

## UN NUEVO ENFOQUE PARA IDENTIFICAR SARS COV-2 BASADO EN MULTIPLEX RT-PCR Y ELECTROFORESIS CAPILAR

---

### *Susana Revollo*

Laboratorio de Genética Molecular,  
Instituto SELADIS, Facultad de Ciencias  
Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad  
Mayor de San Andrés  
La Paz – Bolivia  
<https://orcid.org/0000-0001-6674-7316>

### *Yashira Cerruto*

Laboratorio de Genética Molecular,  
Instituto SELADIS, Facultad de Ciencias  
Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad  
Mayor de San Andrés  
La Paz – Bolivia  
<https://orcid.org/0000-0003-4585-0669>

### *Marcos Conde*

Laboratorio de Genética Molecular,  
Instituto SELADIS, Facultad de Ciencias  
Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad  
Mayor de San Andrés  
La Paz – Bolivia  
<https://orcid.org/0000-0003-0720-3081>

### *Miguel Cornejo*

Departamento de Tecnologías de la  
Información y Comunicación, Universidad  
Mayor de San Andrés  
La Paz - Bolivia  
<https://orcid.org/0000-0001-8001-5242>

All content in this magazine is licensed under a Creative Commons Attribution License. Attribution-Non-Commercial-Non-Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0).



**Victor Manuel Miranda**

Consultora SIG Acreditación & Certificación

La Paz - Bolivia

<https://orcid.org/0000-0002-9015-9431>

**Resumen:** La detección rápida de SARS-CoV-2 en pacientes es una herramienta crítica para monitorear la propagación de la enfermedad, guiar las decisiones terapéuticas y diseñar protocolos de distanciamiento social. La prueba de RT-PCR en tiempo real para la identificación de SARS-CoV-2, utilizada como prueba “Gold Estándar” desde el inicio de la pandemia COVID 19, ha mostrado en algunos estudios, resultados falsos negativos y falsos positivos, por lo que se ha visto indispensable contar con una prueba que discrimine claramente estos resultados. La electroforesis capilar (EC) es una herramienta de separación de biomoléculas, que puede realizarse en corto tiempo, se requiere de pequeñas cantidades de muestra y tiene una alta reproducibilidad. Estas características hacen que la EC sea un método eficiente y económico con capacidad de separar cientos de componentes de forma simultánea, razones suficientes para ser una herramienta de elección para la identificación de SARS-CoV-2. En el estudio se describe un enfoque técnico para la identificación de SARS-CoV-2 mediante la amplificación de secuencias del genoma viral de los genes N, S, y ORF1ab por Multiplex RT-PCR, seguido de una electroforesis capilar (Multiplex RT-PCR- EC). La validación de esta prueba ha demostrado ser un método selectivo en un 97%, específico en un 91%, sensible en un 100%, con una eficiencia del 98% y una precisión del 100%. Esta prueba ha permitido, además, identificar resultados falsos positivos de COVID 19 diagnosticados con RT-PCR en tiempo real en un 16% de los pacientes incluidos en el estudio. La prueba Multiplex RT-PC-EC puede ser una alternativa para facilitar el análisis cuando, por un lado, la demanda de pruebas de COVID-19 excediera la capacidad de la PCR y por otro, cuando se genere una incertidumbre en el valor de CT obtenido por RT-PCR en tiempo real.

**Palabras clave:** SARS-CoV-2, Multiplex RT-

## INTRODUCCIÓN

El brote del coronavirus SARS-CoV-2, que comenzó en Wuhan, China en diciembre de 2019, se ha extendido rápidamente a múltiples países como una pandemia global. Para limitar la propagación de este virus y superar las crisis de la COVID-19 es importante identificar a los individuos sospechosos y aislarlos, lo que requiere pruebas diagnósticas confiables (Liu *et al.*, 2020).

Las técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa (RT-PCR) en tiempo real (cuantitativa) se consideran el estándar de oro para el diagnóstico de COVID-19 [Park *et al.*, 2020; Shen *et al.*, 2020)]. Muchas empresas están respondiendo al desafío y desarrollando Kits diagnósticos de COVID-19 en base al RT PCR en tiempo real. Sin embargo, estas tecnologías diagnósticas tienen limitaciones específicas y reportan varios casos falsos positivos y falsos negativos, especialmente durante las primeras etapas de la infección (Afzal, 2020).

Diversos estudios han abordado este desafío y estos esfuerzos han dado lugar a la comercialización de una variedad de kits de RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico molecular de COVID 19. Se han propuesto muchos protocolos para detectar el virus SARS-CoV-2 en fluidos nasofaríngeos, como la Múltiple RT-PCR [Ulloa *et al.*, 2020; Kudo *et al.*, 2020], CRISPR/Cas12 (Broughton *et al.*, 2020; Ali *et al.*, 2020) y CRISPR-Cas3 (Yoshimi *et al.*, 2020) inmunoensayo de flujo lateral (Chen (a) *et al.*, 2020), sensores biomoleculares basados en papel (Kasetsirikul *et al.*, 2020), pruebas SHERLOCK (Joung *et al.*, 2020), DNA aptamer (Chen (b) *et al.*, 2020), amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) (Jang *et al.*, 2021) y la electroforesis capilar de fragmento de ADN (Gómez *et al.*,

2020; Buszewski *et al.*, 2021).

La electroforesis capilar es una herramienta de separación de ácidos nucleicos, que presenta una alta resolución y puede realizarse en corto tiempo utilizando pequeñas cantidades de muestra, con una alta reproducibilidad, siendo una buena alternativa para el diagnóstico molecular de COVID 19.

Dado que la comprensión de los diagnósticos moleculares para COVID-19 todavía está evolucionando, sus limitaciones en el actual escenario de pandemia se deliberan para plantear preguntas de investigación futuras que mejorarían las tecnologías de diagnóstico para COVID-19 y sus variantes, además de futuras enfermedades infecciosas emergentes.

En el presente estudio, se describe un enfoque técnico de identificación de SARS-CoV-2 mediante la amplificación de fragmentos del genoma viral con 3 cebadores de los genes de las proteínas N, S, y ORF1ab, seguidos de una electroforesis capilar (Multiplex RT-PCR- EC) en un equipo ABI 3500. Asimismo, se realizó la validación de esta prueba como diagnóstico molecular para COVID 19 tomando como prueba “gold estándar” a la técnica RT-PCR en tiempo real.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MUESTRAS

90 muestras de hisopado nasofaríngeo y orofaríngeo de pacientes con antecedentes presuntivo de COVID 19 (con diagnóstico clínico de sospecha de COVID 19 o que hubiera estado junto a un paciente positivo para COVID 19), fueron incluidas en el estudio. Las muestras fueron derivadas de los Laboratorios de Genética y Diagnóstico Molecular LABOGEN SRL de la ciudad de La Paz y el Laboratorio MikroMol de la ciudad de El Alto. Además, muestras colectadas en el Instituto SELADIS fueron también incluidas en el estudio.

Se tomaron muestras de hisopado nasofaríngeo y orofaríngeo en medios exclusivos de transporte viral, según la Guía para el Manejo del COVID-19 del Ministerio de Salud y Deportes (Min. Salud, 2020).

## **DETECCIÓN DE SARS-COV-2 POR RT-PCR EN TIEMPO REAL**

### **a) Extracción del ARN viral**

El aislamiento del ARN de SARS-CoV-2 se realizó mediante el uso del kit PureLink de Invitrogen™, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

### **b) Cuantificación del ARN extraído**

Las cuantificaciones se realizaron por fluorometría utilizando el equipo Qubit de Applied Biosystems™. Antes de cada medición, el equipo fue calibrado utilizando un kit de calibración exclusivo para el mismo.

### **c) RT-PCR en Tiempo Real**

La mezcla de reacción se realizó mediante el uso del kit RIDA®GENE SARS-CoV-2 RUO r-biopharm, siguiendo las recomendaciones del fabricante. en un volumen final de 25 µl, la misma que incluye los siguientes reactivos: 19,3 µl del Mix PCR más 0,7 µl del Mix de Enzimas y 5 µl del ARN extraído de la muestra.

La mezcla fue dispensada en tiras de tubos ópticos PCR y sellada con tiras de tapas ópticas ambos de Thermo Scientific™. Se utilizaron como controles, un ARN como Control Interno de inhibición, un Control Positivo SARS-CoV-2 y un Control Negativo.

Las condiciones de reacción de la RT-PCR en Tiempo Real se ajustaron de la siguiente manera:

1) Transcripción inversa a 58°C durante 10 min, 2) Desnaturalización inicial a 95°C durante 1 minuto, 3) 45 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 10 seg y el alineamiento y extensión a a 60°C durante 30 seg. El equipo utilizado para el PCR en tiempo

real fue el termociclador StepOne Plus™ de Applied Biosystems™.

## **DETECCIÓN DE SARS-COV-2 POR MULTIPLEX RT-PCR Y ELECTROFORESIS CAPILAR (MULTIPLEX RT-PCR-EC)**

### **a) Extracción del ARN viral**

El aislamiento del ARN de SARS-CoV-2 se realizó mediante el uso del kit PureLink de Invitrogen™. Al inicio de cada proceso de aislamiento se introdujo a cada muestra 2 µl de un ARN control VetMax Xeno de Invitrogen, como control endógeno para posterior síntesis y detección del ADNc.

### **b) Multiplex RT-PCR**

El proceso de transcripción reversa y amplificación por multiplex PCR, se realizó en un solo paso, utilizando el master mix Taqman Fast Virus 1 step Master Mix (4X) de Applied Biosystems. Se utilizaron 3 pares de cebadores marcados con fluorocromos (Primer orf 1ab Forward/Reverse, Primer S protein Forward/Reverse, Primer N protein, Forward/Reverse) para amplificar las secuencias de los genes de las proteínas ORF-1ab, S y N de SARS-CoV-2.

Las secuencias y concentraciones de los cebadores utilizadas para amplificación del ADN por Multiplex PCR se resumen en la Tabla 1.

Todas las mezclas de PCR utilizadas, se prepararon de acuerdo con las recomendaciones del fabricante ThermoFisher™. Tanto los cebadores como el control positivo endógeno de ARN fueron diluidos a una concentración de 1:100 en Tampón TE, haciendo un pool de los mismos que fue añadido a la mezcla de PCR, haciendo un volumen total de 4 µl por tubo (Tabla 2). El procedimiento fue realizado en un Termociclador Veriti™ de Applied Biosystems™. Utilizando un proceso de ciclaje de 40 ciclos.

La amplificación se realizó en 40 ciclos

	SECUENCIAS Y CONCENTRACIÓN CEBADOR EN DIRECCIÓN ANVERSA	SECUENCIA Y CONCENTRACIÓN CEBADOR EN DIRECCIÓN REVERSA
<b>GEN Orf 1ab</b>	Polyprotein orf1-ab forward 5-TGCCTGGAATATTGGTGAA-3 Orf 1 ab 5' (primer forward) 80 uM	Polyprotein orf1-ab reverse 5-ACAATTTCAACAAGCACAGGTTGAG-3 Orf 1 ab 5' (primer reverse) 80 uM
<b>GEN S</b>	S gene forward 5-TCGAAGACCCAGTCCCTACTTATT-3 Gen "S" 5' (primer forward) 80 uM	S gene reverse 5-CTGAAGAAGAATCACCAGGAGTCAA-3 Gen "S" 5' (primer reverse) 80 uM
<b>GEN N</b>	N gene forward 5-GGACCAGGAACTAATCAGACAAGGA-3 Gen "N" 5' (primer forward) 80 uM	N gene reverse 5-TTAGGCCTGAGTTGAGTCAGC-3 Gen "S" 5' (primer reverse) 80 uM
<b>Control Positivo Endógeno de ARN</b>	VetMAX Xeno RNA control forward 5-GCTGACTCCAGTGGTGAAAC-3 CE de ARN (primer forward) 80 uM	VetMAX Xeno RNA control reverse 5-ACCCTTGCTAGTAGGTGTAGATTCTC-3 CE de ARN (primer reverse) 80 uM

Tabla 1: Secuencias y concentraciones de los cebadores utilizados en el estudio.

Componente	Volúmen/tubo
Master Mix	2.5 µl
Pool de secuencias de cebadores	1.0 µl
Control positivo endógeno de ARN	0.5 µl
<b>TOTAL</b>	<b>4 µl</b>

Tabla 2: Mezcla de PCR para Multiplex PCR.

	Transcripción reversa	Activación de Polimerasa	Desnaturalización	Hibridación y extensión	Extensión final	Temperatura final
Temperatura	50°C	95°C	95°C	60°C	72°C	4°C
Tiempo	15 minutos	2 minutos	3 segundos	45 segundos	7 minutos	infinito

Tabla 3: Programa de amplificación del ADN transcrito por Multiplex PCR.

Componente	Volúmen
Formamida (HiDi)	8.5
Gene scan liz 600	0.5
DNA amplificado	1.0
<b>TOTAL</b>	<b>10</b>

Tabla 4: Componentes de la solución de corrida.

utilizando el programa descrito en la Tabla 3:

### c) Electroforesis Capilar

Una vez amplificadas las secuencias de ADN de los genes N, S, y ORF1ab de SARS-CoV-2, estos fueron sometidos a la electroforesis capilar por 45 minutos en un Analizador Genético ABI 3500™ de Applied Biosystems™ utilizando un capilar de 36 cm.

Se realizó la preparación de la solución de corrida utilizando los componentes indicados en la Tabla 4 y se dispensaron 10 ul de esta mezcla en cada pocillo de la placa.

Se realizó un proceso de desnaturalización de las muestras llevandolas al Termociclador Veriti™ para un ciclo de desnaturalización a 95°C por 3 minutos y luego la placa fue llevada a -20°C por un tiempo de 2 minutos, finalmente se introdujo la placa en el Analizador Genético ABI 3500™. Se verificó los parámetros de corrida y se realizó la corrida por un tiempo de 25 minutos.

Para la programación de parámetros de corrida se realizó de manera previa una calibración con la matriz de DS 33 (DYE SET G5) para 6-FAM, VIC; NED; PET y TED, se ubicó la placa de reacción en el equipo ABI 3500 y se seleccionó el módulo de corrida en el panel de fragmentos acorde a la longitud del capilar (36 cm), número de capilares (8), tipo de polímero (POP4) y matriz G5. Este procedimiento fue realizado con la asistencia del software Data Collection V.2.5.

Los resultados fueron visualizados a través del software GennMapper V. 1.0, adaptado para la lectura con el fluoróforo VIC, dejando evidenciar los electroferogramas de los fragmentos amplificados.

Los fragmentos generados por los cebadores marcados con el fluoróforo VIC tienen aproximadamente las siguientes longitudes:

- a) Control endogeno (VetMax Xen) : 327 nucleótidos

- b) Gen que codifica para la proteína N: 327 nucleótidos

- c) Gen que codifica para la proteína Orf 1ab : 425 nucleótidos

- d) Gen que codifica para la proteína S : 437 nucleótidos

### d) Interpretación de resultados

Se realizó verificando la presencia o ausencia de los picos generados. Un resultado Positivo para COVID 19 por Multiplex RT-PCR y Electroforesis Capilar se interpretó cuando los picos de los 3 genes del virus SARS-CoV-2 (N, ORF1ab y S) se hicieron visibles en el electroferograma. Se utilizó un control positivo interno (XENO™ RNA CPI) para evidenciar que el procedimiento se realizó correctamente, pico que también fue visualizado, Figura 1.

Un resultado Negativo para COVID 19 por Multiplex RT-PCR y Electroforesis Capilar se interpretó cuando no se visualizó ninguno de los picos de los 3 genes del virus SARS-CoV-2, pero si se visualizó el pico del control positivo interno (XENO™ RNA CPI) Figura 2.

## VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA MULTIPLEX PCR Y ELECTROFORESIS CAPILAR

Con los resultados obtenidos se determinó las características de desempeño de la técnica de Multiplex RT-PCR y Electroforesis Capilar, priorizando los parámetros de sensibilidad, especificidad, selectividad, eficiencia y precisión de la técnica respecto a la RT-PCR en Tiempo Real tomada esta última como prueba "Gold Standart". Se realizaron cálculos estadísticos sobre la base de las fórmulas descritas en la Tabla 5.

## RESULTADOS

De los 90 pacientes estudiados, 44 dieron positivo para SARS-CoV-2 a la prueba RT-PCR en Tiempo Real 37 a la prueba Multiplex

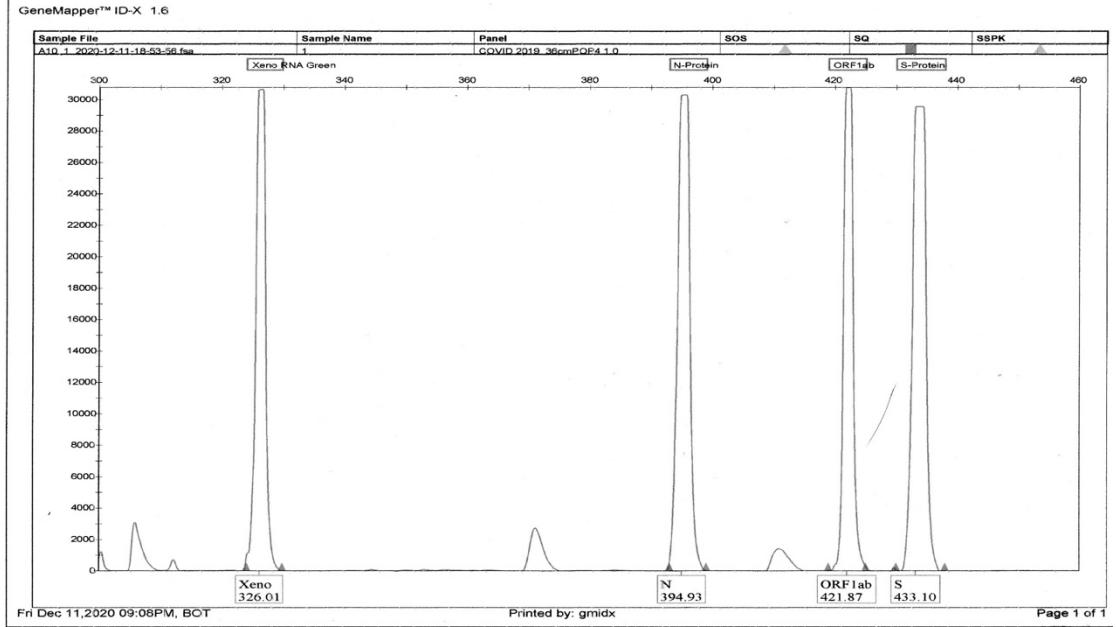


Figura 1: Resultado Positivo para COVID 19 por Multiplex RT-PCR y Electroforesis Capilar donde se puede visualizar los picos de los 3 genes del virus SARS-CoV-2 (N, ORF1ab y S), además se visualizó el pico del control endógeno interno ((XENO™ RNA CPI).

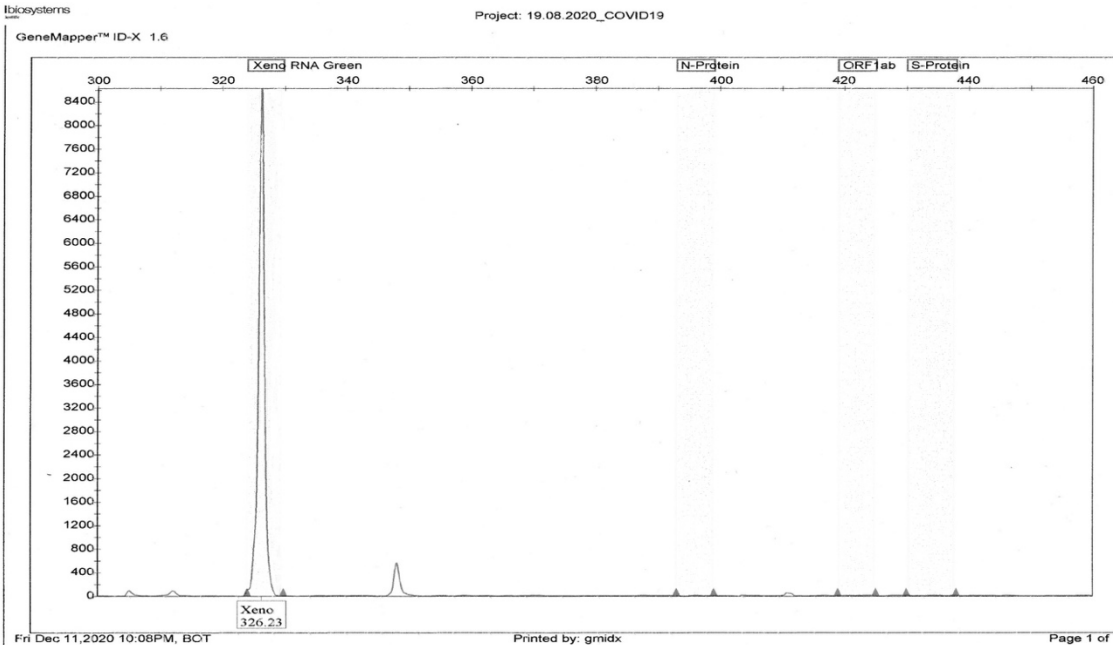


Figura 2: Resultado Negativo para COVID 19 por Multiplex RT-PCR y Electroforesis Capilar donde no se visualiza ninguno de los picos de los 3 genes del virus SARS-CoV-2, pero si se visualizó el pico del control endógeno interno ((XENO™ RNA CPI).

RT-PCR- EC. Se consideró una muestra positiva para RT-PCR en tiempo real, cuando el valor de CT era menor a 35 y una muestra positiva para Multiplex RT-PCR- EC, cuando al menos uno de los tres genes se expresaba en los electroferogramas.

#### **a) Correlación de RT-PCR en Tiempo Real y Multiplex RT-PCR- EC**

Se identificaron 19 pacientes cuyos resultados presentaban curvas de amplificación PCR cercanas al umbral límite de positividad en la prueba RT-PCR en Tiempo Real dando valores de CT entre 29 y 35. De estos pacientes, 6 dieron resultados discordantes en relación a la prueba de Multiplex RT-PCR-EC, es decir fueron diagnosticados como positivos para RT-PCR en Tiempo Real y Negativos para Multiplex RT-PCR-EC. Además, hubo un paciente que con un valor de CT de 23,32 considerado positivo para RT-PCR en Tiempo Real, dio también un resultado negativo para Multiplex RT-PCR-EC (Tabla 6).

#### **b) Validación de la prueba Multiplex RT-PCR-EC**

Para validar la detección de SARS-CoV-2 por Multiplex RT-PCR-EC, al tratarse de un método cualitativo, donde se determina la presencia o ausencia del material genético del virus en la muestra, se re-analizaron las muestras de resultado conocido y controles positivos que se compararon en una matriz para hallar las tasas de verdaderos positivos, verdaderos negativos, falsos negativos y falsos positivos (Figura 3).

Para realizar el cálculo de tasas de verdaderos positivos y verdaderos negativos se estructuró las tablas de presuntos verdaderos y falsos y precisión relativa en el marco de los parámetros de desempeño. Además, se hizo una correlación de estos datos (Tablas 7, 8 y 9).

#### **c) Características de desempeño en la detección de SARS CoV-2**

Las características de desempeño de la técnica Multiplex RT-PCR-EC comparados con la técnica de RT-PCR en Tiempo Real, como técnica Gold Estándar, se resumen en la Tabla 10.

##### **a) Tasa de falsos positivos**

La tasa de falsos positivos detectada en la prueba Multiplex RT-PCR-EC para la detección de ARN viral de SARS-CoV-2 es 3 %, según la cantidad de muestras que fueron analizadas significa que puede ser asignado un caso como falso positivo; sin embargo, esto puede darse no necesariamente porque el método no es confiable, sino porque pudo haber ocurrido algún evento aleatorio que haya interferido en el proceso.

##### **b) Tasa de falsos negativos**

La tasa de falsos negativos detectada en la prueba es 0 %, estos resultados nos permiten mencionar que el método en proceso de validación es específico porque tiene la capacidad de detectar lo que se busca sin confundirlo con algún componente de la matriz que se analiza o contaminación del medio en el cual se realiza la prueba.

##### **c) Sensibilidad**

El método es sensible en un 100 %, permite la detección de ARN viral de SARS-CoV-2 a partir de 0.5 ng/uL. Según los parámetros de concentración establecidos, el equipo detecta con alta confiabilidad y sin problemas la presencia del virus, pese a que pueda coexistir en la muestra un extracto de ARN humano que pudo ser obtenido en el proceso de extracción del material genético (ARN). Asimismo, el equipo utilizado para esta metodología (analyzer genético ABI 3500) responde adecuadamente en la emisión de señal respecto a los cambios de concentración



<b>Característica de desempeño</b>	<b>Cálculo</b>
Tasa de falsos positivos	$c/(a+c)$
Tasa de falsos negativos	$b/(b+d)$
Especificidad	$d/(c+d)$
Sensibilidad	$a/(a+b)$
Selectividad	$a/n$
Eficiencia	$(a+d)/n$

Tabla 5: Formulas para determinar las características de desempeño.

Nº	Código	RT-PCR en Tiempo Real	VALOR DE CT	Multiplex RT-PCR-EC	Discordancia de Técnicas
1	lgm/covid-19/8	Positivo	23,32	Negativo	discordante
2	lgm/covid-19/23	Positivo	30,1	Positivo	
3	lgm/covid-19/25	Positivo	31,82	Negativo	discordante
4	lgm/covid-19/26	Positivo	29,69	Negativo	discordante
5	lgm/covid-19/43	Positivo	33	Positivo	
6	lgm/covid-19/51	Positivo	35	Positivo	
7	lgm/covid-19/64	Positivo	34.22	Positivo	
8	lgm/covid-19/66	Positivo	35	Negativo	discordante
9	lgm/covid-19/67	Positivo	33	Positivo	
10	lgm/covid-19/70	Positivo	33	Negativo	discordante
11	lgm/covid-19/71	Positivo	31	Negativo	discordante
12	lgm/covid-19/76	Positivo	32	Negativo	discordante
13	lgm/covid-19/77	Positivo	31	Positivo	
14	lgm/covid-19/78	Positivo	31	Positivo	
15	lgm/covid-19/79	Positivo	35	Positivo	
16	lgm/covid-19/83	Positivo	33	Positivo	
17	lgm/covid-19/84	Positivo	30	Positivo	
18	lgm/covid-19/86	Positivo	33	Positivo	
19	lgm/covid-19/88	Positivo	33	Positivo	
20	lgm/covid-19/90	Positivo	33	Positivo	

Tabla 6: Resultados de RT-PCR en Tiempo Real con valores cercanos al umbral de positividad y resultados discordantes con la técnica Multiplex RT-PCR- EC.

N°	Nivel Negativo			Nivel 1 Limite de Detección			Nivel 2 Limite de Detección			Nivel 3 Limite de Detección			Nivel Validación			Nivel Validación			Nivel Precisión			Nivel Precisión					
	YC	MC	Categoría	2 ng/uL	2 ng/uL	Categoría	1 ng/uL	1 ng/uL	Categoría	0.5 ng/uL	0.5 ng/uL	Categoría	YC	MC	Categoría	MCh	MC	Categoría	YC	MC	Categoría	YC	MC	Categoría			
				EC	RT-PCR		EC	RT-PCR		EC	RT-PCR														EC	RT-PCR	EC
	Presuntivo	Confirmad	RT-PCR	Presuntivo	Confirmad	RT-PCR	Presuntivo	Confirmad	RT-PCR	Presuntivo	Confirmad	RT-PCR	Presuntivo	Confirmad	RT-PCR	Presuntivo	Confirmad	RT-PCR	Presuntivo	Confirmad	RT-PCR	Presuntivo	Confirmad	RT-PCR	Presuntivo	Confirmad	RT-PCR
1	-	-	d	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a
2	-	-	d	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a
3	-	-	d	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a
4	-	-	d	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a
5	-	-	d	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a	+	+	a
6	-	-	d																								
7	-	-	d																								
8	-	-	d																								
9	-	-	d																								
10	-	-	d																								

Figura 3. Matriz para detectar resultados verdaderos positivos (a), verdaderos negativos (d), falsos positivos (c) y falsos negativos (b); n=total de muestras.

Categoria		Total
Verdaderos positivos	a	34
Falsos negativos	b	0
Falsos positivos	c	1
Verdaderos negativ.	d	10
Total		45

		Resultados presuntivos		
		+	-	
Resultados confirmados	+	34	0	34
	-	1	10	11
		35	10	45

Tabla 7: Cálculo de los presuntos verdaderos y falsos / Parámetros de desempeño.

Categoria		Total
Verdaderos positivos	a	20
Falsos negativos	b	0
Falsos positivos	c	0
Verdaderos negativos	d	0
Total		20

		Resultados presuntivos		
		+	-	
Resultados confirmados	+	20	0	20
	-	0	0	0
		20	0	20

Tabla 8: Cálculo de la precisión relativa / Parámetros de desempeño.

		<b>Recuento presuntivo</b>		
		+	-	
<b>Recuento confirmado</b>	+	A	B	a + b
	-	C	D	c + d
		a + c	b + d	N

Tabla 9. Correlación de datos, donde a = verdaderos positivos, b = falsos negativos, c = falsos positivos, d = verdaderos negativos y n = total (muestras + controles).

Parámetro	Resultado	Criterio de Evaluación	Evaluación
Tasa de falsos positivos	3%	NA	La tasa de falsos positivos es 3 %
Tasa de falsos negativos	0%	NA	La tasa de falsos negativos es 0 %
Sensibilidad	100%	≥ 90%	El método es sensible en un 100 %, detecta ARN de SARS-CoV-2 a partir de 0.5 ng/UI
Especificidad	91%	≥ 90%	El método es específico en un 91%, cumple el requisito
Selectividad	97.6%	> 10%	El método tiene una selectividad mayor al 10%, cumple el requisito
Eficiencia (Exactitud Relativa)	98%	≥ 95%	Las concentraciones de ARN de SARS-CoV-2 correctamente asignadas en la cuantificación presuntiva es del 98 %
Precisión relativa (repetibilidad / precisión intermedia)	100%	≥ 95%	La repetibilidad de un analista y precisión entre analistas es del 100%

\*NA= No Aplica

Tabla 10: Parámetros de desempeño de la técnica Multiplex RT-PCR-EC.

del material genético (ARN) en la muestra.

#### **d) Especificidad**

El método es específico en un 91%, por tanto la prueba cumple el requisito de especificidad, es decir la capacidad de poder detectar los verdaderos negativos, en las muestra analizadas de pacientes realmente sanos, en el caso de la prueba de detección Multiplex RT-PCR-EC, nos permite evaluar que realmente no existe presencia de ARN de SARS-CoV-2 en la muestra analizada. La especificidad obtenida del 91%, indica que se produce una respuesta adecuada del método respecto a la capacidad de detectar los verdaderos negativos.

#### **e) Selectividad**

La selectividad para la prueba Multiplex RT-PCR-EC fue de un 97%. Estos resultados nos indican que la prueba Multiplex RT-PCR-EC es selectiva y dentro de la matriz que se analiza, que en este caso es una muestra de hisopado nasofaríngeo. No existen elementos significativos como para que la prueba no sea capaz de detectar puede detectar el ARN viral de SARS-CoV-2 en una muestra.

#### **f) Eficiencia (Exactitud relativa)**

El 98% de las veces el resultado de la prueba Multiplex RT-PCR-EC, es correctamente asignado al resultado confirmatorio, es decir al "Gold Standard" que en este caso es la prueba de RT-PCR en Tiempo Real.

#### **g) Precisión relativa (Repetibilidad/ precisión intermedia)**

La precisión obtenida del 100% indica que las influencias aleatorias como el medio ambiente y cambio de operador o analista no influyen en los resultados. Estos resultados se obtuvieron a partir de diferentes ensayos realizados por dos analistas diferentes, capacitados en el desarrollo de la prueba

Multiplex RT-PCR-EC, en diferentes días y condiciones ambientales.

## **DISCUSION**

Durante la pandemia de COVID 19, la única manera de combatir al virus, es limitar su propagación, lo que solo es posible si las personas afectadas son detectadas y separadas lo antes posible. La detección de SARS-CoV-2 en muestras de pacientes es una herramienta crítica para monitorear la propagación de la enfermedad, guiar las decisiones terapéuticas y diseñar protocolos de distanciamiento social. Si esta detección es rápida y eficiente es una de las formas más eficaces de prevenir su distribución y reducir los estragos causados por este virus (Law *et al.*, 2020).

El mundo científico de hoy se enfrenta a un enorme desafío: cómo desarrollar nuevos métodos de identificación de patógenos que sean rápidos, baratos y fáciles de usar, así como precisos y reproducibles. El rápido desarrollo de la biología molecular ha permitido el uso de una herramienta de diagnóstico más precisa, que es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Adzitey *et al.*, 2013). Una versión cuantitativa de esta, es el PCR en tiempo real. La detección de ácidos nucleicos virales amplificados en PCR cuantitativo se realiza con sondas fluorescentes específicas que incluyen una pequeña secuencia de nucleótidos asociada al indicador fluorescente (Buszewski *et al.*, 2017).

La primera técnica recomendada para su diagnóstico por el CDC de China fue la RT-PCR en tiempo real que conlleva una previa retrotranscripción. Esta técnica es muy utilizada durante la actual pandemia de COVID-19 (Corman *et al.*, 2020). La técnica es muy sensible, ya que cualquier impureza derivada de la muestra clínica puede inhibir la Taq polimerasa y dar lugar a resultados falsos negativos (Bergallo *et al.*, 2006). Es aún más esencial para los virus que contienen

ARN, donde la identificación comienza con la retrotranscripción del ARN al ADN mediante transcripción inversa. Se demostró que la alta concentración de ARN viral en la muestra puede inhibir la transcripción inversa-PCR (Drosten *et al.*, 2002). Esta podría ser la razón de los resultados falsos negativos del SARS-CoV-2 con la prueba de RT-PCR en tiempo real en los pacientes con síntomas clínicos de COVID-19, como lo demostraron Li y otros (Li *et al.*, 2020). Las estadísticas recogidas en la sección haitiana de Beijing del Tercer Hospital de la Universidad de Pekín del 21 al 31 de enero de 2020 muestran que aproximadamente el 20% de las pruebas fueron falsas negativas (Li *et al.*, 2020).

La electroforesis capilar (EC) es una herramienta de separación de biomoléculas, que en los últimos años ha tenido gran importancia en medicina (García-canas & Cifuentes, 2007; Martínez-Gómez *et al.*, 2007). La información acumulada gracias a la EC comienza a vislumbrar las causas genéticas de muchas enfermedades, fortaleciendo el diagnóstico y reemplazando muchas de las metodologías clásicas para el estudio de la medicina genómica (Liu *et al.*, 2007).

Usualmente el análisis de los diferentes analitos puede realizarse en unos minutos; se requiere de pequeñas cantidades de muestra, en el rango de nanolitros, con una alta reproducibilidad, y con un error estándar relativo de tiempo de migración menor a 0,5% (Magaña *et al.*, 2009).

Estas características hacen de la EC un método eficiente y económico con capacidad de separar cientos de componentes de forma simultánea, empleando mínimas cantidades de muestras y reactivos, razones suficientes para ser una herramienta de elección para la identificación de SARS-COV-2.

La identificación de SARS-Cov-2 en el presente trabajo, amplificando secuencias de los genes S, N y ORF1ab por un multiplex RT-

PCR, seguido de una electroforesis capilar, ha resultado ser un método selectivo en un 97%, específico en un 91% y sensible en un 100%. Además, de haber mostrado una eficiencia del 98% y una precisión del 100%, que indica que las influencias aleatorias como el medio ambiente y cambio de operador o analista no influyen en los resultados.

La prueba Multiplex RTPCRECOptimizada en el presente estudio, ha permitido identificar resultados falsos positivos de COVID 19 diagnosticados con RT-PCR en tiempo real en un 16% de los pacientes incluidos en la investigación. Estos pacientes presentaban un CT cercanos al umbral de positividad. Estos hechos se pueden dar con frecuencia en los laboratorios de biología molecular cuando el analista obtiene resultados cercanos al umbral de positividad, generando una incertidumbre al momento de reportar el resultado.

La finalidad de este estudio no ha sido sustituir la técnica de RT-PCR en tiempo real que es la prueba gold standar, sino desarrollar una alternativa para facilitar el análisis cuando, por un lado, la demanda de pruebas de COVID 19 excediera la capacidad de la PCR (Gómez *et al.*, 2020) y por otro, cuando se genere una incertidumbre en el valor de CT obtenido por RT-PCR en tiempo real.

El acoplamiento de los métodos estándar de PCR con la electroforesis capilar parece ser una herramienta muy poderosa para superar los límites impuestos a muchos laboratorios por los requisitos de PCR y así aumentar la capacidad de ensayo (Buszewski *et al.*, 2021).

Las limitaciones de las tecnologías de PCR, ponen de relieve los desafíos futuros de investigación y desarrollo para permitir un diagnóstico oportuno, rápido, de bajo costo y preciso de las enfermedades infecciosas emergentes.

## CONCLUSIONES

1. Se identificaron pacientes con resultados

con un valor de CT cercano al umbral límite de positividad en la prueba RT-PCR en Tiempo Real, los mismos que, en un 80% dieron resultados discordantes, es decir positivos para RT-PCR en Tiempo Real y negativos para Multiplex RT-PCR-EC.

2. La prueba Multiplex RT-PCR-EC para la identificación de SARS-CoV-2 fue optimizada de manera muy eficiente y rápida, toda vez que esta técnica utiliza reactivos exclusivos aptos para procesar en un sistema automatizado y emitir resultados confiables.

3. Los resultados obtenidos en el proceso de validación de la prueba Multiplex RT-PCR-EC en relación a la prueba de RT-PCR en Tiempo Real, muestra que es un método selectivo en un 97%, específico en un 91% y sensible en un 100%.

4. Estos resultados han permitido ofrecer servicios de diagnóstico molecular de COVID 19 a la sociedad en general, a través de la prueba “Multiplex RT-PCR-EC”, la misma que ha sido autorizada por el Servicio Departamental de Salud de La Paz (SEDES) y la Universidad Mayor de San Andrés.

5. Los médicos tratantes de pacientes con COVID 19, después de conocer las ventajas de la prueba “Multiplex RT-PCR-EC” han asumido con responsabilidad que esta prueba es muy útil en aquellos casos en los que las otras pruebas no les orienta claramente en el diagnóstico definitivo.

## REFERENCIAS

- Afzal Adeel. **Molecular diagnostic technologies for COVID-19: Limitations and challenges.** *J Advanced Research* 2020;26: 149-159.
- Ali Z, Aman R, Mahas A, Rao GS, Tehseen M, Marsic T, et al. **iSCAN: An RT-LAMP-coupled CRISPR- Cas12 module for rapid, sensitive detection of SARS-CoV-2.** *Virus research.* 2020; 288:198129. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198129> PMID: 32822689.
- Adzitey F, Huda N., Ali G.R.R. **Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks.** *Biotech.* 2013;3:97–107. doi: 10.1007/s13205-012-0074-4.
- Broughton JP, Deng X, Yu G, Fasching CL, Servellita V, Singh J, et al. **CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2.** *Nature biotechnology.* 2020; 38(7):870–4. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0513-4> PMID: 32300245.
- Bogusław Buszewski, Ewelina Maślak, Michał Złoch, Viorica Railean-Plugaru, Ewa Kłodzińska, and Paweł Pomastowska. **A new approach to identifying pathogens, with particular regard to viruses, based on capillary electrophoresis and other analytical techniques.** *Trends Analyt Chem.* 2021 Jun; 139: 116250.
- Buszewski B, Rogowska A, Pomastowski P, Złoch M, Railean-Plugaru V. **Identification of microorganisms by modern analytical techniques.** *J. AOAC Int.* 2017;100:1607–1623. doi: 10.5740/jaoacint.17-0207.
- Chen Z (a), Zhang Z, Zhai X, Li Y, Lin L, Zhao H, et al. **Rapid and sensitive detection of anti-SARS-CoV-2 IgG, using lanthanide-doped nanoparticles-based lateral flow immunoassay.** *Analytical chemistry.* 2020; 92(10):7226–31. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00784> PMID: 32323974.
- Chen Z (b), Wu Q, Chen J, Ni X, Dai J. **A DNA aptamer based method for detection of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein.** *Virologica Sinica.* 2020; 35:351–4. <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00236-z> PMID: 32451881.
- Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DKW, et al. (2020). **Detection of 2019 Novel Coronavirus (NCoV) by Real-Time RT-PCR.** *Eurosurveillance* 25 (3). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045
- Drosten C, Panning M, Guenther S, Schmitz H. **False-negative results of PCR assay with plasma of patients with severe viral hemorrhagic fever** *J. Clin. Microbiol.* 2002;40:4394–4395. doi: 10.1128/JCM.40.11.4394-4395.2002.
- García-canas V, Cifuentes A. **Detection of microbial food contaminants and their products by capillary electromigration techniques.** *Electrophoresis* 2007; 28: 4013-30.
- Ministerio e Salud y Deportes, Estado Plurinacional de Bolivia. **Guía para el manejo del COVID-19.** Versión Mayo 2020.
- Gómez J, Melón S, Boga J, Alvarez M, Rojo S, Leal A, Castello C, Alvarez V, Cuesta E, Coto E. **Capillary electrophoresis of PCR fragments with 5'-labelled primers for testing the SARS-Cov-2.** *J Virol Methods* 2020; 10; 284: 113937.
- Joung J, Ladha A, Saito M, Kim NG, Woolley AE, Segel M, et al. **Detection of SARS-CoV-2 with SHER- LOCK one-pot testing.** *New England Journal of Medicine.* 2020; 383(15):1492–4.
- Jang WS, Lim DH, Yoon J, Kim A, Lim M, Nam J, et al. **Development of a multiplex Loop-Mediated Iso-thermal Amplification (LAMP) assay for on-site diagnosis of SARS CoV-2.** *PloS one.* 2021; 16(3): e0248042. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248042> PMID: 33657176.
- Jonathan J Magaña, María de la Luz Arenas-Sordo, Rocío Gómez. **La electroforesis capilar como una nueva estrategia en la medicina y el diagnóstico clínico** *Rev Méd Chile* 2009; 137: 946-956.
- Kasetsirikul S, Umer M, Soda N, Sreejith KR, Shiddiky MJ, Nguyen NT. **Detection of the SARS-CoV-2 humanized antibody with paper-based ELISA.** *Analyst.* 2020; 145(23):7680–6. <https://doi.org/10.1039/d0an01609h> PMID: 32975254.
- Kudo E, Israelow B, Vogels CB, Lu P, Wyllie AL, Tokuyama M, et al. **Detection of SARS-CoV-2 RNA by multiplex RT-qPCR.** *PLoS Biology.* 2020; 18(10): e3000867. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000867> PMID: 33027248.
- Law S, Leung AW, Xu C. **Severe acute respiratory syndrome (SARS) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): from causes to preventions in Hong Kong.** *Int. J. Infect. Dis.* 2020;94:156–163. doi: 10.1016/j.ijid.2020.03.059.

Li D, Wang D, Dong J, Wang N, Huang H, Xu H, Xia C. **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.* 2020;21:505–508. doi: 10.3348/kjr.2020.0146.

Liu X, Dahdouh F, Salgado M, Gómez FA. **Recent advances in affinity capillary electrophoresis.** *J Pharm Sci* 2009; 98: 394-410.

Liu R, Fu A, Deng Z, Li Y, Liu T. **Promising methods for detection of novel coronavirus SARS-CoV-2.** *View.* 2020; 1(1):e4.

Martínez-Gómez MA, Carril-Aviles MM, Sagrado S, Villanueva-Camanas RM, Medina-Hernández MJ. **Characterization of antihistamine-human serum protein interactions by capillary electrophoresis.** *J Chromatogr A* 2007; 1147: 261-9.

Park G-S, Ku K, Baek S-H, Kim S-J, Kim SI, Kim B-T, et al. **Development of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays Targeting Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2).** *J Mol Diagn* 2020; 22:729–35. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.03.006>.

Shen M, Zhou Y, Ye J, Abdullah AL-maskri AA, Kang Y, Zeng S, et al. **Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus.** *J Pharm Anal* 2020; 10:97–101. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.02.010>.

Ulloa S, Bravo C, Parra B, Ramirez E, Acevedo A, Fasce R, et al. **A simple method for SARS-CoV-2 detection by rRT-PCR without the use of a commercial RNA extraction kit.** *Journal of virological methods.* 2020; 285:113960. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113960> PMID: 32835738.

Yoshimi K, Takeshita K, Yamayoshi S, Shibumura S, Yamauchi Y, Yamamoto M, et al. **Rapid and accurate detection of novel coronavirus SARS-CoV-2 using CRISPR-Cas3.** *MedRxiv.* <https://doi.org/10.2139/ssrn.3640844>.