavreux C, Galetta SL, Radue E-W, *et al.* Natalizumab plus interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2006;354:911-23. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa044396>
 37. Berger JR, Fox RJ. Reassessing the risk of natalizumab-associated PML. *J Neurovirol.* 2016;22:533-5. <https://doi.org/10.1007/s13365-016-0427-6>
 38. Major EO, Nath A. A link between long-term natalizumab dosing in MS and PML. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2016;3:e235. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000235>
 39. Bompreszi R, Pawate S. Extended interval dosing of natalizumab: A two-center, 7-year experience. *Ther Adv Neurol Disord.* 2014;7:227-31. <https://doi.org/10.1177/1756285614540224>
 40. Petržalka M, Meluzinová E, Mojžišová H, Libertínová J, Ročková P, Němá E, *et al.* Effectiveness of natalizumab extended interval dosing in multiple sclerosis patients. *Česká a Slov Neurol a Neurochir.* 2020;83/116. <https://doi.org/10.14735/amcsnn202079>
 41. Zhovtis Ryerson L, Frohman TC, Foley J, Kister I, Weinstock-Guttman B, Tornatore C, *et al.* Extended interval dosing of natalizumab in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2016;87:885-9. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2015-312940>
 42. Ryerson LZ, Foley J, Chang I, Kister I, Cutter G, Metzger RR, *et al.* Risk of natalizumab-associated PML in patients with MS is reduced with extended interval dosing. *Neurology.* 2019;93:e1452-e62. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000008243>
 43. Biogen. A study to evaluate efficacy, safety, and tolerability of EID of natalizumab (BG00002) in participants with RRMS switching from treatment with natalizumab SID in relation to continued SID treatment- followed by extension study comprising SC and IV natalizumab administration. 2020. Report No.: NCT03689972. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03689972>
 44. Freedman MS, Patry DG, Grand'Maison F, Myles ML, Paty DW, Selchen DH. Treatment optimization in multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci.* 2004;31:157-68. <https://doi.org/10.1017/s0317167100053804>
 45. Kalincik T, Buzzard K, Jokubaitis V, Trojano M, Duquette P, Izquierdo G, *et al.* Risk of relapse phenotype recurrence in multiple sclerosis. *Mult Scler J.* 2014;20:1511-22. <https://doi.org/10.1177/1352458514528762>
 46. Hirst C, Ingram G, Pearson O, Pickersgill T, Scolding N, Robertson N. Contribution of relapses to disability in multiple sclerosis. *J Neurol.* 2008;255:280-7. <https://doi.org/10.1007/s00415-008-0743-8>
 47. Kalincik T. Multiple sclerosis relapses: Epidemiology, outcomes and management. A systematic review. *Neuroepidemiology.* 2015;44:199-214. <https://doi.org/10.1159/000382130>
 48. Citterio A, La Mantia L, Ciucci G, Candelise L, Brusaferrri F, Midgard R, *et al.* Corticosteroids or ACTH for acute exacerbations in multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000;4:CD001331. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001331>
 49. Richert ND, Ostuni JL, Bash CN, Leist TP, McFarland HF, Frank JA. Interferon beta-1b and intravenous methylprednisolone promote lesion recovery in multiple sclerosis. *Mult Scler J.* 2001;7:49-58. <https://doi.org/10.1177/135245850100700109>
 50. Amaya-Nieto J, Girón-Luque F, Baez-Suárez Y. *Strongyloides stercoralis*; reporte de un caso en el post-trasplante renal. *Rev Med.* 2017;25:64-69. <https://doi.org/10.18359/rmed.2921>
 51. Greaves D, Coggle S, Pollard C, Aliyu SH, Moore EM. *Strongyloides stercoralis* infection. *BMJ.* 2013;347:f4610. <https://doi.org/10.1136/bmj.f4610>
 52. Keiser PB, Nutman TB. *Strongyloides stercoralis* in the immunocompromised population. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17:208-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.208-217.2004>

53. Ghosh K, Ghosh K. *Strongyloides stercoralis* septicaemia following steroid therapy for eosinophilia: Report of three cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007;101:1163-5. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.05.021>
54. Mejia R, Nutman TB. Screening, prevention, and treatment for hyperinfection syndrome and disseminated infections caused by *Strongyloides stercoralis*. *Curr Opin Infect Dis.* 2012;25:458-63. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3283551dbd>
55. Miravalle AA, Schreiner T. Neurologic complications of vaccinations. En: Biller J, Ferro JM. *Handbook of Clinical Neurology. Neurologic aspects of systemic disease. Part III.* 2014. p. 1549-57. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4088-7.00103-6>
56. Schonberger LB, Bregman DJ, Sullivan-Bolyai JZ, Keelyside RA, Ziegler DW, Retailiau HF, et al. Guillain-Barré syndrome following vaccination in the National Influenza Immunization Program, United States, 1976-1977. *Am J Epidemiol.* 1979;110:105-23. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a112795>
57. Stowe J, Andrews N, Miller E. Do vaccines trigger neurological diseases? Epidemiological evaluation of vaccination and neurological diseases using examples of multiple sclerosis, Guillain-Barré syndrome and narcolepsy. *CNS Drugs.* 2020;34:1-8. <https://doi.org/10.1007/s40263-019-00670-y>
58. Karussis D, Petrou P. The spectrum of post-vaccination inflammatory CNS demyelinating syndromes. *Autoimmun Rev.* 2014;13:215-24. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.10.003>
59. Torisu H, Okada K. Vaccination-associated acute disseminated encephalomyelitis. *Vaccine.* 2019;37:1126-9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.01.021>
60. Wildemann B, Jarius S, Hartmann M, Regula JU, Hametner C. Acute disseminated encephalomyelitis following vaccination against human papilloma virus. *Neurology.* 2009;72:2132-3. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181aa53bb>
61. Scheller NM, Svanström H, Pasternak B, Arnheim-Dahlström L, Sundström K, Fink K, et al. Quadrivalent HPV vaccination and risk of multiple sclerosis and other demyelinating diseases of the central nervous system. *JAMA.* 2015;313:54-61. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.16946>
62. Jakimovski D, Weinstock-Guttman B, Ramanathan M, Dwyer MG, Zivadivov R. Infections, vaccines and autoimmunity: A multiple sclerosis perspective. *Vaccines.* 2020;8:50. <https://doi.org/10.3390/vaccines8010050>
63. Farez MF. Yellow fever vaccination and increased relapse rate in travelers with multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 2011;68. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2011.131>
64. Huttner A, Eperon G, Lascano AM, Roth S, Schwob JM, Siegrist CA, et al. Risk of MS relapse after yellow fever vaccination. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2020;7:e726. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000726>
65. Raffel J, Wakerley B, Nicholas R. Multiple sclerosis. *Medicina (Buenos Aires).* 2016;44:537-41. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2016.06.005>
66. Gross RH, Corboy JR. Monitoring, switching, and stopping multiple sclerosis disease-modifying therapies. *Contin Lifelong Learn Neurol.* 2019;25:715-35. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000738>
67. Reich DS, Lucchinetti CF, Calabresi PA. Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 2018;378:169-80. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1401483>
68. Weideman AM, Tapia-Maltos MA, Johnson K, Greenwood M, Bielekova B. Meta-analysis of the age-dependent efficacy of multiple sclerosis treatments. *Front Neurol.* 2017;8:577. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00577>
69. Corboy J. Discontinuation of disease modifying therapies (DMTs) in multiple sclerosis (MS) (DISCOMS). (NCT03073603). 2021. Accessed: 1° de mayo de 2021. Available in: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03073603>
70. Willison HJ, Jacobs BC, van Doorn PA. Guillain-Barré syndrome. *Lancet.* 2016;388:717-27. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00339-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00339-1)
71. Farcas P, Avnun L, Frisher S, Herishanu Y, Wirguin I. Efficacy of repeated intravenous immunoglobulin in severe unresponsive Guillain-Barré syndrome. *Lancet.* 1997;350:1747. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(97\)24050-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(97)24050-x)
72. Verboon C, Doets AY, Galassi G, Davidson A, Waheed W, Péron Y, et al. Current treatment practice of Guillain-Barré syndrome. *Neurology.* 2019;93:e59-e76. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000007719>

73. Walgaard C, Jacobs BC, Lingsma HF, Steyerberg EW, Cornblath DR, van Doorn PA, *et al.* Second IVIg course in Guillain-Barré syndrome patients with poor prognosis (SID-GBS trial): Protocol for a double-blind randomized, placebo-controlled clinical trial. *J Peripher Nerv Syst.* 2018;23:210-5. <https://doi.org/10.1111/jns.12286>
74. van Doorn PA, Kuitwaard K, Walgaard C, van Koningsveld R, Ruts L, Jacobs BC. IVIG treatment and prognosis in Guillain-Barré syndrome. *J Clin Immunol.* 2010;30(Suppl.1):S74-8. <https://doi.org/10.1007/s10875-010-9407-4>
75. Hughes RAC, Swan AV, Raphael JC, Annane D, van Koningsveld R, van Doorn PA. Immunotherapy for Guillain-Barre syndrome: A systematic review. *Brain.* 2007;130:2245-57. <https://doi.org/10.1093/brain/awm004>
76. Dionne A, Nicolle MW, Hahn AF. Clinical and electrophysiological parameters distinguishing acute-onset chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy from acute inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Muscle Nerve.* 2010;41:202-7. <https://doi.org/10.1002/mus.21480>
77. Alessandro L, Pastor-Rueda JM, Wilken M, Querol L, Marrodán M, Acosta JN, *et al.* Differences between acute-onset chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy and acute inflammatory demyelinating polyneuropathy in adult patients. *J Peripher Nerv Syst.* 2018;23:154-8. <https://doi.org/10.1111/jns.12266>
78. Ruts L, van Koningsveld R, van Doorn PA. Distinguishing acute-onset CIDP from Guillain-Barré syndrome with treatment related fluctuations. *Neurology.* 2005;65:138-40. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000167549.09664.b8>
79. Chen ES, Moller DR. Sarcoidosis—scientific progress and clinical challenges. *Nat Rev Rheumatol.* 2011;7:457-67. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2011.93>
80. Kraaijevanger R, Janssen Bonás M, Vorselaars ADM, Veltkamp M. Biomarkers in the diagnosis and prognosis of sarcoidosis: Current use and future prospects. *Front Immunol.* 2020;11:1443. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01443>
81. Oksanen V, Fyhrquist F, Somer H, Gronhagen-Riska C. Angiotensin converting enzyme in cerebrospinal fluid: A new assay. *Neurology.* 1985;35:1220-3. <https://doi.org/10.1212/wnl.35.8.1220>
82. Dale JC, O'Brien JF. Determination of angiotensin-converting enzyme levels in cerebrospinal fluid is not a useful test for the diagnosis of neurosarcoidosis. *Mayo Clin Proc.* 1999;74:535. <https://doi.org/10.4065/74.5.535>
83. Tahmoush AJ, Amir MS, Connor WW, Farry JK, Didato S, Ulhoa-Cintra A, *et al.* CSF-ACE activity in probable CNS neurosarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2002;19:191-7.
84. Khoury J, Wellik KE, Demaerschalk BM, Wingerchuk DM. Cerebrospinal fluid angiotensin-converting enzyme for diagnosis of central nervous system sarcoidosis. *Neurologist.* 2009;15:108-11. <https://doi.org/10.1097/NRL.0b013e31819bcf84>
85. Bridel C, Courvoisier DS, Vuilleumier N, Lalive PH. Cerebrospinal fluid angiotensin-converting enzyme for diagnosis of neurosarcoidosis. *J Neuroimmunol.* 2015;285:1-3. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.05.020>