

# Factores relevantes sobre el ensayo RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2, virus causante del COVID-19

DOI 10.5377/alerta.v4i1.10060

Evelyn Patricia Vásquez Rodríguez<sup>1</sup>  
Alexis Antonio Guadrón Meléndez<sup>2</sup>  
Rosario de Jesús Cruz Aguilar<sup>3</sup>  
Tania Ethel Cuadra Zelaya<sup>4\*</sup>

1-4 Departamento de Bioquímica y Contaminación Ambiental de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, San Salvador.

\*Correspondencia

✉ tania.cuadra@ues.edu.sv

1.  0000-0003-0452-7515,
2.  0000-0001-5906-7718,
3.  0000-0002-6336-3103,
4.  0000-0002-3043-848X,

## Resumen

La disponibilidad de la secuencia de SARS-CoV-2 desde enero de 2020, permitió la implementación de ensayos de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real para la detección de este virus. Diversos tipos de muestra, reactivos y condiciones han sido estandarizados en diferentes países para utilizar este ensayo como prueba confirmativa de pacientes con COVID-19, siguiendo las indicaciones establecidas por la OMS en virtud de su alta sensibilidad y especificidad. Las condiciones generales para obtener resultados confiables de su aplicación implican detalles como la obtención de ácidos nucleicos en cantidad y pureza adecuadas de muestras que indiquen inequívocamente la presencia del virus en el paciente, incluso en etapas tempranas de la infección. El presente artículo presenta técnicas y procedimientos empleados por diferentes protocolos disponibles para la detección de SARS-CoV-2 mediante ensayos RT-PCR, efectuando comparaciones de parámetros de desempeño que permiten reconocer estrategias que pueden ser utilizadas en la mejora de este tipo de pruebas diagnósticas.

## Palabras clave

Reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa reversa, coronavirus, técnicas y procedimientos diagnósticos, aislamiento y purificación, sensibilidad y especificidad.

## Abstract

Availability of the SARS-CoV-2 sequence since January 2020, allowed the implementation of reverse-transcriptase polymerase chain reaction assays in real time to detect the virus. Diverse sample types, reagents and conditions have been standardized in different countries to use the assay as a confirmative test of patients with COVID-19, following the indications established by WHO due to its high sensitivity and specificity. General conditions to achieve reliable results from this test involve factors such as the acquisition of nucleic acids with acceptable quality and quantity, from suitable samples that unequivocally indicate the presence of the virus in patients even at early stages of the infection. This article describes diagnostic techniques and procedures used by different available protocols for the detection of SARS-CoV-2 through RT-PCR assays, comparing performance parameters, which allow to recognize strategies that can be used to improve this type of diagnostic tests.

## Keywords

Reverse transcriptase polymerase chain reaction, coronavirus, diagnostic techniques and procedures, isolation and purification, sensitivity, and specificity.

 ACCESO ABIERTO

**Relevant factors of the RT-PCR assay for the detection of SARS-CoV-2, etiologic agent of COVID-19**

### Citación recomendada:

Vásquez Rodríguez EP, Guadrón Meléndez AA, Cruz Aguilar RJ, Cuadra Zelaya TE. Factores relevantes sobre el ensayo RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2, virus causante del COVID-19. Alerta 2021;4(1):31-39. DOI 10.5377/alerta.v4i1.10060.

### Recibido:

23 de julio de 2020

### Aceptado:

5 de octubre de 2020

### Publicado:

22 de enero 2021

### Contribución de autoría:

EPVR<sup>1</sup>, AAGM<sup>2</sup>, RJCA<sup>3</sup>, TECZ<sup>4</sup>. Todos contribuyeron en igual medida a la búsqueda de información y redacción del manuscrito.

### Conflicto de intereses:

Los autores declaran que no tienen ningún interés comercial o asociativo que presente un conflicto de intereses con el trabajo presentado.

## Introducción

A inicios de 2020, el patógeno causante de la enfermedad COVID-19 es detectado a través de la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR, por sus siglas en inglés), el cual es el ensayo establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>1</sup> como prueba confirmativa de la presencia del coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2). La rápida propagación de la enfermedad requiere que el ensayo de detección aplicado sea capaz de detectar niveles bajos del patógeno, de forma específica y sensible con diferentes tipos de muestra. Esta revisión describe los tipos de muestra evaluadas para confirmar COVID-19, su manejo y las características de desempeño de protocolos publicados por diferentes laboratorios a nivel mundial.

### Muestras utilizadas para la detección del SARS-CoV-2 mediante RT-PCR

Los hisopados nasofaríngeos y orofaríngeos son las muestras típicamente usadas para confirmar la presencia de SARS-CoV-2 mediante RT-PCR<sup>2</sup>. Sin embargo, el virus también se ha detectado en especímenes de otros sitios, a través de los cuales se han alcanzado diferentes eficiencias de detección<sup>3</sup>.

Por la facilidad de su recolección en pacientes y bajo riesgo infeccioso para proveedores de salud, la saliva es una muestra potencial en la detección de SARS-CoV-2 y virus similares. Diferentes estudios confirman la utilidad de la saliva proveniente de la garganta para el diagnóstico precoz y monitoreo rutinario de COVID-19, especialmente en situaciones en las que la recolección de muestras nasofaríngeas puede estar contraindicada<sup>4,5</sup>. Los centros de investigación y agencias de salud podrían utilizar esta metodología de recolección ya que requiere de la utilización de un equipo mínimo<sup>6</sup>. Por otro lado, resultados sobre la efectividad en el caso de saliva procedente de glándulas salivales todavía no son los esperados<sup>7</sup>.

Las secreciones conjuntivales también han sido evaluadas, encontrándose que solo los pacientes con manifestaciones clínicas de conjuntivitis evidencian la presencia de SARS-CoV-2 en sus muestras<sup>8</sup>.

Uno de los estudios más completos sobre la eficiencia de detección de este virus mediante la prueba RT-PCR, evaluó diferentes tipos de muestra de pacientes con diagnóstico clínico de COVID-19, e indicó que el fluido de lavado broncoalveolar y esputo produjeron la mayor cantidad de

resultados positivos, seguidos de los hisopados nasales, biopsias con cepillo de fibrobroncoscopio e hisopados faríngeos, y con menor porcentaje de hallazgo en muestras de heces y sangre. No fue posible detectar el virus en muestras de orina<sup>3</sup>. Lo anterior es consistente con la alta expresión génica de la Enzima Convertidora de Angiotensina 2 (receptor celular del virus) en células del tracto respiratorio, especialmente en células calciformes y ciliadas de los epitelios nasales, células alveolares y en células de córnea, esófago, íleon, colon, hígado, vesícula, riñones y testículos<sup>9</sup>.

Los sobrenadantes de cultivos celulares también han mostrado su utilidad como muestras de estudio de SARS-CoV-2 y otros virus, además de muestras fecales de reservorios animales posiblemente transmisores de estos tipos de coronavirus<sup>10-12</sup>.

### Métodos de extracción de ARN para detectar coronavirus

La extracción cuantitativa de ácidos nucleicos con alta pureza a partir de muestras complejas es el requisito previo para ensayos de RT-PCR eficientes y es un paso crucial en el uso de técnicas moleculares para la detección eficiente de virus en muestras clínicas. Tanto las concentraciones virales absolutas como relativas determinarán el éxito de los ensayos moleculares posteriores. En el caso de trabajar muestras con niveles bajos de virus, se deberán aplicar estrategias especiales para tener mayores probabilidades de detección tales como: homogeneización o digestión enzimática de muestras sólidas o viscosas; técnicas de filtración y centrifugación diferencial. Además, se necesitará el uso de endonucleasas para liberar genomas de las partículas virales protegidos por nucleocápsides. Todos estos pasos aumentarán la concentración absoluta y relativa de los ácidos nucleicos virales antes de su extracción<sup>13</sup>.

Una baja eficiencia de extracción puede dar señales pobres durante la amplificación exponencial y, por lo tanto, dar resultados falso-negativos<sup>13,14</sup>. La baja calidad de extracción, por otro lado, puede contener una variedad de inhibidores de la PCR, lo que proporciona lecturas poco confiables durante la amplificación<sup>15,16</sup>. Por estas razones, la selección de un método de extracción será un paso fundamental para el éxito en la detección de SARS-CoV-2.

Actualmente se utilizan dos métodos principales de extracción de ARN previo a la RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2: la cromatografía de columna y la aplicación de partículas magnéticas.

La extracción utilizando cromatografía por columna se basa en la adsorción reversible del ácido nucleico a un soporte de sílice (membrana) bajo condiciones determinadas de pH y fuerza iónica que permite su limpieza y posterior recuperación<sup>17</sup>. Por otro lado, el uso de partículas construidas con componentes de naturaleza magnética se fundamenta en la unión rápida y reversible del ácido nucleico a estas, seguida de la aplicación de un campo magnético externo que permite la separación del complejo partícula-ARN de la fase líquida de la muestra, logrando así su aislamiento y purificación<sup>18</sup>.

Una evaluación de la extracción de ARN de SARS-CoV-2 a partir de muestras del tracto respiratorio superior (hisopados nasofaríngeos) utilizando un kit de extracción por columnas (como control) y uno con perlas magnéticas, demostró resultados equivalentes con un 100 % de sensibilidad y especificidad<sup>19</sup>.

El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos de América<sup>21</sup> (CDC, por sus siglas en inglés), autoriza el uso de diferentes kits disponibles comercialmente y además reporta pruebas que califican el desempeño de estos en la recuperación ARN del virus a partir de las muestras y su utilidad en los ensayos moleculares subsecuentes (Tabla 1)<sup>21</sup>. Entre los kits mencionados en la tabla hay algunos como el mini kit QIAamp® Viral RNA cuyo uso ha mostrado ser exitoso en diferentes publicaciones<sup>10,12,21</sup>.

Además, aunque de menor uso, también se ha demostrado la utilidad de metodologías de extracción por solventes, en el aislamiento de ácidos nucleicos virales<sup>20</sup>. Estos métodos se basan en el uso de soluciones de lisis, separación de solutos por solubilidad y separación de fases líquidas mediante ciclos de centrifugación<sup>23</sup>. En los momentos actuales, la carencia de soluciones de lisis es un problema común en los laboratorios y parte esencial para lograr la extracción de ARN de SARS-CoV-2 de alta calidad y pureza. A través de un estudio multicéntrico se evaluaron diferentes formulaciones de soluciones de lisis verificando el desempeño de los ácidos nucleicos obtenidos a través de RT-PCR. Los ensayos demostraron la adecuabilidad de los ácidos nucleicos obtenidos a través del uso de un tampón de lisis con GITC (tiocianato de guanidina) 4 M y Tritón X-100 al 3 % (v/v), comparando incluso con otras soluciones de extracción comerciales. Este tampón de lisis, además, incluye un detergente que ayuda a desintegrar el virus durante la extracción y azul de bromofenol, como ayuda visual para la adición de este reactivo a las muestras clínicas (composi-

ción: GITC 4M, Tris-HCl 55mM, EDTA 25mM, Tritón X-100 3 % (v/v), Azul de bromofenol 0.01 % p/V)<sup>24</sup>.

Dada la importancia de evaluar la eficiencia de extracción de muestras heterogéneas y con resultados de detección viral variables, se realizó un estudio que evaluó 8 métodos, entre manuales y automatizados, para la detección óptima de ARN de SARS-CoV por RT-PCR en muestras de heces. Los métodos automáticos evidenciaron una sensibilidad del 100 %, mientras que los métodos manuales evidenciaron sensibilidades entre el 50 y 91,7. La investigación resalta la importancia de aplicar el conocimiento sobre carga viral en los pacientes y muestras, el uso de procedimientos estándar, pero también la capacidad de cada método, ya que es lo que llevará a obtener los mejores resultados en la detección de ARN viral<sup>25</sup>.

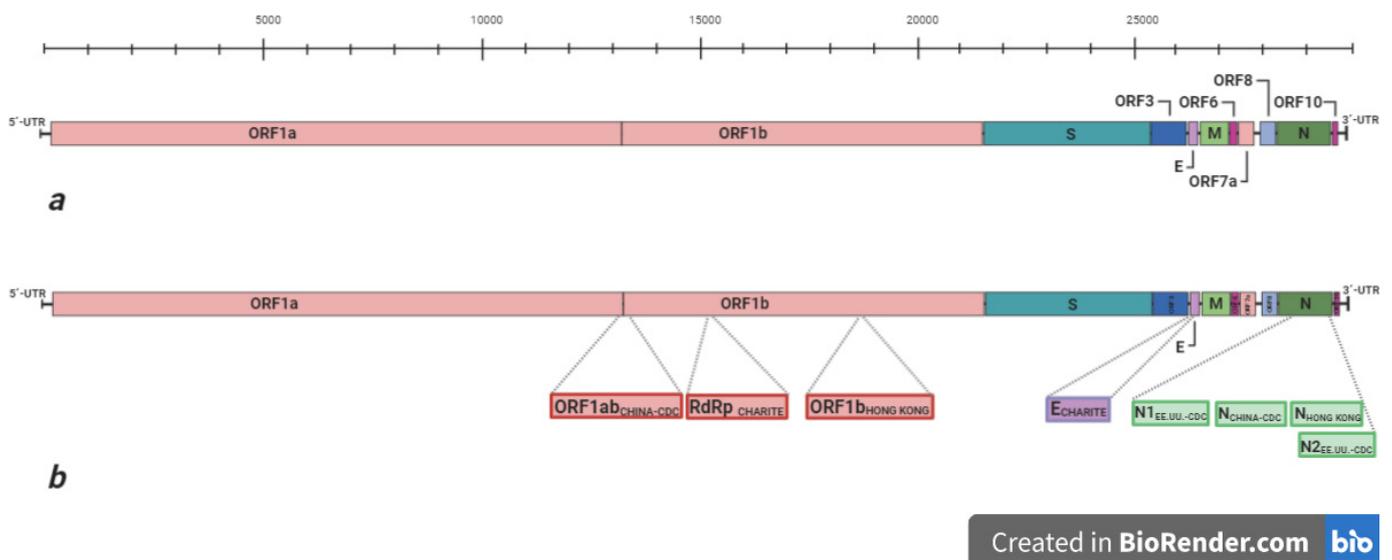
## Ensayo RT-PCR para detectar SARS-CoV-2

La RT-PCR es una técnica de laboratorio que permite la identificación, detección y cuantificación de ARN, utilizando este como molde para sintetizar ADN complementario (ADNc), el cual a su vez constituye la plantilla para una reacción de PCR en tiempo real. El aumento exponencial en las copias de ADN se ve reflejado en la aparición de fluorescencia cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad de ARN en la muestra, haciendo que esta reacción sea altamente sensible aun a bajas concentraciones de ácidos nucleicos virales.

Los genes de coronavirus anotados hasta ahora incluyen: ORF1 (marco de lectura abierta 1) que comúnmente es representado en secciones a y b, N (nucleocápside), M (membrana), E (envoltura viral), S (espiga viral), y ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP- por sus siglas en inglés), presente en el ORF1b<sup>1,26,27</sup> (Figura 1). Los científicos enfatizan que la selección de estos blancos genómicos para pruebas RT-PCR se debe a que son regiones persistentes en los coronavirus, pero con ciertas porciones específicas para SARS-CoV-2; lo que permite entregar resultados consistentes a medida que la pandemia progresa e intrínsecamente mientras el virus sufre mutaciones<sup>10,30</sup>. En toda metodología analítica, especialmente en estos casos de detección de patógenos relevantes, es importante considerar aspectos como la sensibilidad, especificidad y límite de detección (LD). En la tabla 2, se describen las características generales y los parámetros de desempeño mencionados de diferentes protocolos para la confirmación de COVID-19 utilizadas en la actualidad (Tabla 2).

**Tabla 1.** Kits comerciales validados (13 de julio de 2020) por el EE.UU.-CDC para la extracción de ARN de SARS-CoV-21

Nombre comercial	Tipo de muestras	Método de extracción
mini kit QIAamp® Viral RNA	Fluidos corporales libres de células	Columna con membrana de sílice
QIAamp® DSP Viral RNA Mini Kit	Fluidos corporales libres de células, plasma (tratado con anticoagulantes que no sean heparina) o suero	Columna con membrana de sílice
EZ1® DSP Virus Kit and Buffer AVL	Suero humano, plasma, líquido cefalorraquídeo (LCR), orina, sangre completa, heces, medios de transporte, muestras respiratorias y torundas secas	Partículas magnéticas
Roche MagNA Pure™ Total Nucleic Acid Kit*	Suero, plasma y sangre completa	Partículas magnéticas de vidrio
Roche MagNA Pure™ 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit	Sangre entera de mamífero, suero, plasma, orina, esputo, hisopos, heces, lavado broncoalveolar (BAL), líquido cefalorraquídeo (LCR) y cultivos bacterianos (con o sin opción de lisis externa)	Partículas de vidrio magnético



Created in BioRender.com

**Figura 1.** Estructura del genoma de SARS-CoV-2 con base en la secuencia publicada en GenBank (Número de acceso: MN975262)27,28. Creada en BioRender.com a. Marcos de lectura abierta (ORF) 1a, 1b, 3, 6, 7a y 16 proteínas no estructurales. Los genes S, E, M y N indican las cuatro proteínas estructurales: espiga (S), envoltura (E), membrana (M) y nucleocápside (N). b. Se muestran las secuencias anotadas y las posiciones aproximadas de los sets de primers y sondas utilizados para la detección mediante RT-PCR en los protocolos revisados en este artículo10-12,21.

**Tabla 2.** Condiciones de reacción de RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2

Entidad	Secuencia de Primers y Sonda* de los blancos genéticos	Mezcla para qRT-PCR	Condiciones de amplificación	
Universidad de Hong Kong, Hong Kong <sup>10</sup>	ORF1b	F 5'-TGGGGYTTTACRGGTAACCT-3'(Y = C/T, R = A/G)	Una mezcla de 20 µL de monoplex RT-PCR contenía: 5 µL de master mix de reacción 4X (TaqMan® Fast Virus Mezcla maestra de 1 paso, ThermoFisher), 0,5 µmol/L por cada primer forward y reverse, 0,25 µmol/L de sonda y 4 µL de muestra de ARN.	Transcripción inversa a 50 °C durante 5 min, inactivación de la transcriptasa inversa a 95 °C durante 20 s, 40 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95 °C durante 5 s; alineación/ extensión a 60 °C por 30 s).
		R 5'-AACRCGCTTAACAAAGCACTC-3'(R = A/G) -		
		P 5'-TAGTTGTGATGCWATCATGACTAG-3' (En 5'-FAM/ZEN/3'-IBFQ; W = A/T)		
	N	F 5'-TAATCAGACAAGGAACTGATTA-3'		
		R 5'-CGAAGGTGTGACTTCCATG-3'		
		P 5'-GCAAATTGTGCAATTTGCGG-3' (En 5'-FAM/ZEN/3'-IBFQ)		

China-CDC <sup>12</sup>	ORF1ab	F	5'-CCCTGTGGGTTTTACACTAA-3'	Una mezcla de reacción de 25 µL contenía 12,5 µL de 2x Master Mix OneStep PrimeScript™ RT-PCR (Takara, Japón), 0,5 µL de transcriptasa inversa / mezcla de ADN polimerasa Taq, 5 µL de ARN extraído, concentraciones de 400 nmol/L de primers, y 200 nmol/L de sonda.	El ciclo térmico incluyó 42 °C x 5 min, seguido de 95 °C x 10 segundos y luego 40 ciclos de 95 °C durante 10 s y 60 °C durante 45 s. Cada ejecución incluyó un control de plantilla genómica SARS-CoV-2 y al menos dos controles negativos o simulados (para la extracción y el paso de amplificación por PCR).			
		R	5'-ACGATTGTGCATCAGCTGA-3'					
		P	5'-FAM-CCGTCTGCGGTATGTGGAAAGTTATGG-BHQ1-3'					
	N	F	5'-GGGGAACCTTCTCTGCTAGAAT-3'					
		R	5'-CAGACATTTGCTCTCAAGCTG-3'					
		P	5'-FAM-TTGCTGCTGCTTGACAGATT-BHQ1-3'					
EE.UU.-CDC <sup>21</sup>	N1	F	5'-GACCCAAAATCAGCGAAAT-3'	N es el factor de conversión del volumen de reactivo por reacción, si n < 15, N es n+1; si n = 15, N es n+2. Una reacción contiene 5,5 µL de ARN extraído, 1,5 µL de primers/sonda, kit de RT-PCR según el detalle: Master mix Thermo Fisher TaqPath™ (5,0 µL); Sistema PromegaGoTaq® Probe (10,0 µL del master mix con dUTP, 0,4 µL de Go Script RT Mix); UltraPlex™ ToughMix® (4x) Quantabio. (5,0 µL)	Termofisher, lleva a cabo 4 etapas: la retro transcripción a 25 °C x 2 min y la inactivación a 50 °C x 15 min. Luego la desnaturalización a 95 °C x 2 min, y 45 ciclos a 95 °C x 3s y a 55 °C x 30 s. Promega GoTaq® realiza la retro transcripción a 45 °C x 15 min y la inactivación a 95 °C x 2 min. Luego 45 ciclos a 95 °C x 3 s y a 55 °C x 30 s. Quantabio qScript™ realiza la retro transcripción a 50 °C x 10 min y la inactivación a 95 °C x 2 min. Luego 45 ciclos a 95 °C x 3s y a 55 °C x 30 s.			
		R	5'-TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG-3'					
		P	5'-FAM-ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC-BHQ1***					
	N2	F	5'-TTACAAACATTGGCCGCAAA-3'					
		R	5'-GCGCGACATCCGAAGAA-3'					
		P	5'-FAM-ACAATTTGCCCGCAGCGCTCAG-BHQ1***					
	RP	F	5'-AGATTTGGACCTGCGAGCG-3'					
		R	5'-GAGCGGCTGTCTCCACAAGT-3'					
		P	5'-FAM-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-BHQ-1***					
	Alemania (Charité) <sup>11</sup>	RdRP	F			5'-GTGARATGGTCATGTGTGGCGG-3'(R=G/A)	Una reacción de 25 µL contenía 5 µL de ARN, 12,5 µL de 2 x tampón de reacción provisto con el sistema Superscript III RT-PCR de un solo paso con Platinum™ Taq Polymerase (Invitrogen, Darmstadt, Alemania; conteniendo 0,4 mM de cada trifosfato de desoxirribonucleotidos y 3,2 mM de sulfato de magnesio), 1 µL de mezcla de transcriptasa inversa / Taq del kit, 0,4 µL de una solución de sulfato de magnesio 50 mM (Invitrogen), y 1 µg de albúmina de suero bovino no acetilado (Roche).	El ciclo térmico se realizó a 55 °C durante 10' para la transcripción inversa, seguido de 95 °C durante 3' y luego 45 ciclos de 95 °C durante 15 s, 58 °C durante 30 s.
			R			5'-CARATGTTAAASACACTATTAGCATA-3'(R=G/A, S=G/C)		
			P <sub>1</sub>			5'-FAM-CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC-BBQ-3'(W=A/T, M=A/C, R=G/A)		
P <sub>2</sub>			5'-FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ-3'					
E		F	5'-ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT-3					
		R	5'-ATATTGCAGCAGTACGCACACA					
		P	5'-FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ					
N		F	5'-CACATTGGCACCCGCAATC-3'					
		R	5'-GAGGAACGAGAAGAGGCTTG-3'					
		P	5'-FAM-ACTTCTCAAGGAACAACATTGCCA-BBQ-3'					

\*F: Forward, R: Reverse, P: Sondas. \*\*Las sondas TaqMan® están marcadas en el extremo 5' con la molécula reportera 6-carboxifluoresceína (FAM) y con el inhibidor, Black Hole Quencher 1 (BHQ-1) (Biosearch Technologies, Inc., Novato, CA) en el 3'-final.

Chu *et al.* (2020)<sup>10</sup> diseñaron un ensayo RT-PCR dirigido a amplificar las regiones ORF1b y N del genoma viral, basándose en el alineamiento de las secuencias de SARS-

CoV-2 (Genbank MN908947), con las de otros coronavirus tipo SARS encontrados en humanos y murciélagos. Se evaluó la especificidad del ensayo amplificando ARN ex-

traído de: coronavirus humanos cultivados, muestras respiratorias humanas positivas para virus endémicos y esputo de pacientes sin infecciones virales respiratorias. El ensayo fue específico para los virus del subgénero *Sarbecovirus* (incluyendo SARS-CoV-2), posiblemente debido a la insuficiente información de SARS-CoV-2 en el momento del diseño de la prueba y con el afán de los investigadores de considerar eventos de diversidad genética del virus.

La sensibilidad se evaluó en muestras de hisopado de garganta recolectadas entre 3 y 5 días posteriores al inicio de síntomas. Diluciones de ARN hasta el cuarto orden ( $10^{-4}$ ) permitieron detectar el gen que codifica la proteína N en todas las diluciones y el ORF1b hasta la tercera dilución, sugiriendo que la detección de N es 10 veces más sensible que la de ORF1b. El LD se calculó utilizando como molde plásmidos conteniendo las secuencias anotadas, diluidos en serie hasta el séptimo orden ( $10^{-7}$ ), observándose eficiencias de amplificación de 99,6 % y 95,4 % para ORF1b y N, respectivamente. Adicionalmente, estos resultados de LD se determinaron en muestras con 10 o más copias de las secuencias de interés en reacciones con un mínimo de 35 ciclos de amplificación<sup>10</sup>.

Las pruebas RT-PCR para la detección de COVID-19 desarrolladas por los CDC de China<sup>12,31</sup>, se basan en el análisis de dos genomas completos de SARS-CoV-2 obtenidos en sus laboratorios (números de acceso en GISAID EPI\_ISL\_402119 y EPI\_ISL\_402120)<sup>32</sup>. Las secuencias seleccionadas como objetivo fueron las correspondientes al ORF1ab y los genes que codifican las proteínas E y N. Además, los primers y sondas correspondientes al gen RdRp diseñados anteriormente<sup>33</sup> fueron utilizados como referencia, por su capacidad de amplificación de alfa y betacoronavirus procedentes de murciélago<sup>34</sup>. La especificidad de los ensayos se determinó experimentalmente usando ARN de 6 cepas de coronavirus endémicos en humanos y una cepa de influenza A. Los resultados mostraron la especificidad de los ensayos para la detección del ORF1ab y del gen N; sin embargo, se observó que los dirigidos a detectar los genes E y RdRp no solo amplificaban las secuencias de SARS-CoV-2 sino que también las de SARS-CoV. El LD se evaluó mediante la elaboración de curvas de calibración de cada gen buscado, utilizando una reserva de ARN de SARS-CoV-2 con copias genómicas predeterminadas.

Los autores indicaron que los ensayos bajo las condiciones propuestas son capaces de detectar un mínimo de 0,2 copias de ORF1ab por  $\mu\text{L}$  y 0,7 copias de los genes N y E por  $\mu\text{L}$ , en reacciones con un máximo de

37 ciclos. Para evaluar la sensibilidad de la detección se prepararon diluciones seriadas 1:10 de ARN obtenido a partir de muestras clínicas, a través de lo cual se evidenció la capacidad de detectar el ORF1ab y los genes E y N bajo las condiciones de reacción en todas las diluciones hasta las 1 en 10 000, mientras que el gen RdRp solamente pudo ser detectado hasta la dilución 1 en 1000, indicando ser la reacción menos sensible de las cuatro. Además, si bien evaluaron la sensibilidad de los ensayos en diferentes muestras clínicas, no estandarizaron la carga viral entre ellas, por lo que no se puede inferir acerca de la sensibilidad del método sobre cada matriz, sino más bien sobre la posible carga viral intrínseca de cada muestra<sup>12,34</sup>.

Corman *et al.* (2020)<sup>19</sup> ensayaron la detección de SARS-CoV-2 con los genes que codifican las proteínas E, N y la enzima RdRp. Primers y sondas fueron diseñados a partir de alineaciones de 375 secuencias de coronavirus tipo SARS procedentes de Genbank, las del genoma del virus publicadas en virological.org y GISAID. Para determinar la especificidad de los ensayos diseñados, determinaron: la estabilidad química de los oligonucleótidos para excluir la reactividad entre sí; la reactividad cruzada realizando los ensayos de E y RdRp con ARN de cultivos celulares de cinco coronavirus endémicos humanos; y la exclusividad realizando los mismos ensayos que en la reactividad cruzada, pero con 297 muestras clínicas positivas a virus respiratorios provenientes de biobancos en Europa y Asia.

En la estabilidad química, los oligonucleótidos no mostraron producir fluorescencia al reaccionar entre sí. En la reactividad cruzada ninguno de los virus o preparaciones de virus diferentes a SARS-CoV-2 probados, mostró reactividad con ninguno de los dos ensayos. En los ensayos de exclusividad, la mayoría de las reacciones no indicaron eventos de detección de falsos positivos. Sin embargo, señala que podrían observarse problemas de detección falsa causados por el manejo rápido de muestras y/o introducción de nuevas pruebas y controles de diagnóstico durante el desarrollo de los ensayos.

Se evaluó la sensibilidad analítica del ensayo por duplicado utilizando sobrenadante de cultivos celulares de viriones de Frankfurt-1 de cepa SARS-CoV-2, cultivados en células Vero. El sobrenadante se concentró 20 veces su volumen inicial y se purificó. Todos los ensayos fueron altamente sensibles, obteniéndose 5,2 copias por reacción para el ensayo del gen E y 3,8 copias por reacción del gen RdRp, con una probabilidad de detección del 95 % para ambos (no se reportaron los resultados obtenidos para

N). Adicionalmente diseñaron una sonda para RdRp (RdRP\_SARSr-P1) que detecta SARS-CoV y SARS-CoV-2, que en conjunto con la sonda específica para SARS-CoV-2 (RdRP\_SARSr-P2) permitieron discriminar en la muestra la presencia de ambos virus. El LD se determinó utilizando ARN genómico de SARS-CoV y transcritos sintéticos de ARN del gen E y RdRp de SARS-CoV-2. Las gráficas de los resultados indicaron límites de detección para el gen E de 3,9 copias por reacción y del gen RdRp de 3,6 copias por reacción, con un 95 % de confianza con intervalos de 2,8 - 9,8 y de 2,7 - 11,7, respectivamente.

El gen N (regiones N1 y N2) es el blanco elegido para las pruebas RT-PCR confirmativas de COVID-19 por los CDC de los EE.UU.<sup>21</sup>. Además, seleccionaron el gen RP (ARNasa humana) como control del ensayo. Los primers se diseñaron con base en el alineamiento de las secuencias de SARS-CoV-2 disponibles en GenBank (a febrero 2020), concordantes al 100 % con estas a excepción del primer forward N1, que presenta una discordancia nucleotídica y según los autores implica riesgos mínimos de falsos positivos. La especificidad de estos ensayos fue evaluada solamente *in silico*: se usó la plataforma BLASTn para comparar las secuencias de los primers y sondas contra secuencias nucleotídicas de dominio público y se evaluaron parámetros de concordancia y de penalización, para crear y extender espacios para el alineamiento.

Los resultados de esta comparación mostraron homología del primer forward N2 y la sonda N1 para coronavirus de murciélagos relacionados con SARS y SARS-CoV. No obstante, al realizar el análisis combinando primers y sondas, no hubo predicción de falsos positivos potenciales. Adicionalmente, la especificidad de N1 y N2 fue evaluada contra preparaciones de títulos conocidos de 20 agentes infecciosos que incluían virus y bacterias asociados a enfermedades respiratorias, mostrando no amplificar en reacciones con dichos agentes infecciosos. Para la determinación del LD se añadieron títulos conocidos de ARN sintéticos correspondientes al gen N de SARS-CoV-2 (GenBank: MN908947.2) a un diluyente (suspensión de células humanas A549 y medio de transporte viral), simulando una muestra clínica. Se ensayó la detección del ARN extraído (con una concentración de 3 copias de ARN/ $\mu$ L) y dos diluciones seriadas 1:3 y 1:9 con 20 réplicas.

El LD del ensayo N2 fue de 0,3 copias de ARN por  $\mu$ L, con al menos 36 ciclos, y para el ensayo N1 fue de 1 copia por  $\mu$ L, con al menos 33 ciclos, ambos con el kit de extracción QIAGEN® DSP Viral RNA Mini Kit (95 %

de confianza). Adicionalmente, se evaluó la equivalencia del LD de los dos genes en diferentes químicas de fluorescencia, mediante la preparación triplicada de diluciones seriadas 1:10, 1:100 y 1:1000, partiendo de una solución de 100 copias/ $\mu$ L de ARN de las secuencias de interés. El LD fue de 1 copia de ARN/ $\mu$ L para ambos ensayos con cada máster mix, exceptuando la versión BHQ de Promega GoTaq®, que requiere al menos 10 copias de ARN/ $\mu$ L<sup>21</sup>.

## Conclusión

La selección de la muestra y el método de extracción de sus ácidos nucleicos son factores importantes que influirán sobre el éxito de ensayos moleculares de RT-PCR para la detección de virus.

De los cuatro ensayos para la confirmación de COVID-19 analizados en este artículo, todos muestran niveles de especificidad de altos a medios para distinguir entre SARS-CoV-2 de otros virus causantes de afecciones respiratorias en diferentes muestras. La sensibilidad y el límite de detección muestran ser muy buenos pudiéndose detectar, en algunos casos, desde menos de una copia de ARN blanco por microlitro, lo que avala este tipo de prueba como un ensayo de elección para confirmar la presencia del virus. La diversidad de genes blanco y de control propuestos, han permitido distinguir entre SARS-CoV-2, otros coronavirus y el ARN de hospederos infectados, lo cual es indispensable ante la perspectiva de la aparición de nuevas especies de betacoronavirus patógenos para la humanidad.

## Agradecimientos

Agradecemos al Viceministerio de Ciencia y Tecnología del Ministerio de Educación por la beca parcial otorgada a Evelyn Vásquez para estudiar el Doctorado en Biología Molecular, a la Secretaría de Investigaciones Científicas y demás entidades de la Universidad de El Salvador vinculadas con los programas de Posgrado en Biología Molecular (CENSALUD, Facultades de Química y Farmacia, Ciencias Agronómicas, Medicina, Ciencias Naturales y Matemática, y Odontología), que nos incentivan a emprender investigaciones sobre la temática presentada.

## Financiamiento

No se requirió financiamiento para la consecución de la información. Toda se obtuvo a través de las bases de datos y nexos de la Universidad de El Salvador.

## Referencias bibliográficas

1. World Health Organization. Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases. Genova, Suiza. Who Global web page. Interim Guid. 2020;1–7. Fecha de consulta: 2 octubre 2020. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/10665-331501>
2. 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(11):1061. DOI:10.1001/jama.2020.1585
3. Wang W, Xu Y, Gao, *et al.* Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA*. 2020;323(18): 1843–1844. DOI: 10.1001 / jama.2020.3786
4. To KK-W, Tsang OT-Y, Yip CC-Y, Chan K-H, Wu T-C, Chan JM-C, et al. Consistent Detection of 2019 Novel Coronavirus in Saliva. *Clinical Infectious Diseases*. Oxford University Press (OUP); 2020;71(15):841–3. DOI: 10.1093/cid/ciaa149
5. Xu R, Cui B, Duan X, Zhang P, Zhou X, Yuan Q. Saliva: potential diagnostic value and transmission of 2019-nCoV. *International Journal of Oral Science*. Springer Science and Business Media LLC. 2020;12(1). DOI:10.1038/s41368-020-0080-z
6. Khurshid Z, Asiri FYI, Al Wadaani H. Human Saliva: Non-Invasive Fluid for Detecting Novel Coronavirus (2019-nCoV). *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020;17(7):2225. DOI: 10.3390/ijerph17072225
7. Williams E, Bond K, Zhang B, Putland M, Williamson DA. Saliva as a Noninvasive Specimen for Detection of SARS-CoV-2. McAdam AJ, editor. *Journal of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology. 2020;58(8). DOI: 10.1128/jcm.00776-20
8. Xia J, Tong J, Liu M, Shen Y, Guo D. Evaluation of coronavirus in tears and conjunctival secretions of patients with SARS-CoV-2 infection. *Journal of Medical Virology*. 2020;92(6):589–94. DOI:10.1002/jmv.25725
9. Sungnak W, Huang N, Bécavin C, Berg M, Queen R, et al. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nature Medicine*. 2020;26(5):681–7. DOI: 10.1038/s41591-020-0868-6
10. Chu DKW, Pan Y, Cheng SMS, Hui KPY, Krishnan P, Liu Y, et al. Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clinical Chemistry*. 2020;66(4):549–55. DOI: 10.1093/clinchem/hvaa029
11. Corman VM, Eckerle I, Bleicker T, Zaki A, Landt O, Eschbach-Bludau M, et al. Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Eurosurveillance*. 2012;17(39). DOI:10.2807/ese.17.39.20285-en.
12. Niu P, Lu R, Zhao L, Wang H, Huang B, et al. Three Novel Real-Time RT-PCR Assays for Detection of COVID-19 Virus. *China CDC Weekly*. Chinese Center for Disease Control and Prevention. 2020;2(25):453–7. Disponible en: <http://weekly.chinacdc.cn/en/article/doi/10.46234/ccdcw2020.116>
13. Tang P, Chiu C. Metagenomics for the discovery of novel human viruses. *Future Microbiology*. Future Medicine Ltd. 2010;5(2):177–89. DOI:10.2217/fmb.09.120
14. Zhao Z, Cui H, Song W, Ru X, Zhou W, Yu X. A simple magnetic nanoparticles-based viral RNA extraction method for efficient detection of SARS-CoV-2. *Cold Spring Harbor Laboratory*. 2020. DOI: 10.1101/2020.02.22.961268
15. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, John R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*. 2012;113(5):1014–26. DOI:10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x
16. Hedman J, Rådström P. Overcoming Inhibition in Real-Time Diagnostic PCR. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press. 2012;17–48. DOI: 10.1007/978-1-60327-353-4\_2
17. Vandeventer PE, Lin JS, Zwang TJ, Nadim A, Johal MS, Niemz A. Multiphasic DNA Adsorption to Silica Surfaces under Varying Buffer, pH, and Ionic Strength Conditions. *The Journal of Physical Chemistry B*. American Chemical Society (ACS). 2012;116(19):5661–70. DOI: 10.1021/jp3017776
18. Lee AHF, Gessert SF, Chen Y, Sergeev NV, Haghiri B. Preparation of iron oxide silica particles for Zika viral RNA extraction. *Heliyon*. 2018;4(3):e00572. DOI:10.1016/j.heliyon.2018.e00572
19. Klein S, Müller TG, Khalid D, Sonntag-Buck V, Heuser A-M, Glass B, et al. SARS-CoV-2 RNA Extraction Using Magnetic Beads for Rapid Large-Scale Testing by RT-qPCR and RT-LAMP. *Viruses*. MDPI AG. 2020;12(8):863. DOI: 10.3390/v12080863
20. Bergallo M, Costa C, Gribaudo G, Tarallo S, Baro S, Ponzi AN, et al. Evaluation of six methods for extraction and purification of viral DNA from urine and serum samples. *New Microbiol*. 2006;29(2):111–9. Disponible en: [http://www.newmicrobiologica.org/pub/allegati\\_pdf/2006/2/micro2\\_05\\_bergallo.pdf](http://www.newmicrobiologica.org/pub/allegati_pdf/2006/2/micro2_05_bergallo.pdf)
21. Centers for Disease Control and Prevention. Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel For Emergency Use Only. Revision. 2020;3:0.

- Disponible en: <https://www.fda.gov/media/134922/download>
22. 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*. European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC). 2020;25(3). DOI: .2807/1560-7917.es.2020.25.3.2000045
  23. Alejos- Velazquez LP, Aragón-Martínez MC, Cornejo-Romero A. 2010. Extracción y purificación de ADN. En: Cornejo Romero A, Serrato A, Rendón-Aguilar B, Rocha-Munive M. Eds. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. México DF, México: Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC-Semarnat); 2014. ISBN: 978-607-8246-72-4 Disponible en: [http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4\\_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/\\$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcolog%C3%ADa.pdf](http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcolog%C3%ADa.pdf)
  24. Scallan MF, Dempsey C, MacSharry J, O'Callaghan I, O'Connor PM, Horgan CP, et al. Validation of a Lysis Buffer Containing 4 M Guanidinium Thiocyanate (GITC)/ Triton X-100 for Extraction of SARS-CoV-2 RNA for COVID-19 Testing: Comparison of Formulated Lysis Buffers Containing 4 to 6 M GITC, Roche External Lysis Buffer and Qiagen RTL Lysis Buffer. *Cold Spring Harbor Laboratory*. 2020. DOI: 10.1101/2020.04.05.026435
  25. Petrich A, Mahony J, Chong S, Broukhanski G, Gharabaghi F, Johnson G, et al. Multicenter Comparison of Nucleic Acid Extraction Methods for Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus RNA in Stool Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology. 2006;44(8):2681–8. DOI: 10.1128/jcm.02460-05
  26. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*. 2020;382(8):727–33. DOI: 10.1056/NEJMoa2001017
  27. Mousavizadeh L, Ghasemi S. Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.03.022>
  28. Chan JF-W, Kok K-H, Zhu Z, Chu H, To KK-W, Yuan S, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerging Microbes & Infections*. 2020;9(1):221–36. DOI: 10.1080/22221751.2020.1719902
  29. Jung YJ, Park G-S, Moon JH, Ku K, Beak S-H, Kim S, et al. Comparative analysis of primer-probe sets for the laboratory confirmation of SARS-CoV-2. *Cold Spring Harbor Laboratory*. 2020. DOI: 10.1101/2020.02.25.964775
  30. John Hopkins Bloomberg School of Public Health. Comparison of National RT-PCR Primers, Probes, and Protocols for SARS-CoV-2 Diagnostics. 2020. Baltimore MD. [centerforhealthsecurity.org](https://www.centerforhealthsecurity.org/centerforhealthsecurity.org/resources/COVID-19/COVID-19-factsheets/200410-RT-PCR.pdf). Disponible en: <https://www.centerforhealthsecurity.org/resources/COVID-19/COVID-19-factsheets/200410-RT-PCR.pdf>
  31. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterization and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*. 2020;395(10224):565–74. DOI:10.1016/S0140-6736(20)30251-8
  32. Tan W, Zhao X, Ma X, Wang W, Niu P, et al. A Novel Coronavirus Genome Identified in a Cluster of Pneumonia Cases — Wuhan, China 2019–2020. *China CDC Weekly*. Chinese Center for Disease Control and Prevention. 2020;2(4):61–2. DOI: 10.46234/ccdcw2020.017
  33. Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579(7798):270–3. DOI: 10.1038/s41586-020-2012-7
  34. Hu D, Zhu C, Ai L, He T, Wang Y, Ye F, et al. Genomic characterization and infectivity of a novel SARS-like coronavirus in Chinese bats. *Emerging Microbes & Infections*. 2018;7(1):1–10. DOI: 10.1038/s41426-018-0155-5