DETECCIÓN DIRECTA DE SARS-COV-2 MEDIANTE RT-qPCR EN PACIENTES REFERIDOS AL INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE "RAFAEL RANGEL"

Giulianna Antonelli[1,2], Aleiram Chaurio[1,2], Marwan Aguilar[1].

[1]Escuela de Bioanalisis, Universidad Central de Venezuela, Caracas. [2]Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Caracas, Venezuela.
Mención Honorifica Premio "Franca Billi" XVII Congreso Venezolano de Bioanalisis 2023

Recibido para publicación 22 julio 2023. Aceptado: 30 septiembre 2023

RESUMEN:
El método *gold*-estándar para la detección del SARS-CoV-2 es la RT-qPCR, sin embargo, ésta requiere de un paso de extracción y purificación previo que retrasa la entrega de resultados, especialmente en los momentos de mayor demanda diagnóstica. Con el fin de reducir el tiempo de procesamiento fueron evaluados tres métodos de extracción directa sin purificación de la muestra: buffer de lisis, calentamiento a 70°C por 10 min y 95°C por 5 minutos. Para ello, fueron seleccionadas 134 muestras conservadas de individuos con sospecha de Covid-19, referidos al INHRR durante el periodo Junio 2021-Febrero 2022, las cuales fueron procesadas por cada uno de los métodos planteados y seguidamente llevadas a RT-qPCR; los resultados obtenidos fueron comparados con el método gold estándar. En este estudio fue posible la detección directa del SARS-CoV-2 con una sensibilidad superior al 80% en los tres métodos evaluados, conservando un buen grado de concordancia con el método de referencia (k=0,79 para buffer de lisis, k=0,85 y k=0,84 para calentamiento a 70°C y 95°C respectivamente), y sin mostrar diferencias significativas (p=0,92, α=0,05) entre las variaciones de Ct obtenidos por las diferentes metodologías. La detección directa a partir de calentamiento a 70°C por 10 min es la metodología que mostró mayor sensibilidad (86,30%), estos resultados representan un hallazgo valioso para la comunidad científica del país ya que ofrece una alternativa diagnóstica que permite reducir el tiempo de entrega de resultados, contribuyendo con la contención de contagios en los puntos de mayor demanda.

Palabras clave: SARS-CoV-2, COVID-19, RT-qPCR, Extracción, Buffer de lisis, Calentamiento.

DIRECT DETECTION OF SARS-COV-2 BY RT-qPCR IN PATIENTS REFERRED TO THE NATIONAL INSTITUTE OF HYGIENE "RAFAEL RANGEL"

ABSTRACT
RT-qPCR is the gold standard method for detecting SARS-CoV-2, however, it requires a prior extraction and purification step that delays result delivery, especially during times of high diagnostic demand. In order to reduce processing time, three direct extraction methods without purification were evaluated: lysis buffer, heating at 70°C for 10 minutes, and at 95°C for 5 minutes. A total of 134 preserved samples from individuals suspected of Covid-19, referred to the INHRR between June 2021 and February 2022, were processed using each method and then subjected to RT-qPCR; the results were compared with the gold standard method. Direct detection of SARS-CoV-2 was achieved with a sensitivity exceeding 80% in all three methods, maintaining a good level of agreement with the reference method (k=0.79 for lysis buffer, k=0.85 and k=0.84 for heating at 70°C and 95°C respectively), and without significant differences (p=0.92, α=0.05) in the Ct variations obtained. Direct detection using heating at 70°C for 10 minutes showed the highest sensitivity (86.30%). These findings are valuable as they offer a diagnostic alternative that speeds up the delivery of results, contributing to containing virus spread during periods of high demand.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, RT-qPCR, Extraction, Lysis buffer, Heating.

Introducción

A lo largo de la historia, la humanidad ha tenido que enfrentarse a diversas pandemias las cuales han tenido repercusiones importantes a nivel económico, social y cultural. Para el primer trimestre de 2020 el mundo experimentó la más reciente: la pandemia de la COVID-19, con la aparición de un nuevo virus, el SARS-CoV-2, que ha marcado la historia de la humanidad en los últimos tiempos. Con ella se han registrado más de 6 millones de muertes y 450 millones de contagios, lo que conllevó en sus inicios a un colapso total en todos los sectores, entre ellos el

Solicitar copia a: Giulianna Antonelli (giuantonelliv@gmail.com)

Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas. 2023; Vol 26(2): 60-66.
https://doi.org/10.71034/SVBE.2023.26.2.04

sistema sanitario donde se sobrepasó la demanda a la capacidad de respuesta de los centros y el personal de salud en el mundo (1).

El SARS-CoV-2, forma parte de un grupo de coronavirus de origen zoonótico junto a SARS-CoV y MERS-CoV-, de hecho, estudios genómicos informan que posee una similitud de un 79% con el SARS-CoV, además, se ha hallado concordancia del 96% entre el genoma de este nuevo coronavirus con el virus de los murciélagos (RaTG13), por lo cual se cree que éste sea uno de los posibles hospedadores del virus SARS-CoV-2 (2).

Tras su identificación y con el aumento exponencial de casos de contagio, el 30 de enero la OMS declaró el brote por el nuevo coronavirus como emergencia de salud pública de preocupación internacional(3), y posteriormente el 11 de marzo de ese mismo año, fue declarada la COVID-19 como pandemia(4). Desde entonces, la comunidad científica ha hecho un esfuerzo a gran escala para conocer a fondo todo lo relacionado con la COVID-19, lo cual ha representado un desafío no sólo para la atención y vigilancia de los pacientes, sino también para garantizar la calidad y disponibilidad de las herramientas de diagnóstico relacionadas con el SARS-CoV-2. El método gold estándar para el diagnóstico ha sido la prueba RT-qPCR, la cual ofrece una alta sensibilidad y especificidad diagnóstica, de hecho, los CDC y la OMS aún recomiendan estrictos protocolos de diagnóstico molecular RT-qPCR SARS-CoV-2 con especificaciones para la recolección de muestras y la extracción de ARN (1).

Sin embargo, con el desarrollo de la pandemia, la alta demanda y consecuente escasez de insumos para el diagnóstico, muchos investigadores se han dedicado a desarrollar alternativas que permitan agilizar el proceso diagnóstico, reduciendo el tiempo de respuesta y por supuesto, el alto costo que representan los métodos tradicionales de extracción y purificación del ARN, sin afectar la calidad de los resultados. Por lo anteriormente expuesto, se propone el estudio la aplicación de dos metodologías que evaden el paso de extracción y purificación convencional del ARN viral para la detección de SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR, las cuales podrían reducir de manera importante los tiempos de entrega de resultados, permitiendo un diagnóstico rápido y oportuno ante momentos de alta demanda diagnóstica.

Metodología:

Se analizaron 134 muestras de hisopados nasofaríngeos referidas al INHRR, las cuales fueron procesadas mediante tres métodos diferentes de extracción: 1) Extracción y purificación del ARN viral mediante perlas magnéticas; 2) Tratamiento con buffer de lisis y 3) Calentamiento de la muestra a 70°C por 10 min y a 95°C por 5 min. Posteriormente todos esos productos de extracción fueron llevados a RT-qPCR.

Para la amplificación del material genómico de las muestras purificadas se empleó el Kit *"Novel Coronavirus (2019-nCoV) Nucleic Acid Diagnostic Kit (PCR-Fluorescence Probing)"* (Sansure Biotech, China) el cual evalúa los genes N y ORF1ab, tomado como método de referencia. Y paralelamente, el kit "*Covid-RT-qPCR Detection Kit Bio-Speedy*" (Bioeksen, Turquía), el cual evalúa el gen RdRp. En el caso de las muestras que fueron tratadas mediante los métodos directos de buffer de lisis y calentamiento, la detección mediante RT-qPCR se realizó empleando el Kit Bio-*Speedy*.

En la Figura 1 se observa un esquema general del procedimiento realizado en esta investigación.

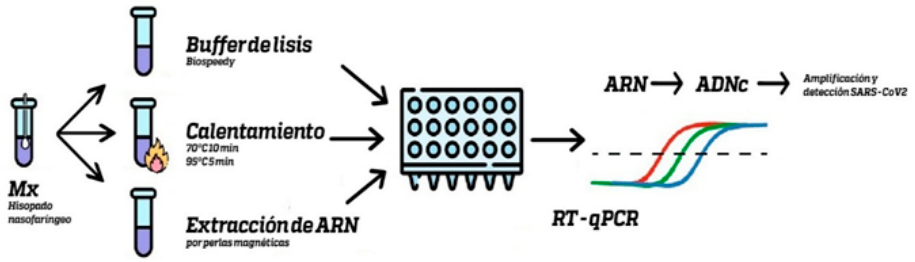


Figura 1: Esquematización general de procedimiento. Fuente: Elaboración propia, 2022.

Resultados

La población de estudio estuvo conformada por 134 muestras, de las cuales 73 (54.4%) se determinaron como muestras positivas y 61 (45.5%) muestras negativas. Esta clasificación se obtuvo a partir de la detección convencional empleando el Kit "Covid-RT-qPCR Detection Kit" (Bioeksen, Turquía).

Comparación entre la detección directa mediante el método de buffer de lisis vs Método de detección con muestras purificadas.

Para la detección directa del SARS-CoV-2 mediante el método de buffer de lisis fue empleado el kit comercial "Viral Nucleic Acid Isolation Kit" (Bioeksen, Turquía), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. En este ensayo se obtuvieron 59 muestras positivas (44,03%) y 75 muestras negativas (55,97%). Estos resultados fueron comparados con los obtenidos mediante el método convencional con muestras purificadas. El análisis de concordancia entre ambos métodos demostró una similitud considerable entre ambos, con un índice Kappa de 0,79, el cual es considerado como "Bueno" (5), demostrándose que existe una buena correlación entre ambos. Y se obtuvo una sensibilidad de 80.82%, especificidad del 100%.

Comparación entre la detección directa mediante el método por calentamiento vs Método de detección con muestras purificadas.

En este ensayo se realizó el calentamiento de todas las muestras a 70°C durante 10 minutos en un termobloque, las cuales posteriormente fueron llevadas directamente a RT-qPCR. Con este método se obtuvieron de un total de 134 muestras, 63 (47.01%) positivas y 71 (52,99%) negativas. Estos resultados fueron comparados con los resultados obtenidos mediante el método convencional, observándose un índice Kappa de 0,85, siendo considerado como "Muy bueno" (5), lo cual demuestra un importante grado de concordancia entre ambos métodos. Además, se obtuvo un porcentaje de sensibilidad del 86,30% y de especificidad del 100%.

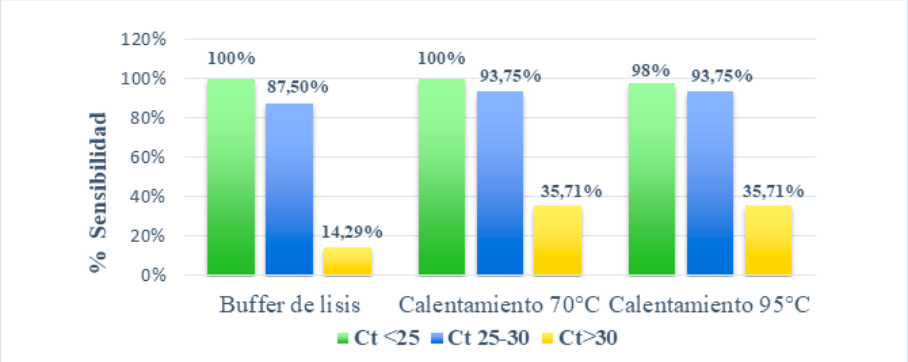
Al igual que en el método por calentamiento a 70°C, para este ensayo se trasladaron las alícuotas de las muestras a un termobloque a una temperatura de 95°C durante 5 minutos y posteriormente fueron llevadas directamente a RT-qPCR para la detección del SARS-CoV-2. En este ensayo se obtuvieron 62 (46,27%) muestras positivas y 72 (55,22%) muestras negativas. Al realizar la comparación con el método de referencia, se pudo observar un grado de concordancia considerado como "Muy bueno" (5), con un índice Kappa de 0,84, el cual demuestra la fuerza de concordancia entre ambos métodos. En cuanto a la sensibilidad y especificidad, se obtuvieron porcentajes de 84,93% y 100% respectivamente.

Comparación de los métodos directos según los valores de Ct y sensibilidad.

Ampliando el análisis, evaluamos la sensibilidad de los métodos según los valores de Ct obtenidos de todas las muestras, las cuales se clasificaron, según la tendencia de resultados, en tres grupos: Ct>30, Ct 25- 30 y Ct <25, destacando que las metodologías de detección directa tienen una sensibilidad entre 98 y 100% para las muestras con Ct menores a 25, y mayor al 87,50% para valores de Ct entre 25- 30. Se elaboró un gráfico donde se observa la comparación entre estos tres grupos en cada una de las metodologías (Gráfico 1).

En el Gráfico 1, se puede observar que el tratamiento con buffer de lisis presentó un menor rendimiento, siendo importante la disminución de la sensibilidad a un 14,29% en muestras con valores de Ct>30; lo mismo se observó en los resultados hallados por calentamiento, con una sensibilidad de detección de tan sólo un 35,71%

Gráfico 1. Sensibilidad de las metodologías de detección directa según los valores de Ct.



en este grupo de muestras. La tasa de falsos negativos fue menor al 20% con los tratamientos evaluados, siendo una constante en muestras de pacientes con Ct>30.

Discusión

Desde sus inicios, la pandemia por la COVID-19 ha representado un desafío para el sector de la salud en materia de diagnóstico, en donde la entrega oportuna de resultados ha sido clave para la contención del número de contagios y por supuesto, para la toma de decisiones en relación al tratamiento de los pacientes. En este contexto, disponer de métodos diagnósticos que permitan realizar la detección del SARS-CoV-2 de forma rápida y confiable se ha convertido en una prioridad, siendo considerados como una alternativa los métodos de detección directa con un paso de extracción sin purificación. En este estudio fueron evaluados tres tratamientos para la detección directa del virus: buffer de lisis, calentamiento a 70°C y 95°C.

En relación a la detección directa, se conoce que el uso de soluciones de buffer de lisis facilita el proceso de extracción del material genético presente en las células, gracias a la presencia de componentes como detergentes y agentes caotrópicos que permiten disolver la membrana celular e inactivar las enzimas que degradan el ARN. Bajo este principio, se evaluó la detección directa del SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR con un tratamiento de las muestras con buffer de lisis, el cual presentó una sensibilidad diagnóstica del 80,82% y una tasa de concordancia del 79% (k=0.79), resultados que reflejan el buen grado de concordancia entre este tratamiento y el método de referencia. Los resultados obtenidos resultaron similares a los hallados en otras investigaciones en las cuales se considera el uso de buffer de lisis para el tratamiento de la muestra como un método alternativo de detección directa del virus, en las cuales se observó una tasa de concordancia del 94% (6).

El segundo método de extracción simple evaluado fue el tratamiento térmico a diferentes temperaturas, el cual se fundamenta en la degradación de la envoltura lipídica del SARS-CoV-2 al aplicarle calor, permitiendo de esta manera, la liberación del material genético. Esta metodología demostró un excelente rendimiento de la prueba en las dos temperaturas evaluadas (70°C y 95°C), presentando una sensibilidad del 86,30% y 84,93% respectivamente, conservando un fuerte grado de concordancia con el método de referencia, datos muy similares a los hallazgos descritos en otros estudios donde se obtuvieron tasas de detección superiores al 90% (7-9).

Al evaluar la variación de los Ct entre cada método directo con el método de referencia, los tres métodos probados no presentaron diferencias significativas con el gold estándar (p=0,92), por lo tanto, cualquiera de ellos puede ser considerados como alternativas de detección directa del SARS-CoV-2.

Otro aspecto importante a resaltar, es que a medida que aumenta el valor de Ct, la sensibilidad del método disminuye considerablemente. Esta tendencia de disminución de la sensibilidad en muestras con valores de ciclo umbral altos (Ct>30) ha sido descrito en varios estudios donde se aplican técnicas de detección directa (6, 9, 10), y es en este grupo donde se encuentran las muestras clasificadas como falsos negativos. En particular, se observó que el método que presentó una mayor disminución de la sensibilidad en este grupo de muestras fue el tratamiento con buffer de lisis, con una sensibilidad de sólo el 14,29%, seguido de un 35,71% para ambas temperaturas por calentamiento (Gráfico1).

En relación a estos hallazgos, es necesario destacar que estas técnicas al evadir el paso de purificación aumentan el riesgo de obtener falsos negativos en muestras con baja carga viral (11-13), ya que, inicialmente existe una menor disponibilidad de material genético, el cual además se encuentra en un medio rico en inhibidores propios de la muestra (proteínas, RNasas) (14), lo cual dificulta su detección.

En segundo lugar, se somete a tratamientos que pueden aumentar la degradación del ARN presente e incluso inhibir la reacción de amplificación; el buffer de lisis contiene sustancias altamente inhibidoras como el Tiocianato de guanidina y detergentes como Tween-20, los cuales afectan la actividad de la ADN polimerasa impactando en la calidad de la reacción (15). Por otra parte, se ha evidenciado que la inactivación de las muestras mediante calentamiento incide en el rendimiento de la prueba, presentando un aumento en los valores de Ct (16) lo que conlleva a resultados falsos negativos en muestras con baja carga viral. Este hecho se debe a que el ARN es una molécula de simple cadena lo que la hace mucho más lábil y por lo tanto, puede degradarse con mayor facilidad (17).

El valor de ciclo umbral (Ct) es inversamente proporcional a la carga viral presente en la muestra, en donde valores de Ct altos son predictores de una posible carga viral baja y un menor riesgo de infectividad (12,

17) por lo tanto, pudiera creerse que aquellos pacientes con resultandos falsamente negativos observados en este estudio no son necesariamente infecciosos, ya que en diversas investigaciones a lo largo de la pandemia han reportado la ausencia de replicación viral in vitro en muestras con baja carga viral (18). Sin embargo, hay que ser cuidadoso al realizar esta interpretación ya que deben ser considerados varios aspectos: primeramente, el valor de ciclo umbral por sí solo no puede ser interpretado directamente como carga viral sin una curva estándar que utilice materiales de referencia (19), y, en segundo lugar, su valor se ve afectado por una compleja diversidad de factores relacionados con las fases pre-analíticas y analíticas principalmente.

Uno de los primeros aspectos a considerar y que forman parte de la etapa pre-analítica es la técnica de recolección y almacenamiento de la muestra, si la toma de muestra ha sido deficiente, con poca área de superficie recorrida por el hisopo, seguramente se recolectará una menor carga viral (20), y si no es almacenada adecuadamente se favorece la degradación del ARN. El tiempo de muestreo y la cinética de carga viral también deben tomarse en cuenta, si la muestra es recolectada en la fase temprana de la infección o fase tardía, hay posibilidades de resultados falsamente negativos por una baja carga viral propia de la cinética del virus (14).

Sin embargo, los resultados demuestran que los métodos probados en el presente estudio tienen una excelente capacidad de detección en pacientes con cargas virales moderadas y altas (Ct <30) (21), con una especificidad del 100%, lo cual indica que todo paciente positivo estará verdaderamente infectado con el virus, esto es muy importante, ya que este tipo de pacientes presentan una mayor tasa de transmisión y un mayor riesgo de desarrollar complicaciones por la COVID-19 (22), es por ello que estos métodos pueden ser bastante útiles para controlar los contagios durante una pandemia especialmente en los escenarios donde hay un aumento exponencial de casos. Además de contribuir con el diagnóstico oportuno del paciente y su tratamiento, reduciendo el tiempo de respuesta y por supuesto, el alto costo que representan los métodos tradicionales de extracción y purificación del ARN.

En relación a aquellos pacientes en los cuales no se haya detectado el virus y tengan antecedentes de contacto con personas sintomáticas, viajes y/o con síntomas sospechosos de la enfermedad, se recomienda realizar el paso de extracción y purificación de las muestras para aumentar la sensibilidad de la RT-qPCR, descartándose de esta manera resultados falsamente negativos.

Adicionalmente, se obtuvo como hallazgo relevante en esta investigación, el impacto que tienen los componentes de los medios de transporte viral en los métodos de detección directa, encontrándose que, de los cuatro medios seleccionados, en sólo uno, ITM-Bioteke, no se observó amplificación ni de la muestra ni del control interno en ninguno de los tres métodos directos probados, lo que indica inhibición de la reacción (23).

Este medio (ITM-Bioteke) se caracteriza por su capacidad de inactivar directamente la muestra gracias a la presencia de diversos agentes como buffer Tris-HCL, EDTA y sales de guanidina, sin embargo, todos ellos son potentes inhibidores de la reacción de PCR (14,15), por lo tanto, aquellas muestras recolectadas en medios de transporte de inactivación no son aptos para ninguno de los métodos de detección directa aplicados en esta investigación ya que se requiere de su purificación para eliminar estos componentes inhibidores. Este hallazgo coincide con reseñas de otros estudios en los cuales destacan la importancia de identificar el poder inhibitorio de diversos medios de transporte en las pruebas libres de purificación (24), ya que sería una limitación en aquellos laboratorios donde se deseen aplicar estos métodos y las muestras estén conservadas en dichos medios.

Esta investigación reporta por primera vez en Venezuela la utilidad de la detección directa a partir de muestras de hisopados nasofaríngeos, en el diagnostico en menor tiempo y en menor costo de COVID-19, mediante RT-qPCR.

Conclusiones

1. La detección directa de SARS-CoV-2 por RT-qPCR, a partir de muestras de hisopado nasofaríngeo es posible por las metodologías de extracción de buffer de lisis y calentamiento (75°C y 95°C), siendo una estrategia para obtener un resultado confiable en menor tiempo y a menor costo.
2. La detección directa de SARS-CoV-2 por RT-qPCR por calentamiento (70°C y 95°C) es una metodología más sensible que la detección por buffer de lisis para muestras con valores de Ct altos.
3. Los resultados obtenidos sugieren que son metodologías ideales como método de detección rápida, las cuales pueden ser implementadas en:

a) Laboratorios que tengan difícil acceso a equipos automatizados para la extracción de ARN viral.

b) Panoramas de alta demanda en los que exista escasez de materiales para el diagnóstico y contención de casos infecciosos con alta carga viral, lo cual ayudaría a agilizar la toma de decisión médica y clínica de los pacientes.

4. Los componentes de inactivación que contienen algunos medios de transporte inhiben la detección del SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR directa con los métodos probados.

5. Este estudio reitera la importancia de búsqueda de metodologías alternativas que se traduce en la implementación y uso de herramientas útiles para el monitoreo de los casos de COVID-19.

Referencias

1. Bruno A, de Mora D, Freire-Paspuel B, Rodriguez AS, Paredes-Espinosa MB, Olmedo M, *et al.* Analytical and clinical evaluation of a heat shock SARS-CoV-2 detection method without RNA extraction for N and E genes RT-qPCR. Int J Infect Dis [Internet]. 2021;109:315-320. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2021.06.038.
2. Li X, Zai J, Zhao Q, Nie Q, Li Y, Foley BT, *et al.* Evolutionary history, potential intermediate animal host, and cross-species analyses of SARS-CoV-2. J Med Virol 2020;92(6):602-611. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1002/jmv.25731.
3. Organización Panamericana de la Salud. La OMS declara que el nuevo brote de coronavirus es una emergencia de salud pública de importancia internacional. 2020. Disponible en: https://www.paho.org/es/noticias/30-1-2020-oms-declara-que-nuevo-brote-coronavirus-es-emergencia-salud-publica-importancia-
4. Organización Panamericana de la Salud. La OMS caracteriza a COVID-19 como una pandemia. 2020. Disponible en: https://www.paho.org/es/noticias/11-3-2020-oms-caracteriza-covid-19-como-pandemia.
5. Altman DG. Practical statistics for medical research. Primera edición. Chapman and Hall. New York, Washington D.C. 1991, 624p. Disponible en: https://doi.org/10.1201/9780429258589.
6. Israeli O, Beth-Din A, Paran N, Stein D, Lazar S, Weiss S, *et al.* Evaluating the efficacy of RT-qPCR SARS-CoV-2 direct approaches in comparison to RNA extraction. Int J Infect Dis [Internet]. 2020;99:352-354. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32791207/.
7. Fomsgaard AS, Rosenstierne MW. An alternative workflow for molecular detection of SARS-CoV-2 – escape from the NA extraction kit-shortage, Copenhagen, Denmark, March 2020. Euro Surveill [Internet]. 2020;25(14):2000398. Disponible en: http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.es.2020.25.14.2000398.
8. Calvez R, Taylor A, Calvo-Bado L, Fraser D, Fink CG. Molecular detection of SARS-CoV-2 using a reagent-free approach. PLoS One [Internet]. 2020;15(12):e0243266. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0243266.
9. Domnich A, De Pace V, Pennati BM, Caligiuri P, Varesano S, Bruzzone B, *et al.* Evaluation of extraction-free RT-qPCR methods for SARS-CoV-2 diagnostics. Arch Virol 2021;166(10):2825-2828. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/s00705-021-05165-0.
10. Pearson JD, Trcka D, Lu S, Hyduk S, Jen M, Aynaud M, *et al.* "Comparison of SARS-CoV-2 indirect and direct RT-qPCR detection methods." Virol J 2021;18:99. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1186/s12985-021-01574-4.
11. Jefferson T, Spencer EA, Brassey J, Heneghan C. Viral cultures for Coronavirus disease 2019 infectivity assessment: A systematic review. Clin Infect Dis [Internet]. 2021;73(11):e3884-3899. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciaa1764.
12. Bullard J, Dust K, Funk D, Strong JE, Alexander D, Garnett L, *et al.* Predicting infectious severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 from diagnostic samples. Clin Infect Dis [Internet]. 2020;71(10):2663-2666. Disponible en: https://dx.doi.org/10.1093/cid/ciaa638.
13. Tom MR, Mina MJ. To interpret the SARS-CoV-2 test, consider the cycle threshold value. Clin Infect Dis [Internet]. 2020;71(16):2252-2254. Disponible en: https://dx.doi.org/10.1093/cid/ciaa619.
14. Rahbari R, Moradi N, Abdi M. RRT-PCR for SARS-CoV-2: Analytical considerations. Clin Chim Acta [Internet]. 2021;516:1-7. Disponible en: https://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2021.01.011.
15. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. J Appl Microbiol [Internet]. 2012;113(5):1014-1026. Disponible en: https://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x.
16. Li D, Wang D, Dong J, Wang N, Huang H, Xu H, *et al.* False-negative results of real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction for severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2: Role of deep-learning-based CT diagnosis and insights from two cases. Korean J Radiol [Internet]. 2020;21(4):505-508. Disponible en: https://dx.doi.org/10.3348/kjr.2020.0146.
17. Sandoval Rodríguez A, Martínez Rizo A, López de la Mora D. Extracción de ácidos nucleicos. En: A.M. Salazar Montes, A.S. Sandoval Rodríguez, J.S.

Armendáriz Borunda (editores). Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. Primera edición. McGrawHill Interamericana. México 2013, pp. Disponible en: https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1473&sectionid=102743658.

18. Basile K, McPhie K, Carter I, Alderson S, Rahman H, Donovan L, *et al*. Cell–based culture of SARS-CoV-2 informs infectivity and safe de-isolation assessments during COVID-19. Clin Infect Dis 2021;73(9):e2952-e2959. https://dx.doi.org/10.1093/cid/ciaa1579.
19. Al Bayat S, Mundodan J, Hasnain S, Sallam M, Khogali H, Ali D, *et al*. Can the cycle threshold (Ct) value of RT-PCR test for SARS CoV2 predict infectivity among close contacts? J Infect Public Health [Internet]. 2021;14(9):1201-1205. Disponible en: https://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2021.08.013.
20. Centers for Disease Control and Prevention. Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Persons Under Investigation (PUIs) for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). 2020. https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html.
21. Rabaan AA, Tirupathi R, Sule AA, Aldali J, Mutair AA, Alhumaid S, *et al*. Viral Dynamics and Real-Time RT-PCR Ct Values Correlation with Disease Severity in COVID-19. Diagnostics 2021;11(6):1091. https://doi.org/10.3390/diagnostics11061091.
22. Hiroi S, Kubota-Koketsu R, Sasaki T, Morikawa S, Motomura K, Nakayama EE, *et al*. Infectivity assay for detection of SARS-CoV-2 in samples from patients with COVID-19. J Med Virol [Internet]. 2021;93(10):5917-5923. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1002/jmv.27145.
23. Kavlick M F. "Development of a universal internal positive control." BioTechniques 2018;65(5):275-280. http://dx.doi.org/10.2144/btn-2018-0034.
24. Merindol N, Pépin G, Marchand C, Rheault M, Peterson C, Poirier A, *et al*. SARS-CoV-2 detection by direct rRT-PCR without RNA extraction. J Clin Virol [Internet]. 2020; 128(104423):104423. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104423.