

CAPÍTULO 10

Resultados del aprendizaje del IIBT durante la pandemia: detección molecular de SARS-CoV-2

Cómo citar:

Contreras H., Gastelbondo-Pastrana B., Torres K., Contreras V., Echeverri-De la Hoz D. et al. Resultados del aprendizaje del IIBT durante la pandemia: detección molecular de SARS-CoV-2. En: Máttar S., Gastelbondo-Pastrana B., editores. Lecciones aprendidas del COVID-19: Una mirada interdisciplinaria. Sincelejo (Colombia): Editorial CECAR, 2023. p. 209-229. DOI: <https://doi.org/10.21892/9786287515376.10>

Resultados del aprendizaje del IIBT durante la pandemia: detección molecular de SARS-CoV-2

Héctor Contreras; Bertha Gastelbondo-Pastrana; Karina Torres; Verónica Contreras; Daniel Echeverri-De la Hoz; Luis Flórez; Evelin Garay, Salim Mattar

Introducción

El Instituto de Investigaciones Biológicas Del Trópico (IIBT), es reconocido como instituto de investigación, desarrollo e innovación, por los entes gubernamentales. En la emergencia sanitaria el IIBT por su vasta experiencia de más de 20 años en enfermedades emergentes, no vacilo en dar un paso adelante y contribuir al control de la pandemia en su área de influencia. El IIBT, fue uno de los primeros laboratorios del país, que por su infraestructura y personal capacitado fue habilitado para el diagnóstico, oportuno y confiable de los pacientes infectados. Gracias a la experiencia con distintos patógenos virales y bacterianos, el IIBT aportó su conocimiento, experiencia y preparación para afrontar el diagnóstico de SARS-CoV-2 desde abril de 2020.



Figura 1. Editorial del periódico El Meridiano de Córdoba dando a conocer la habilitación del IIBT para realizar diagnóstico de COVID-19.

El instituto fue habilitado en marzo del año 2020; recibiendo entrenamiento por parte del Instituto Nacional de Salud (INS), para el diagnóstico de COVID-19. En Abril de ese mismo año, la secretaría de salud y el INS otorgaron la habilitación del IIBT para procesamiento de pruebas moleculares para detección de SARS-CoV-2; dando inicio a las actividades (Figura 1). Estas actividades incluyeron procesos como: recepción de muestras, desempaque, extracción de ARN, preparación de reactivos y análisis por RT-qPCR, análisis de reporte y envío de resultados. En 2020, el IIBT contaba con un equipo de PCR-RT (CFX96™, BioRad), con el que alcanzaba una capacidad de procesamiento de 90 muestras diarias. Simultáneamente, la infraestructura del IIBT fue adecuada para realizar el procesamiento de las muestras de pacientes potencialmente infectados por SARS-CoV-2. Esto se consiguió a través de la aprobación de un proyecto por parte de MINCIENCIAS. Se logró entonces aumentar la capacidad de procesamiento a 300 muestras diarias, como resultado, se analizaron 10.817 muestras COVID-19 hasta julio del 2022. Las áreas y el flujo de trabajo realizado para el diagnóstico de COVID-19 en el instituto se encuentran detallados en la Figura 2.

Durante la pandemia, una de las problemáticas lo constituía la alta oferta de kits de detección molecular del virus, los cuales no contaban con los estudios apropiados de sensibilidad y especificidad. Esto se convirtió en un desafío al observar resultados erróneos y confusos, que en medio de una pandemia representaba un riesgo para la salud pública. Esto condujo a la búsqueda de soluciones para contrarrestar la problemática que finalmente podría afectar la confiabilidad del diagnóstico.

Como primera medida, se decidió evaluar la precisión diagnóstica de algunos kits de diagnóstico molecular, disponibles y liberados para comercialización en el año 2020. Es en este contexto, se planteó comparar la precisión diagnóstica de tres ensayos de RT-qPCR para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2; por lo que se logró establecer cuál era el kit comercial, que presentaba resultados más precisos en medio del segundo pico pandémico a nivel nacional.

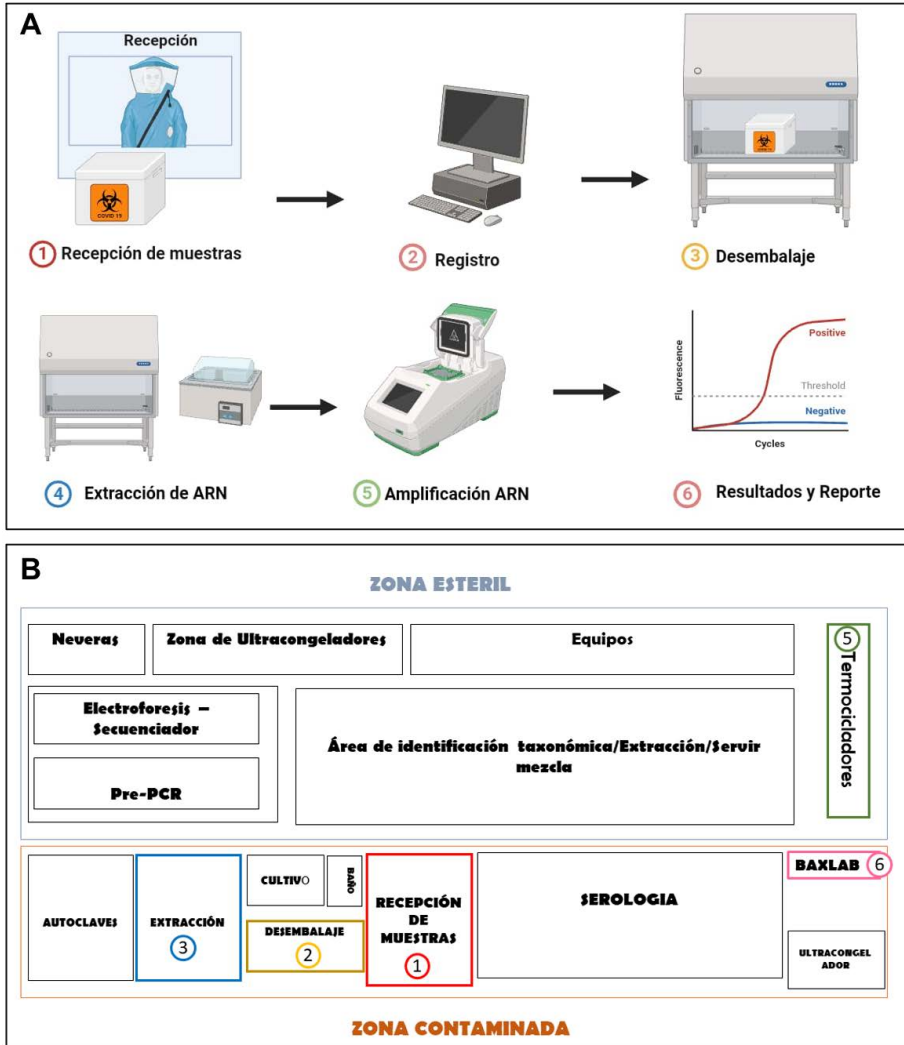


Figura 2. Actividades realizadas para el diagnóstico de COVID-19 localizadas en el plano de las instalaciones del IIBT. **A.** Flujograma de procesamiento de muestras; **B.** Plano de las instalaciones del IIBT con las áreas de procesamiento de muestras COVID-19 indicadas por colores*. *Los colores de las áreas comparten el mismo color con la numeración de las etapas descritas en el flujograma.

Comparación de la tasa de detección y valores del umbral del ciclo, de tres protocolos de RT-qPCR SARS-CoV-2

El método diagnóstico determinado como como *gold standard* para detección molecular de SARS-CoV-2 es la RT-qPCR por su alta sensibilidad y especificidad, en la fase aguda de la infección (1). La identificación de casos y la vigilancia epidemiológica de la infección por SARS-CoV-2 se debe realizar mediante la amplificación por RT-qPCR de los segmentos de los genes virales E, N y RdRp(2).

La detección temprana del SARS-CoV-2 permite aislar inmediatamente a los sujetos infectados, de la población sana y, prevenir la diseminación del virus (2–5). La Organización Mundial de la Salud (OMS) destacó el papel crucial de las pruebas de laboratorio para COVID-19, por diagnóstico precoz, seguimiento, manejo de casos y el control de la transmisión (5). Muchas de las medidas tomadas para controlar la propagación del SARS-CoV-2 dependen fundamentalmente en el diagnóstico oportuno y preciso de las personas infectadas (6). Así, para 2020, se produce un aumento en la demanda de pruebas diagnósticas y un aumento en la oferta de cientos de protocolos de diagnóstico comerciales basados en RT-qPCR. Cada uno con sensibilidad y especificidad variables o desconocidas, por lo que se hizo necesaria la evaluación individual de cada uno de ellos (7).

Diversos estudios habían demostrado limitaciones en la sensibilidad y especificidad en diferentes protocolos de detección de RT-qPCR del SARS-CoV-2, como la amplificación de productos no específicos, que conducen a resultados falsos positivos y baja sensibilidad a cargas virales bajas en la muestra (8–10).

Muestras clínicas. Para la validación de los diferentes protocolos se seleccionaron 22 muestras aleatorias de hisopos nasofaríngeos y orofaríngeos. De los 22 participantes, 14 dieron positivo y 8 dieron negativo para el ARN viral del SARS-CoV-2 según el protocolo molecular de Charité-Berlín. Las muestras fueron obtenidas durante la vigilancia epidemiológica del COVID-19 en Montería, Córdoba. El estudio fue realizado y avalado por el comité de ética del Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico (IIBT), de la

Universidad de Córdoba. Se realizó bajo estándares éticos internacionales dados por la Organización Mundial de la Salud y la Organización Panamericana de la Salud, avalados por la declaración de Helsinki, la legislación nacional y la resolución número 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia.

Condiciones de RT-qPCR. Las muestras fueron procesadas siguiendo las recomendaciones y procedimientos descritos para cada protocolo comercial. El protocolo de referencia estándar utilizado fue una adaptación del protocolo Charité-Berlín (5). Se utilizaron cebadores y sondas fabricados por LGC-BioSearch Technologies™, EE. UU., y un qScript™ XLT 1-Step RT-qPCR ToughMix® (Quantabio USA). Los protocolos y genes para cada ensayo se muestran en la Tabla 1. Ninguno de los fabricantes participó en la evaluación e interpretación de los resultados obtenidos en este estudio. Todas las PCR se realizaron en el equipo CFX96™ (Bio-Rad Laboratories, EE. UU.), siguiendo las instrucciones de uso del fabricante.

Tabla 1. *Primers y sondas de cada protocol evaluado SARS-CoV-2 RT-qPCR.*

Protocol	Target genes	Sequence	Reference
A Standard reference protocol	N	Forward_CACATTGGCACCCGCAATC	(2)
		Reverse_GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	
	Probe_FAM-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA- BBQ		
	RdRp		
		Forward_GTGARATGGTCATGTGTGGCGG	
		Reverse_CARATGTTAAASACACTATTAGCATA	
		Probe1_FAM-CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC- BBQ	
		Probe2_FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC- BBQ	
B GeneFinder™	N	No available	No available
	RdRp	No available	

Protocol	Target genes	Sequence	Reference
C DAANGene Co, Ltd.	N	Forward_ GGGGAACCTTCTCCTGCTAGAAAT	(11)
		Reverse_ CAGACATTTTGCTCTCAAGCTG	
	Probe_5'-TTGCTGCTGCTTGACAGATT-3' (VIC)		
	Forward_CCCTGTGGGTTTTACACTTAA		
ORF1a/b	Reverse_ ACGATTGTGCATCAGCT GA		
	Probe_5'-CCGTCTGCGGTATGTGGAAAGTTATGG-3' (FAM)		

Análisis estadístico. Para el análisis de los datos se utilizó el paquete estadístico GraphPad Prism versión 8.0 (EE.UU.), con un criterio de significancia de $p < 0,05$. Hasta un valor de ciclo de cuantificación de la fluorescencia (Cq) < 40 se consideró positivo para cada uno de los protocolos evaluados, mediante el análisis de concordancia y la prueba Kappa. El parámetro fue establecido según las instrucciones de los fabricantes de los kits comerciales. Se realizó la prueba ANOVA y la prueba de Tukey para comparaciones múltiples para evaluar diferencias de medias entre grupos; se verifico previamente la normalidad y homogeneidad de varianzas, mediante la prueba de D'Agostino y Pearson.

Resultados. Los tres protocolos de RT-qPCR evaluados mostraron variaciones en la tasa de detección y los valores de Ct. El protocolo A amplificó el gen N en 11/22 (50%; IC95% Ct: 30,3–37,6) de las muestras, y para el gen RdRP en 13/22 (59,1%; IC95% Ct: 29,9–37, uno). El protocolo B amplificó el gen N en 14/22 muestras analizadas (63,6%; IC95% Ct: 27,2–35,9) y el gen RdRP en 12/22 (54,5%; IC95% Ct: 30, 3–37,8) (Figura 1). El protocolo C obtuvo la mayor tasa de detección, 22/22 para el gen N (100%; IC 95% Ct: 24,4–32,6) y para el gen ORF1ab 21/22 (95,5%; IC 95% Cq: 25,6–33,7).

Los resultados obtenidos con los protocolos A y B mostraron valores de Cq similares con la misma muestra y valores de Cq promedio entre 31,6–34,1 para los dos genes evaluados. El protocolo C mostró valores promedio de Cq más bajos en relación con los demás protocolos evaluados y, solo una muestra fue amplificada con $Cq > 40$ para el gen ORF1ab (Figura 1). En el protocolo C, los valores de Cq del gen N mostraron diferencias significativas

con los protocolos A ($p = 0.0028$) y B ($p = 0.0207$). De la misma manera, los valores de C_q del gen RdRP mostraron diferencias significativas con los protocolos A ($p = 0,0003$) y B ($p = 0,0107$) (Figura 1).

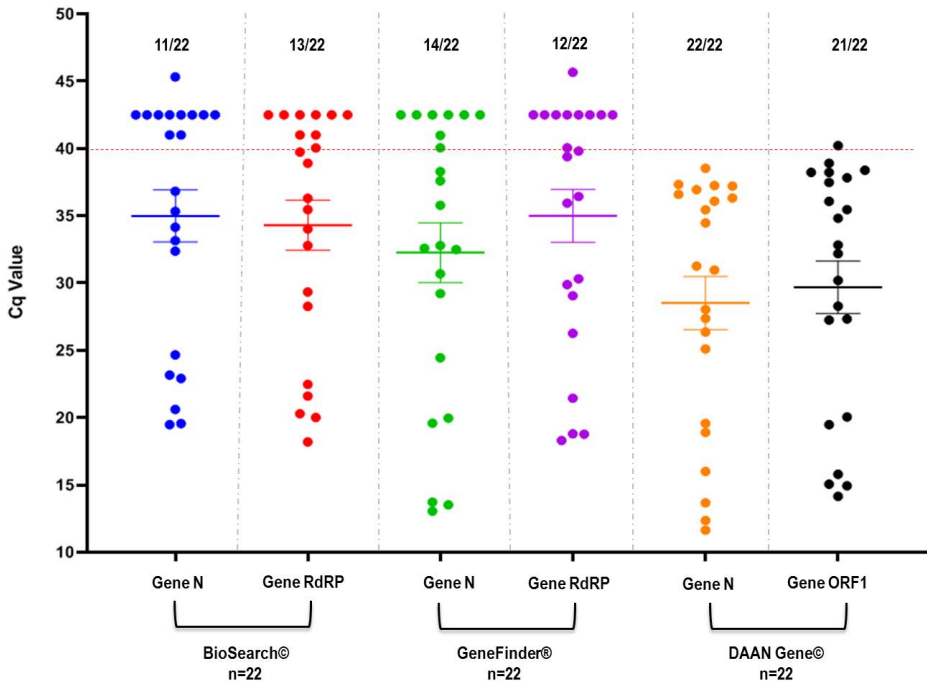


Figura 1. Tasa de detección y valores de Ct de diferentes Kits RT-qPCR. Ct obtenidos de todas las muestras clínicas ($n=22$) en los 3 ensayos RT-qPCR probados para los genes N, RdRP y ORF1ab. Los puntos de datos por encima de la línea horizontal punteada son valores considerados negativos presentando valores de Ct >40 . La tasa de detección de cada kit de RT-qPCR se indica en la parte superior, por ejemplo 11/22, es decir 11 de 22 muestras analizadas dieron positivo de acuerdo a las instrucciones de cada fabricante. Se muestran, además, el valor promedio de Ct y la desviación estándar para cada ensayo.

En cuanto al porcentaje de concordancia entre protocolos RT-qPCR, la mayor concordancia entre muestras positivas y negativas se estimó entre los protocolos A y B (77,2%; $p < 0,05$), con $k = 0,54$ y $k = 0,53$ para los genes N y RdRp, respectivamente. Se estimó una baja concordancia entre el

protocolo A y C (50% gen N y 54,5% gen ORF1ab $p > 0,05$), con un valor $k = 0,00$ para ambos genes. El mayor porcentaje de concordancia en muestras positivas (sensibilidad) se obtuvo al comparar el protocolo de referencia con los resultados de Cq obtenidos con el Protocolo C, con un valor de 100% para el gen N y 92,3% para el gen ORF1ab. Sin embargo, el mayor porcentaje de concordancia en muestras negativas se obtuvo con el Protocolo B, 63,6% para el gen N y 77,8% para el gen RdRP. En el Protocolo C, el porcentaje de acuerdo negativo fue $\leq 0\%$ para ambos genes (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de concordancia de dos protocolos comerciales para el diagnóstico de RT-qPCR del SARS-CoV-2 en comparación con el protocolo de referencia estándar.

Standard Reference Protocol	Protocols/ Genes	Sensitivity *(%PPA)	Specificity **(%NPA)	Agreement (%)	Value k
<i>Protocol A</i>	<i>Protocol B/ N gene</i>	90.9 (10/11)	63.6 (7/11)	77.2 (17/22)	0.54
	<i>Protocol B/ RdRP gene</i>	76.9 (7/11)	77.8 (7/9)	77.2 (17/22)	0.53
	<i>Protocol C/ N gene</i>	100.0 (11/11)	0.0 (0/9)	50.0 (11/22)	0.0
	<i>Protocol C/ ORF1ab gene</i>	92.3 (12/13)	0.0 (0/9)	54.5 (12/22)	0.0

Los resultados del estudio demuestran que existe una gran variabilidad entre los kits analizados. La situación de la pandemia hizo importante la evaluación de los métodos de diagnóstico molecular; las validaciones fueron cruciales en la vigilancia en salud pública para detectar los casos de personas asintomáticas/presintomáticas.

Los resultados obtenidos con las 22 muestras mostraron rangos de los Ct con variaciones entre los kits; como se observó en estudios previos con kits de diagnóstico que utilizaron los genes ORF1ab y N (12). Además, los genes analizados con los tres kits presentaron variaciones en los valores de Ct, lo que demuestra discordancia de la sensibilidad entre los kits evaluados. Este resultado puede estar asociado con variabilidad del genoma analizado. Esta

variabilidad ha sido reportada por Farfour et al. (2020), quienes analizaron los genes E, RdRP y N con el kit Allplex™ 2019-nCoV. Estos autores concluyeron que podía existir variabilidad en el genoma analizado, al ser comparado con el genoma molde con el que fueron diseñados los primeros primers y sondas del ensayo evaluado, al inicio de la pandemia (13).

Por otra parte, los kits A y B mostraron mayor concordancia entre los resultados obtenidos (77,2%; $p < 0,05$), probablemente debido a que ambos kits fueron adaptados a partir del protocolo de Corman et al. (2020). En adición a esto, el kit C presentó una alta discordancia de sensibilidad al ser comparado con los otros kits. El kit C detectó 1/22

muestras analizadas con un valor de Ct ≥ 40 (débilmente positivo para el gen ORF1ab). En este contexto, el restante de muestras presentaron valores de Ct < 40 , siendo consideradas positivas según las instrucciones del fabricante. No obstante, estas muestras resultaron con valores mayores de Ct al ser evaluadas con los otros kits, lo que podría asociarse con la alta sensibilidad (100.0%) y baja especificidad (0.0%) del kit C; representada en probables falsos positivos.

Kapitula et al. (2020), analizaron ocho kits comerciales de qRT-PCR para diagnóstico de SARS-CoV-2, los cuales a pesar de ser aprobados para su uso en China y EE.UU. mostraron alineamiento en múltiples áreas en el gen ORF1ab (14). Este fenómeno, ocasiona consecuentemente una sensibilidad no-lineal para cada copia de RNA viral amplificada; lo cual significa alineamientos no específicos en la región amplificada. Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran alta sensibilidad y baja especificidad para el Kit C, lo cual podría deberse al alineamiento no específico observado por el estudio previo acerca del kit C (14).

Por su parte, el gen N al ser evaluado por los tres kits, permitió observar que existe variabilidad en sus valores de Ct. Este hallazgo, fue previamente reportado por Corman et al. (2020), Wang et al. (2020) y Ceraolo et al. (2020) (15). En contraste a esto, el gen RdRP obtuvo valores de Ct menos variables entre los kits. Farfour et al. (2020), señala que los genes E y RdRP presentan resultados más concordantes entre sí, como se observa en el presente

estudio. Por otro lado, una muestra de un paciente asintomático, presentó alta concordancia entre los kits, al obtener los valores de Cq más bajos en todos los kits analizados. Este resultado se relaciona con lo enunciado por Liotti et al. (2020), donde fue observada una asociación negativa (relación inversa) entre la carga viral y los valores de Cq de las PCRs realizadas con dos kits evaluados (Allplex™2019-nCoV assay y Simplexa™ COVID-19) (16).

Este último hallazgo podría significar que la carga viral determinada con ensayos de RT-qPCR no siempre puede ser usada para indicar severidad de la enfermedad por SARS-CoV-2. No obstante, el valor de carga viral puede ser un indicativo de transmisibilidad del virus (Liotti et al., 2020).

En EE.UU, la propagación del SARS-CoV-2 superó rápidamente la capacidad de realizar pruebas, lo que provocó que la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) relajara los requisitos reglamentarios para aumentar la disponibilidad de las pruebas. En consecuencia, cientos de pruebas para SARS-CoV-2, entre ellas de rRT-PCR, obtuvieron la autorización de uso de emergencia (EUA) de la FDA. A partir del 4 de agosto de 2020, la FDA otorgó EUA a 203 pruebas de diagnóstico, incluidas 166 pruebas moleculares, 35 pruebas de anticuerpos y 2 pruebas de antígenos.

Aunque la FDA comenzó a exigir la presentación de métodos de validación y resultados como parte de la solicitud de la EUA para las pruebas de diagnóstico del SARS-CoV-2. Sin embargo, no exigió que estas pruebas se sometieran a la evaluación rigurosa del proceso de aprobación de la FDA (17).

Estos aspectos han afectado el rendimiento y la eficiencia diagnóstica de diversos kits de qRT-PCR disponibles en el mercado. En este sentido, la comparación de precisión diagnóstica de los tres ensayos evaluados en este estudio resulta útil puesto que algunos kits aprobados por la FDA, varían ampliamente en términos de sensibilidad y especificidad; conllevando a generar resultados confusos, lo que según Maxmen (2020) se puede reflejar en políticas desacertadas en cuanto al manejo de COVID-19 (18).

Aunque este estudio tuvo como debilidad el bajo número de especímenes, el análisis de tres kits comerciales poco evaluados, ofrece información relevante para los usuarios del diagnóstico de laboratorio. El presente estudio utilizó como referencia el kit A (LGC Biosearch Technologies™). Este kit *in house* esta basado en el protocolo descrito para el diagnóstico de SARS-CoV-2, propuesto por Corman et al., 2020 (Protocolo Berlín). Para este protocolo se han descrito algunas variaciones de sensibilidad y especificidad. Estos problemas estan relacionados con la mutagenicidad del virus en los sitios de unión de los cebadores que amplifican los fragmentos de los diferentes genes. Por lo que se sugiere que futuros investigaciones amplíen el alcance de este estudio, para mejorar las tasas de identificación del SARS-CoV-2. Esto podría reducir la incidencia de resultados falsos negativos/falsos positivos; lo cual se consideró por mucho tiempo un desafío considerable en el diagnóstico de laboratorio de la COVID-19.

En conclusión, los resultados demuestran que existe una gran variabilidad entre los kits analizados. El Kit A (GeneFinder™) tuvo un buen rendimiento en términos de concordancia, sensibilidad y especificidad con respecto a los kits A (LGC Biosearch Technologies™) y C (DAAN Gene Co, Ltd). Los resultados de validación son útiles para garantizar la confiabilidad del diagnóstico. El diagnóstico molecular a través de la detección del RNA viral con ensayos validados, acompañado de criterios clínicos pueden ser de gran utilidad para realizar un adecuado control epidemiológico de brotes o propagaciones de SARS-CoV-2.

Evaluación y estandarización de RT-qPCR Multiplex para detección de SARS-CoV-2

La urgencia de una rápida detección de SARS-CoV-2 promovió el desarrollo de pruebas rápidas y generalizadas para ensayo *multiplex* de RT-qPCR (19). Desde la identificación de este nuevo virus, varios conjuntos de primers y sondas están disponibles para la detección del ARN del SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR; sin embargo, la distribución de estos ensayos comerciales, ha estado limitada en gran medida por la disponibilidad de los reactivos que los componen.

El laboratorio del Instituto de Virología de Charité en Berlín–Alemania aportó al diagnóstico de COVID-19 a nivel mundial, realizando la estandarización y validación de un protocolo de detección bajo la metodología de RT-qPCR. Este protocolo debido su riguroso proceso metodológico y a su nivel de confiabilidad en la detección del virus, fue transferido a los Laboratorios Nacionales de Referencia de Latinoamérica por parte de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) (20). El protocolo validado por Charité-Berlín, requiere la realización de cuatro reacciones por muestra de paciente, para la detección de los genes E (Envoltura), N (Nucleocapside) y RdRP (RNA polimerasa dependiente de RNA), y el gen de la RNAsaP humana, como control endógeno de extracción de ácidos nucleicos; lo anterior, al ser desarrollado por métodos *singleplex*, requiere una gran cantidad de recursos e incrementa las posibilidades de error. Para reducir los reactivos, el tiempo del procesamiento de la muestra y los posibles errores, el laboratorio del IIBT logró estandarizar una RT-qPCR múltiple para la detección del SARS-CoV-2.

Durante la pandemia, los kits de diagnóstico comerciales se volvieron inasequibles en precio y oferta, la alta demanda de estos productos, ocasionó escasez a nivel mundial, llevando a que los procesos de diagnóstico se retrasaran o se detuvieran por completo. Debido a esta situación, el Instituto de Investigaciones Biológicas Del Trópico (IIBT), agotó esfuerzos en buscar alternativas que suplieran la demandante necesidad de diagnóstico con la aprobación de un proyecto por parte de MINCIENCIAS, se planteó la alternativa de diseñar y validar un protocolo de diagnóstico molecular de genes de SARS-COV-2. Como producto se logró diseñar una RT-qPCR, multiplex, en la que se pueden detectar fragmentos de genes N, E, RdRP del virus y un control interno de extracción RNAsaP humana. Esta prueba multiplex, hoy día se sigue usando y ajustando a los diferentes momentos epidemiológicos de SARS-CoV-2, al punto de poder detectar en una RT-qPCR multiplex, mutaciones del genoma que nos permiten reconocer variantes circulantes.

Para esta estandarización, se utilizaron cebadores y sondas diseñados tomando como base el protocolo Charité Berlín (2), y las condiciones de ciclaje de la enzima Luna® Universal One-Step RT-qPCR Kit. El protocolo de PCR-RT fue realizado con el termociclador CFX96™ BioRad, con las condiciones necesarias para el proceso de amplificación.

Para llevar a cabo este ensayo, se incluyeron 30 muestras aleatorias de hisopados nasofaríngeos y orofaríngeos, conservadas en medio de transporte viral, obtenidas de pacientes muestreados durante la vigilancia de COVID-19 entre los meses de mayo a agosto del año 2020 en Montería, Córdoba. Estos pacientes fueron previamente diagnosticados usando un kit comercial para detección molecular de SARS-CoV-2. Se evaluaron los genes RNaseP, E, N y RdRP, en ensayos *singleplex*; haciendo comparaciones de los Cq de estos genes en una prueba *multiplex*. Los montajes de cada muestra fueron realizados por triplicado; incluyendo control positivo y control negativo en cada ensayo.

Análisis estadístico. Para el análisis estadístico se usó el software PRISM versión 9.0 0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Para establecer la normalidad de los datos se utilizó el test de Shapiro-Wilk. La significancia estadística fue determinada utilizando la prueba no paramétrica de una cola Mann-Whitney para comparar dos grupos independientes. En grupos paramétricos se utilizó la prueba *t* de Student. De esta manera se consideraron las significancias a un valor de $p < 0.05$.

Para el análisis de sensibilidad y especificidad se utilizó el software R versión 4.3.1. Se creó una matriz de comparación, tomando como referencia los valores de Cq obtenidos para el gen E, N y RdRP de SARS-CoV-2 obtenidos a partir de una prueba *singleplex* frente al Cq obtenido para estos genes con la prueba *multiplex* para detección molecular de SARS-CoV-2. Para ello, se realizó una conversión de datos en la cual se valores de Cq menores a 37 se consideraron positivos; asignándose el número 1, y para valores mayores de e iguales a 37 se consideraron negativos y se les asigno el número 2.

Resultados y discusión. Los resultados obtenidos a través de la RT-qPCR indican que no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre los Cq obtenidos a partir de la prueba singleplex y la prueba multiplex para los genes E, N y RdRP del SARS-CoV-2 (Figuras 3 y 4).

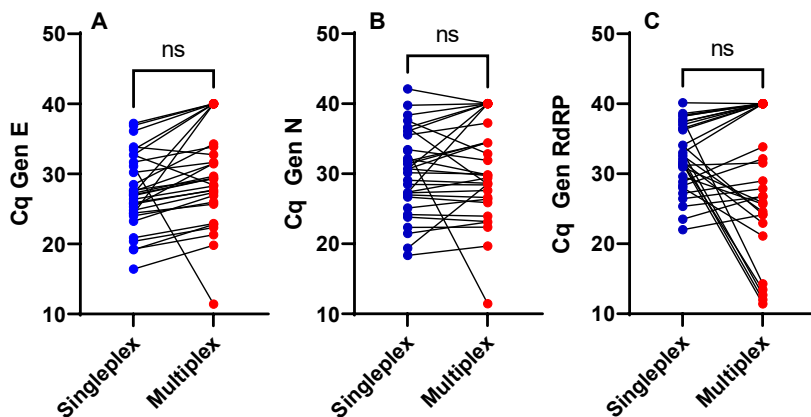


Figura 3. Comparación de la detección de los genes: A. Gen E, B. Gen N, C. Gen RdRP para diagnóstico de SARS CoV-2 por RT-qPCR Singleplex o Multiplex in house.

^{ns}No se observan diferencias significativas.

Este hallazgo sugiere que, la detección y cuantificación de estos genes puede realizarse de manera confiable utilizando la prueba multiplex para detección de SARS-CoV-2. Al comparar este tipo de técnicas se debe tener en cuenta que el diagnóstico molecular *multiplex*, permite la amplificación simultánea de varios genes en la misma reacción, mientras que el diagnóstico *singleplex* permite amplificar un único gen por ensayo (22).

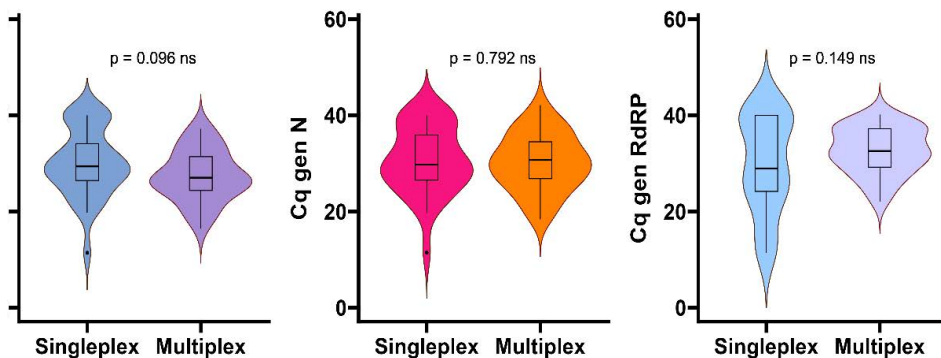


Figura 4. Densidades de poblacionales con medidas de tendencia central y dispersión de la amplificación de ARN de SARS-CoV-2 por RT-qPCR singleplex frente a RT-qPCR multiplex para la detección de los genes E, N y RdRP a partir de muestras de hisopados nasofaríngeos.

^{ns}No se observan diferencias significativas.

En este estudio, se compararon ambas pruebas para evaluar su rendimiento y determinar si habían diferencias significativas entre los Cq obtenidos para cada tipo de detección. Los resultados obtenidos en este estudio, demuestran que es posible realizar una detección eficiente del SARS-CoV-2 utilizando una prueba multiplex para detección de genes target de SARS-CoV-2. Este resultado representa posibles ventajas en términos de tiempo y costo durante el diagnóstico. Puesto que, el uso de este tipo de técnicas, permite reducir la cantidad de muestras y reactivos necesarios, lo que podría ser beneficioso, principalmente en situaciones con recursos limitados (22). Al analizar los parámetros de sensibilidad y especificidad para cada gen en el ensayo de RT-qPCR *multiplex* para SARS-CoV-2, se determinó que el gen E muestra 76.66% de sensibilidad y un 100% de especificidad (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados obtenidos para las pruebas de sensibilidad y especificidad para el gen E de SARS-CoV-2 en la prueba diagnóstica multiplex.

Análisis	Multiplex Gen E		Exactitud		
	Resultados (%)	IC95%	Media	x	N
Sensibilidad	76.66	0.5771-0.9006	0.7666	23	30
Especificidad	100	0.0250-1.0000	1	1	1
VPP	89.29	0.8518-1.0000	1	23	23
VPN	92.00	0.0031- 0.5265	0.1250	1	8
Falsos positivos	0	IC95%: Índice de confianza 95%			
Falsos negativos	23.34				

Por lo cual, el ensayo tiene una alta probabilidad de predecir verdaderos pacientes positivos, cuando el gen E de SARS-CoV-2 ha amplificado; considerándose este, altamente específico para realizar diagnóstico de COVID-19. Por otro lado, el gen N muestra una sensibilidad del 74.00% y una especificidad del 75%; determinando, una probabilidad moderada de detectar un paciente positivo, cuando este gen ha amplificado en una muestra (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados obtenidos para las pruebas de sensibilidad y especificidad para el gen N de SARS-CoV-2 en la prueba diagnóstica multiplex.

Análisis	Multiplex Gen N		Exactitud		
	Resultados (%)	IC95%	Media	x	N
Sensibilidad	74.07	0.5371-0.8888	0.7407	20	27
Especificidad	75.00	0.1941-0.9936	0.7500	3	4
VPP	95.23	0.7618-0.9987	0.9523	20	21
VPN	30.00	0.0667-0.6524	0.3000	3	10
Falsos positivos	25.00	IC95%: Índice de confianza 95%			
Falsos negativos	25.93				

En cuanto al gen RdRP, presentó una sensibilidad del 77.72% y una especificidad del 88.88%; indicando, que el ensayo tiene una alta probabilidad de diferenciar verdaderos pacientes positivos cuando el gen N ha amplificado

en la muestra del paciente evaluado (Tabla 5). Por lo tanto, la prueba RT-qPCR multiplex para SARS-CoV-2 nos permite diagnosticar el virus con una alta eficiencia(22).

Tabla 5. Resultados obtenidos para las pruebas de sensibilidad y especificidad para el gen RdRp de SARS-CoV-2 en la prueba diagnóstica multiplex.

Análisis	Multiplex Gen RdRp		Exactitud		
	Resultados (%)	IC95%	Media	x	N
Sensibilidad	77.72	0.5462-0.9217	0.7727	17	22
Especificidad	88.88	0.5175-0.9971	0.8888	8	9
VPP	94.44	0.72705-0.9985	0.9444	17	18
VPN	61.53	0.3157-0.8614	0.6153	8	13
Falsos positivos	11.12	IC95%: Índice de confianza 95%			
Falsos negativos	22.28				

Durante el desarrollo de la pandemia, el diseño de una PCR multiplex para la detección de SARS-CoV-2 fue novedoso y prometió disminuir los costos de procesamiento. Bajo este enfoque, algunos autores implementaron la estrategia de multiplexación. Ishige *et al*, utilizaron tres genes: el gen E específico de Sarbecovirus, el gen N específico del SARS-CoV-2 y el gen ABL1 humano como control interno (23). Aunque, se observó un retardo medio de 6,4 ciclos, la sensibilidad de la prueba no disminuyó significativamente, resultado concordante con el presente estudio.

Sin embargo, implementar el gen E–Sarbeco en la multiplexación sí afectó la reproducibilidad de los datos; aumentando el número de falsos positivos(23). Dicha situación no concuerda con lo obtenido en el estudio; como se evidencia en la Figura 4A, el gen E mostró mayor especificidad con respecto al gen N (Figura 4B) y RdRp (Figura 4C). No obstante, dado que estos resultados pueden dar lugar a falsos positivos, se debe tener cuidado al juzgar las señales positivas débiles, principalmente en ensayos donde la sensibilidad de la prueba es menor al 80% (23).

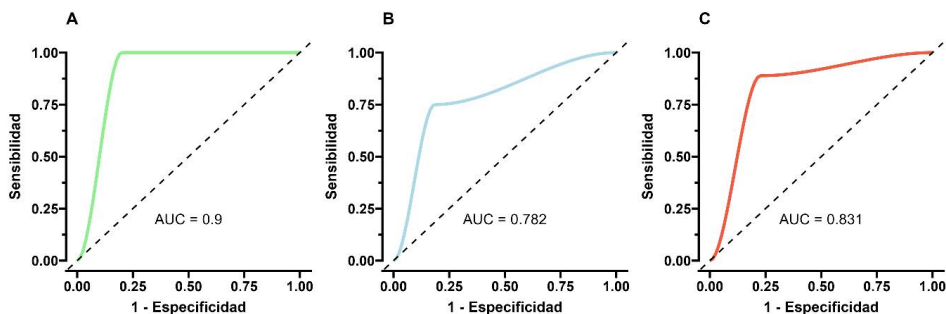


Figura No. 4. Curva ROC obtenida para los genes de SARS-CoV-2. evaluados en prueba multiplex y que permiten hacer diagnóstico de COVID-19. A. Gen E; B. Gen N; C. Gen RdRP.

Es importante destacar que estos resultados se basan en el análisis de un número determinado de muestras ($n=30$); por lo que se deben realizar estudios adicionales para confirmar y validar estos hallazgos en diferentes condiciones de laboratorio. Así mismo, comparar y evaluar estos parámetros de sensibilidad y especificidad con respecto a otras técnicas más robustas como la secuenciación NGS, podría aumentar la confiabilidad de los datos.

De igual manera, la estandarización de un protocolo de RT-qPCR multiplex para la detección de SARS CoV-2 incluye la secuencia de primers y sondas usadas, la mezcla maestra de reactivos y las condiciones de amplificación (24). El diseño de este protocolo *multiplex* frente al protocolo *singleplex* disponible comercialmente, durante una pandemia por un virus poco conocido permitió no solo darle un manejo más rápido a la clínica del paciente sino también el control epidemiológico de esta emergencia sanitaria en Colombia; resaltando la ágil respuesta de la comunidad científica del IIBT para la verificación y validación de un protocolo RT-qPCR múltiplex con una alta sensibilidad y especificidad. Ante esto, el protocolo estandarizado hace que sea replicable entre los profesionales de biología molecular en el laboratorio; manteniendo la veracidad de los resultados y precisión diagnóstica de la COVID-19, haciéndolos también útiles en estudios epidemiológicos posteriores a una pandemia (25).

Finalmente, de acuerdo a las directrices de la OMS, los laboratorios de diagnóstico debían estar a la altura para la identificación oportuna de los casos de COVID-19 con los primeros protocolos disponibles como lo fueron el del CDC y el de Charité-Berlin. Estos protocolos se caracterizan por ser singleplex lo que implica limitaciones en el flujo de diagnóstico de SARS CoV-2 en pacientes sospechosos de IRA por SARS CoV-2. Este fue el primer paso para el IIBT y su laboratorio de biología molecular para la mejora de la implementación del protocolo de Charité-Berlin que permitiera el proceso de diagnóstico y con ello el fortalecimiento de la capacidad de diagnóstico a través de la detección de SARS-CoV-2 no solo de la región caribe sino de Colombia (26).

Perspectivas

El ensayo de RT-qPCR multiplex diseñado *in house*, posee una buena sensibilidad para la detección de SARS-CoV-2, a través del gen E y RdRP. Por lo anterior se hace necesario continuar con nuevos estudios en el que se permita incrementar el número de muestras y de esta manera confirmar estos hallazgos. Así mismo, la acelerada transmisión del virus y la rápida aparición de nuevos casos, sumado al apresurado desarrollo de la pandemia; fueron aspectos cruciales para que los servicios de diagnóstico e investigación, estuviesen enfocados en la entrega de resultados oportunos y confiables.

Estos servicios a pesar de las limitaciones económicas y de personal especializado, realizaron todos los procesos necesarios para ofrecer resultados en el menor tiempo posible y con el mínimo de recursos, pero con información relevante que permitiera la aplicación de tecnologías, específicamente de RT-qPCR. Por tal motivo, las estandarizaciones detalladas en este capítulo han sido la prueba fehaciente del potencial de desarrollo de prototipos de herramientas diagnósticas y/o productos con el adecuado rigor metodológico a través del principio de una validación secundaria o verificación diagnóstica; necesarias para llevar cada uno de estos productos a una fase de maduración tecnológica, escalamiento y comercialización, y de esta manera aportar al control de agentes biológicos de alto riesgo.

Referencias

1. Kelly-Cirino CD, Nkengasong J, Kettler H, Tongio I, Gay-Andrieu F, Escadafal C, et al. Importance of diagnostics in epidemic and pandemic preparedness. *BMJ Glob Health*. 2019;4(Suppl 2):e001179.
2. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DKW, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*. 2020;25(3).
3. Pan X, Chen D, Xia Y, Wu X, Li T, Ou X, et al. Asymptomatic cases in a family cluster with SARS-CoV-2 infection. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(4):410–1.
4. Rubin D, Huang J, Fisher BT, Gasparrini A, Tam V, Song L, et al. Association of social distancing, population density, and temperature with the instantaneous reproduction number of SARS-CoV-2 in counties across the United States. *JAMA Netw Open*. 2020;3(7):e2016099–e2016099.
5. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DKW, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*. 2020;25(3):2000045.
6. Abuabara-Franco E, Bohórquez-Rivero J, Restom-Arrieta J, Uparella-Gulfo I, Sáenz-López J, Restom-Tinoco J. Infección por SARS-CoV-2 y enfermedad COVID-19: revisión literaria. *Revista Salud Uninorte*. 2020;36(1):196–230.
7. van Kasteren PB, van der Veer B, van Den Brink S, Wijsman L, De jonge J, van den Brandt A, et al. Comparison of seven commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19. *J Clin Virol*. 2020;128:104412.
8. Yip CCY, Ho CC, Chan JFW, To KKW, Chan HSY, Wong SCY, et al. Development of a novel, genome subtraction-derived, SARS-CoV-2-specific COVID-19-nsp2 real-time RT-PCR assay and its evaluation using clinical specimens. *Int J Mol Sci*. 2020;21(7):2574.
9. Alcoba-Florez J, Gil-Campesino H, de Artola DGM, González-Montelongo R, Valenzuela-Fernández A, Ciuffreda L, et al. Sensitivity of different RT-qPCR solutions for SARS-CoV-2 detection. *International Journal of Infectious Diseases*. 2020;99:190–2.
10. Vogels CBF, Brito AF, Wyllie AL, Fauver JR, Ott IM, Kalinich CC, et al. Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-COV-2 qRT-PCR assays. *medRxiv*. 2020;
11. Long QX, Tang XJ, Shi QL, Li Q, Deng HJ, Yuan J, et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med*. 2020;26(8):1200–4.
12. Wang Y, Kang H, Liu X, Tong Z. Combination of RT-qPCR testing and clinical features for diagnosis of COVID-19 facilitates management of SARS-CoV-2 outbreak. Vol. 92, *Journal of Medical Virology*. 2020.

13. Farfour E, Lesprit P, Visseaux B, Pascreau T, Jolly E, Houhou N, et al. The Allplex 2019-nCoV (Seegene) assay: which performances are for SARS-CoV-2 infection diagnosis? *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2020;39(10).
14. Kapitula DS, Jiang Z, Jiang J, Zhu J, Chen X, Lin CQ. Performance & quality evaluation of marketed COVID-19 RNA detection kits. *medRxiv*. 2020;
15. Ceraolo C, Giorgi FM. Genomic variance of the 2019-nCoV coronavirus. *J Med Virol*. 2020;92(5).
16. Liotti FM, Menchinelli G, Marchetti S, Morandotti GA, Sanguinetti M, Posteraro B, et al. Evaluation of three commercial assays for SARS-CoV-2 molecular detection in upper respiratory tract samples. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2021;40(2).
17. Axell-House DB, Lavingia R, Rafferty M, Clark E, Amirian ES, Chiao EY. The estimation of diagnostic accuracy of tests for COVID-19: A scoping review. Vol. 81, *Journal of Infection*. 2020.
18. Maxmen A. Slew of Trials Launch To Test Coronavirus Treatments in China. *Nature*. 2020;578(7795).
19. World Health Organization OMS PAHO (PAHO). *Coronavirus*. 2023.
20. Kudo E, Israelow B, Vogels CBF, Lu P, Wylie AL, Tokuyama M, et al. Detection of SARS-CoV-2 RNA by multiplex RTqPCR. *PLoS Biol*. 2020;18(10):1–9.
21. Palacio K, Felipe J, Correa G, Aguilar-jiménez W, Afanador C, Teresa M, et al. Validación de una técnica de PCR dúplex usando el gen E y RNasa P para el diagnóstico de SARS-CoV-2. 2020;(January).
22. Ishige T, Murata S, Taniguchi T, Miyabe A, Kitamura K, Kawasaki K, et al. Highly sensitive detection of SARS-CoV-2 RNA by multiplex rRT-PCR for molecular diagnosis of COVID-19 by clinical laboratories. *Clinica Chimica Acta*. 2020;507.
23. Cuadra TE, Guadrón Meléndez AA, Cruz Aguilar RDJ, Vásquez Rodríguez EA. Factores relevantes sobre el ensayo RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2, virus causante del COVID-19. *Alerta, Revista científica del Instituto Nacional de Salud*. 2021;4(1).
24. Magnusson, B.; Örnemark U. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods*. Eurachem Guide. 2014.
25. Organización Panamericana de la Salud. Directrices de Laboratorio para la detección y diagnóstico de la Infección con el Nuevo Coronavirus 2019 (2019-nCoV). *Paho-Who*. 2020;1.