



## Pruebas moleculares para la detección de SARS-CoV-2

### Molecular tests for the detection of SARS-CoV-2

José Enrique Oliva Menacho<sup>1</sup>\* <https://orcid.org/0000-0003-4361-585X>

<sup>1</sup>Hospital Nacional Arzobispo Loayza. Lima, Perú.

\*Correo electrónico: [jose.e.oliva.menacho@hotmail.com](mailto:jose.e.oliva.menacho@hotmail.com)

#### RESUMEN

**Introducción:** Los coronavirus generan enfermedades respiratorias, hepáticas o neurológicas, con gravedad variable en su huésped. La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real es la metodología de referencia para confirmar la detección del virus SARS-CoV-2. Se realizó una revisión bibliográfica en el periodo de julio a noviembre de 2021, en los recursos disponibles en MEDLINE, SciELO, Pubmed y Elsevier. Del total de consultas se citaron 35 referencias.

**Objetivo:** Describir las pruebas moleculares para la detección de SARS-CoV-2.

**Desarrollo:** Se han diseñado tres tipos de ensayos de rRT-PCR, para la detección de SARS-CoV-2. Las pruebas descritas son específicas para genes ARN (*polymerase dependent RNA - RdRp*), genes E (upE) y genes Nnes (N). Los Centros para la Prevención y Control de Enfermedades (CDC) de los EE.UU., han desarrollado la rRT-PCR dirigidos a la proteína N de la nucleocápside del material genético SARS-CoV-2, los ensayos genes E (upE) y gen de la proteína 1b (ORF 1b) se pueden complementar para la detección y confirmación.

**Conclusiones:** Las dianas que se emplean para la detección específica del genoma del SARS-CoV-2 por RT-PCR en tiempo real, se encuentran en las regiones ORF1a y 1b, RdRp, N, S y E del ARN viral.

**Palabras clave:** COVID-19; pruebas moleculares; RT PCR; secuenciación.



## ABSTRACT

**Introduction:** Coronaviruses cause respiratory, hepatic or neurological diseases, with variable severity in their host. Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction is the reference methodology to confirm the detection of the SARS-CoV-2 virus. A bibliographic review was carried out in the period from July to November 2021, in the resources available in MEDLINE, SciELO, Pubmed and Elsevier. Of the total queries, 35 references were cited.

**Objective:** Describe molecular tests for the detection of SARS-CoV-2.

**Development:** Three types of rRT-PCR assays have been designed for the detection of SARS-CoV-2. The tests described are specific for RNA polymerase dependent RNA (RdRp) genes, E (upE) genes, and Nnes (N) genes. The United States Centers for Disease Control and Prevention (CDC) have developed rRT-PCR directed at the N protein of the nucleocapsid of the SARS-CoV-2 genetic material, the gene E assays (upE) and protein gene 1b (ORF 1b) can be complemented for detection and confirmation.

**Conclusions:** The targets used for the specific detection of the SARS-CoV-2 genome by real-time RT-PCR are found in the ORF1a and 1b, RdRp, N, S and E regions of the viral RNA.

**Keywords:** COVID-19; molecular tests; RT-PCR; sequencing.

Recibido: 16/12/2021

Aprobado: 30/05/2022

## INTRODUCCIÓN

Los coronavirus (CoV) infectan y causan enfermedades en una amplia variedad de especies, incluidos murciélagos, pájaros, gatos, perros, cerdos, ratones, caballos, ballenas y humanos.<sup>(1)</sup>

Estudios recientes sugieren que los murciélagos actúan como un reservorio natural para los coronavirus.<sup>(2)</sup> Los coronavirus humanos (hCoV) HCoV-229E y HCoV-OC43 se identificaron en 1960 como agentes causantes de enfermedades respiratorias leves.<sup>(3)</sup> Durante la epidemia de 2003 de síndrome respiratorio agudo grave (SARS), los CDC y el Consejo de Epidemiólogos Estatales y Territoriales

<http://scielo.sld.cu>

<http://www.revmedmilitar.sld.cu>



(CSTE) desarrollaron criterios de vigilancia para identificar a las personas con SARS. La definición de caso de vigilancia cambió a lo largo de la epidemia a medida que aumentaba la comprensión de las características clínicas, de laboratorio y de transmisión del coronavirus asociado al SARS (SARS-CoV). En 2002-2003, un coronavirus desconocido: el coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave (SARS) causó un brote generalizado de enfermedades respiratorias en humanos, lo que resultó en 800 muertes y afectó a alrededor de 30 países.<sup>(4)</sup>

Como consecuencia del renovado interés en los coronavirus después del brote de SARS, se conocieron 2 nuevos coronavirus entre 2003 y 2005: HCoV-NL63 en 2004<sup>(5)</sup> y HCoV-HKU1 en 2005.<sup>(6)</sup> Un análisis reciente de una gran colección de muestras nasofaríngeas humanas usando un conjunto de cebadores coronaviridae sugirió que HCoV-229E, OC43, NL63 y HKU1 son los únicos coronavirus que circulan en la población humana.<sup>(7)</sup>

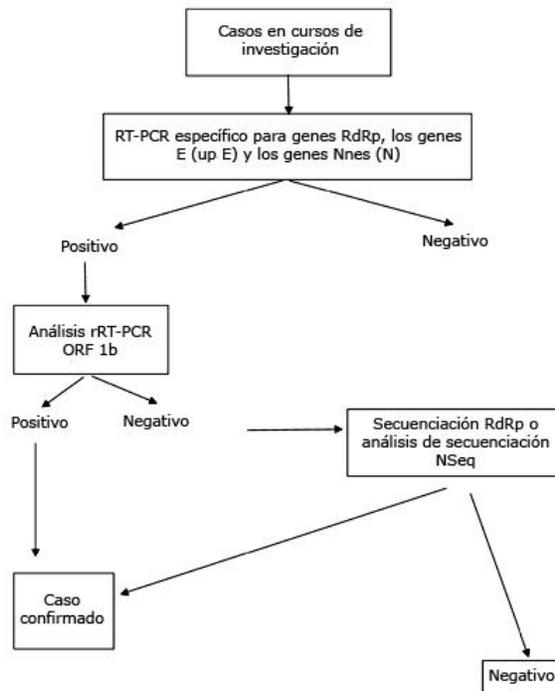
Para esta revisión narrativa se hizo búsquedas de literatura publicadas en julio y noviembre de 2021. La evaluación incluyó artículos en las bibliotecas del *Academic Search Complete* del gestor de búsquedas Medline, Science Direct, Scopus, Redalyc. Se recurrió, además, a las bases de datos bibliográficos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización Panamericana de la Salud y SciELO. Para la búsqueda se utilizaron los siguientes descriptores: “COVID-19”, “pruebas moleculares”, “reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real” y “secuenciación” para idioma español. Para el idioma inglés, se emplearon "COVID-19", "molecular testing", "real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction" and "sequencing". Las publicaciones encontradas se sometieron a un proceso de evaluación; se revisaron los resúmenes, resultados y conclusiones de los estudios. Para la selección se clasificaron en pertinentes o no pertinentes, de acuerdo con su ajuste al tema, cumpliendo con la característica de que describieran las pruebas moleculares para la detección de SARS-CoV-2; haber sido publicados entre 2011-2021; ser artículos de revisión, originales, presentaciones de casos y tesis. Se encontró un total de 78 trabajos, se seleccionaron 35; 33 artículos originales y 2 comunicados de prensa. El objetivo de la presente revisión es describir las pruebas moleculares para la detección de SARS-CoV-2.



## DESARROLLO

Mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) se ha observado que los infectados presentan en su mayoría una alta carga viral (entre  $10^4$  y  $10^8$  copias de genoma/ mL, por muestra nasofaríngea o de saliva). En pacientes que tienen un curso leve de infección, el pico de la carga viral en muestras nasales y orofaríngeas ocurre durante los primeros 5-6 días tras el inicio de síntomas y desaparece al día 10. Si bien en algunos pacientes se detecta el virus más allá del día 10, la carga viral es del orden de 100-1 000 veces menor, lo cual sugeriría una baja capacidad de transmisión en esos días.<sup>(8,9,10)</sup>

La confirmación habitual de los casos de infección por SARS-CoV-2, se basa en la detección de secuencias de ARN virales únicas mediante la RT-PCR en tiempo real (rRT-PCR), con confirmación por secuenciación de ácido nucleico, cuando sea necesario (Fig. 1).



Fuente: elaboración propia inspirado en Cuadra y otros.<sup>(11)</sup>

**Fig. 1** – Algoritmo de pruebas para casos en curso de investigación para SARS-CoV-2 por la rRT-PCR.



La OMS puede ayudar a sus estados miembros a determinar qué laboratorios son adecuados para proporcionar este servicio, en este caso, deben realizar estas pruebas. Se han diseñado 3 tipos de ensayos de rRT-PCR para la detección de SARS-CoV-2 y se han publicado en detalle. Las pruebas actualmente descritas son específicas para genes *Polymerase Dependent RNA* (RdRp, por sus siglas en inglés), genes E (upE) y genes Nnes (N). Los CDC, de los EE.UU. han desarrollado ensayos de rRT-PCR, dirigidos a la proteína N de la nucleocápside que contiene material genético del SARS-CoV-2, que puede complementar los ensayos upE y gen de la proteína 1b (ORF 1b, por sus siglas en inglés) para detección y confirmación.<sup>(12)</sup>

Cuatro coronavirus humanos (hCoV, por sus siglas en inglés) son causas conocidas de infecciones del tracto respiratorio, cuya gravedad puede ser de leve a grave. Estos son los betacoronavirus hCoV-OC43 y hCoV-HKU1 y los alfa coronavirus hCoV-229E y hCoV-NL63. Los ensayos comerciales de PCR *multiplex* para patógenos respiratorios pueden detectar estos virus. Es importante que los resultados positivos de estos virus no se confundan con MERS-CoV.<sup>(13)</sup> Un caso con un resultado positivo de PCR, para un solo fragmento específico sin más pruebas, pero con un historial de posible exposición y signos clínicos consistentes, se considera un caso probable.

Las sensibilidades y las especificidades de la prueba RT-PCR y de otras pruebas moleculares que han sido aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) para uso de diagnóstico, son altas. Sin embargo, incluso con RT-PCR, puede haber resultados falsos negativos debido a recolecciones de muestras indebidas o poco cuidadosas o de una mala manipulación de la muestra luego de la recolección y antes de la prueba. También puede haber un resultado negativo en la prueba de una muestra recolectada cuando el paciente ya no tiene un virus detectable de la influenza. Puede haber resultados falsos positivos, aunque se dan rara vez (por ejemplo, debido a la contaminación del laboratorio u otros factores).<sup>(14)</sup>

El ensayo de rRT-PCR 1b proporciona la misma sensibilidad que el ensayo upE de primera línea y debe proporcionar resultados consistentes para pacientes positivos. El ensayo ORF1b junto con el ensayo upE también puede servir como una prueba confirmatoria. Sin embargo, los pacientes pueden ser vistos en momentos en que se excretan pequeñas cantidades de virus, muy temprano o muy tarde después del inicio de los síntomas. Además, las muestras pueden diluirse debido a procesos clínicos como el lavado, como



se ejemplifica en el caso investigado aquí. En tales casos, las pruebas confirmatorias deben tener la misma sensibilidad que la prueba de primera línea.<sup>(15)</sup>

Aunque los productos de rRT-PCR pueden secuenciarse, la escasez de sus fragmentos hace que la preparación de ADN sea ineficiente y limita la longitud de la información útil de la secuencia. El ensayo RdRpSeq proporciona resultados de secuenciación que se pueden comparar con una gran base de datos de secuencias relacionadas, porque se usa comúnmente para escribir coronavirus. El amplicón según *Herzog* y otros,<sup>(16)</sup> se superpone para la detección de pancoronavirus, asegura buena comparabilidad entre los resultados de laboratorio de diferentes grupos.

Los cebadores de ensayo RdRpSeq están altamente conservados y reaccionan de forma cruzada con otros betacoronavirus, incluidos hCoV-OC43 o -HKU1. Críticamente, este amplicón no debe usarse para detección si no está conectado con el análisis de secuencia posterior, son posibles resultados falsos positivos en pacientes infectados con otros coronavirus humanos. En contraste, el ensayo NSeq proporciona una detección altamente sensible y específica para hCoV-EMC, lo que permite la confirmación basada en la secuencia incluso en casos que presentan una concentración de virus muy baja. El ensayo NSeq podría usarse como una herramienta para la clasificación provisional de cepas en el futuro.<sup>(17)</sup>

Los candidatos a las vacunas en investigación: virus completo inactivado, virus atenuado, vector viral, vacuna de ADN, subunidades y partículas. En general, se basan en la proteína S de la columna vertebral viral, pero también en otras como la del nucleocápside (N), la envoltura (E) e incluso proteínas no estructurales (NSP16).<sup>(18)</sup>

El examen molecular que se está empleando en todo el mundo para la detección directa de la infección con el SARS-CoV-2, es la prueba de RT-PCR sobre los genes expresados por este virus. *Liu* y otros,<sup>(19)</sup> analizaron, por medio de RT-PCR, la expresión génica de los fragmentos del SARS-CoV-2 a partir de muestras de esputo, lavado broncoalveolar e hisopado del tracto respiratorio provenientes de 4 880 pacientes con síntomas de infección respiratoria o contacto cercano con el virus en el hospital de Wuhan. Se realizó la secuenciación del fragmento génico ORF1ab y de un fragmento de la proteína de la nucleocápside (NP). Para un diagnóstico confirmatorio, los autores consideraron como pacientes SARS-CoV positivos a los que presentaron ambos fragmentos génicos. Para el esputo, el fragmento NP fue



expresado en el 49,12 % de pacientes mientras que el fragmento ORF1ab en el 50,88 %, y el porcentaje de pacientes que expresaron ambos fragmentos fue del 49,12 %. En el lavado broncoalveolar b, el fragmento NP fue expresado en el 80 % de pacientes, mientras que el fragmento ORF1ab en el 100 % y el porcentaje de pacientes que expresaron ambos fragmentos fue del 80 %.

En el caso del hisopado del tracto respiratorio, el fragmento NP fue expresado en el 39,8 % de pacientes, mientras que el fragmento ORF1ab en el 40,98 %, y el 38,42 % de los pacientes expresaron ambos fragmentos. De estos resultados, encontraron que los pacientes más expuestos son los adultos mayores de 70 años con el 61,81 % de incidencia. Por otro lado, un grupo de pacientes tuvieron alguna sintomatología asociada al coronavirus, pero fueron descartados porque su resultado salió negativo, lo que mostró la eficacia de esta técnica en la identificación del SARS-CoV-2.<sup>(19)</sup>

*Corman* y otros<sup>(20)</sup> propusieron una prueba diagnóstica que discrimina 2019-nCoV, mediante la secuenciación de 297 muestras clínicas que contienen todo el espectro de virus respiratorios humanos. Para esto se diseñaron cebadores para la secuenciación génica de los siguientes fragmentos: 1) ORF1ab-gen RdRp en la posición 15361-15460 nts; 2) gen de la proteína E, posición 26141-26253 nts, y 3) gen de la proteína N posición 28555-28682 nts. Los cebadores fueron diseñados con base en la secuenciación de la primera muestra obtenida en la provincia de Wuhan en diciembre de 2019 (NM908947 Wuhan-Hu-1) y de otras muestras virales (NC-004718 SARS-CoV). Se demostró que estos cebadores diseñados se acoplan a varias especies SARS-CoV, lo que indica que todas las muestras SARS son betacoronavirus. Por otro lado, decidieron alinear las secuencias génicas de todas las muestras analizadas:

- 1) las muestras de la ciudad de Wuhan nombrada como BetaCoV/Wuhan/PBCAMS-WH01/2019/EPI\_ISL\_402123;
  - 2) Bat SARS CoV (murciélago) nombrado para el ensayo como bat-SL-CoVZC45 (número de acceso GenBank MG772933); y
  - 3) el miembro más distante dentro del CoV de murciélago relacionado con el SARS detectado en Bulgaria, el Bat coronavirus BM48-31/ BGR/2008 (número de acceso de GenBank NC\_014470).
- No se encontraron diferencias en la secuencia nucleotídica para la proteína E, pero sí en los genes



RdRp y N, lo que muestra que existen diferencias en la secuencia nucleotídica en los virus SARS, lo que sirve como una prueba de diferenciación de una especie viral frente a otra.<sup>(20)</sup>

Se diseñaron cebadores de los fragmentos localizados en ORF1ab (gen de la proteína 1A posición 11197-11280 nts, gen RdRpSeq posición 15049-15290 nts, ORF1b posición 18266-18347 nts), del gen de la proteína E (upE posición 27458-27550 nts) y, finalmente, del fragmento NSeq posición 29549 a 29860 nts; para determinar diferencias entre las distintas cepas de coronavirus humano (hCoV- EMC). La secuenciación mostró homología en todos los genes, excepto en las secuencias RdRpSeq y Nseq; se observan diferentes polimorfismos (inserción/ deleción) a lo largo del gen, indica que solo el análisis de estos genes (RdRpSeq y Nseq) es suficiente para diferenciar diversas cepas de coronavirus. En consecuencia, es necesario estandarizar protocolos en el diseño de cebadores que detecten diferencias entre las secuencias con el fin de diferenciar un coronavirus de otro.<sup>(21)</sup>

Según la OMS<sup>(22)</sup> en el caso del SARS-CoV-2, la detección del gen de la proteína E, se emplea como primera prueba confirmatoria, seguida de la expresión del gen RdRp. La expresión del gen N solo se usa si se requiriese un ensayo confirmatorio adicional. Para los CDC, la primera prueba confirmatoria sería la expresión y secuenciación del gen N diseñado para la detección universal de los coronavirus SARS y del SARS-CoV-2.

Los diagnósticos muchas veces no son certeros y no es a causa del protocolo de ensayo o por el personal técnico, sino porque dependen de la carga viral del paciente que ha recibido o no tratamiento. Ai y otros<sup>(23)</sup> realizaron repetidas pruebas en tomografías computarizadas seguidas de RT-PCR a 1 014 pacientes con la COVID-19 en Wuhan, China. En estas pruebas, se analizó la conversión dinámica de los resultados de RT-PCR (negativo a positivo, positivo a negativo, respectivamente) así como las tomografías computarizadas (TC) del tórax de cada paciente. En un primer momento, el 59 % tuvo resultados positivos de RT-PCR y 88 % tuvo TC de tórax positiva, este último con una sensibilidad del 97 %. De los 415 pacientes negativos de RT-PCR, el 75 % fueron positivos en la TC de tórax y considerados como pacientes que iban a desarrollar la enfermedad. Por otro lado, mediante los ensayos seriales de RT-PCR y TC, se observó que el intervalo de tiempo medio entre los resultados iniciales negativos de RT-PCR fue de  $5,1 \pm 1,5$  días; mientras que el resultado inicial positivo a posterior negativo de RT-PCR fue de



6,9 ± 2,3 días. Además, si los pacientes mostraron mejoría en las TC de tórax, los resultados de RT-PCR se volverían negativos. Lo anterior reafirma que los ensayos de RT-PCR deben ser acompañados de una TC, durante la hospitalización resultados negativos se convirtieron en positivos, y estos en negativos según el tratamiento de los pacientes.<sup>(23)</sup> El RT-PCR puede producir resultados falsos negativos en la etapa inicial de la infección, se sugiere que los pacientes negativos a RT-PCR, con evidencias imagenológicas de alteraciones pulmonares, deben ser aislados y repetir el ensayo molecular.<sup>(24)</sup>

La sensibilidad analítica de la RT-PCR se ve influida por la baja carga viral en pacientes asintomáticos o sintomáticos, lo que ocurre, en dos momentos:

- 1) la fase inicial de la infección, cuando el paciente todavía es asintomático o sintomático, y
- 2) cuando la infección por SARS-CoV-2 es controlada por el sistema inmune, y los síntomas se alivian, con la consecuente eliminación de virus aún persistentes.

*Shen* y otros<sup>(25)</sup> realizaron la secuenciación del transcriptoma del lavado broncoalveolar de pacientes con SARS-CoV-2. Este análisis mostró variantes intrahospitalarias en los pacientes infectados con SARS-CoV-2. La distribución de las variantes génicas es similar en las poblaciones infectadas. Sin embargo, se observaron 4 variantes virales intraindividuales en forma de polimorfismo.<sup>(25)</sup>

Hasta el momento, no se ha confirmado si la transmisión de persona a persona induce a la variación en las secuencias genéticas del SARS-CoV-2, pero tampoco hay evidencias que la nieguen. Si ocurriera, la evolución in vivo después de la infección, puede afectar su virulencia, infectividad y transmisibilidad, por lo que es necesario fortalecer la vigilancia epidemiológica.<sup>(23)</sup>

De un conjunto de más de 30 productos en estudio, hasta ahora, 3 candidatos para vacunas contra MERS-CoV han alcanzado las fases 1 y 2; 1 vacuna de ADN y 2 vacunas basadas en vectores virales:

GLS -5300: vacuna basada en un plásmido de ADN que expresa la proteína S del SARS-CoV (fase 1), (NCT02670187), completado y con resultados publicados.<sup>(19,20)</sup> GLS-5300. Otro estudio aún en curso (fase 1-2, NCT03721718). ChAdOx1-MERS: vacuna basada en un vector de adenovirus de chimpancé (fase 1, NCT03399578).<sup>(26)</sup> MVA-MERS-S. Vacuna basada en un vector MVA



(virus vaccinia modificado de Ankara) (fase 1, NCT03615911), completada, aún sin resultados publicados.

Las medidas propuestas se basan en las recomendaciones de la OMS y el Comité de Seguridad de la Salud y el Sistema de Alerta Rápida y Respuesta Rápida de la Unión Europea y el Procedimiento para tratar casos de infección con el nuevo coronavirus con respecto al riesgo de transmisión del virus.<sup>(27)</sup>

## **Medicamentos existentes con posibles aplicaciones terapéuticas para la COVID-19**

Se propone el baricitinib por su efecto antiinflamatorio y su posible capacidad para reducir la entrada viral.<sup>(28)</sup> El arbidol o la ribavirina es un inhibidor que puede interrumpir la unión de la proteína de la envoltura viral a las células huésped y prevenir la entrada viral en la célula objetivo.<sup>(29)</sup> Remdesivir, desarrollado por *Gilead Sciences Inc.*, se probó en humanos con la enfermedad por el virus Ébola y ha demostrado ser prometedor en modelos animales para MERS y SARS. Es un análogo de nucleótido que puede bloquear la síntesis y el nucleótido viral para detener la replicación viral, conservan la actividad antiviral contra Delta, Omicron y otras variantes emergentes del SARS-CoV-2, el fármaco se está estudiando en ensayos clínicos de fase III en China y EE. UU.<sup>(30)</sup> La Paxlovid de Pfizer (pastillas de nirmatrelvir y ritonavires) es un antiviral y actúa inhibiendo la proteasa 3C (3CLPRO), también conocida como MPRO. Esta es la principal enzima que participa en la maduración proteolítica del coronavirus, mediando en la escisión de las poliproteínas PP1a y PP1ab.<sup>(31)</sup>

BioNTech es la última compañía en anunciar planes para desarrollar una vacuna de ARN mensajero (ARNm) para la COVID-19, la enfermedad causada por el nuevo coronavirus SARS-CoV-2. La firma alemana espera que los ensayos clínicos comiencen a fines de abril de 2022. Otras dos compañías, Moderna y CureVac, anunciaron trabajos sobre vacunas de ARNm para la COVID-19. Los Institutos Nacionales de Salud de EE.UU., comenzaron un ensayo clínico para evaluar la seguridad de la vacuna Moderna el 16 de marzo. Las vacunas mRNA contiene instrucciones para producir proteínas de coronavirus en células humanas. En teoría, eso debería proporcionar inmunidad al virus real. El programa BioNTech tiene dos partes. Fosun Pharma, con sede en Shanghai, firmó un acuerdo para probar la vacuna de la firma en China. Fosun también acordó invertir \$ 50 millones en BioNTech, lo que podría generar



hasta \$ 85 millones en pagos adicionales. A cambio, Fosun obtiene los derechos para comercializar la vacuna en China.<sup>(32)</sup>

### **Tipos de vacunas antivirales**

Las vacunas antivirales; por lo general se dividen en: virus inactivados o atenuados vivos, partículas similares a virus (VLP), vectores virales, vacunas basadas en proteínas, basadas en ADN y basadas en ARNm. Se informó que las vacunas de la subunidad de la proteína viral V producían títulos de anticuerpos neutralizantes más altos y una protección más completa que el SARS-CoV-2 vivo atenuado, las proteínas S de longitud completa y las vacunas de proteína S basadas en ADN.

Como se esperaba, la mitad de las patentes se centraron en las vacunas proteicas que comprenden la vacuna de la subunidad de la proteína S y las vacunas dirigidas al dominio de unión al receptor de la subunidad S1 del virus de la proteína S (RBD). En conjunto, la proteína S/ gen es el sitio objetivo preferido en el desarrollo de la vacuna SARS/ MERS, y la misma estrategia puede ser útil en el desarrollo de vacunas contra SARS-CoV-2. La solicitud de patente WO2015081155 describe inmunógenos, que comprenden proteínas consenso derivadas de la proteína espiga MERS-CoV, para usar en vacunas basadas en ADN dirigido a MERS-CoV. El pico de proteína de consenso indujo respuestas inmunes tanto humorales como celulares, incluyendo títulos aumentados de IgG y anticuerpos neutralizantes. La respuesta inmune celular inducida implicó un aumento en las respuestas de células T CD3 + CD4 + y CD3 + CD8 + que produjeron IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, o ambos IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . El 3 de marzo de 2020, Inovio Pharmaceutical, Inc. anunció que había diseñado la vacuna de ADN llamada INO-4800 para ser planificada para ensayos en humanos en los EE.UU.<sup>(32,33)</sup>

### **Vacunas basadas en ARNm**

Las ventajas potenciales de un enfoque de ARNm para las vacunas profilácticas incluyen la capacidad de imitar la infección natural para estimular una respuesta inmune más potente, así como la capacidad de combinar múltiples ARNm en una sola vacuna. La solicitud de patente Moderna WO2017070626 describe vacunas de ARNm compuestas de ARNm que codifica proteínas antigénicas virales completas S, S1 o S2 de virus SARS-CoV-2 y MERS-CoV, formuladas en nanopartículas de lípidos catiónicos. Muestran que los ratones vacunados con el ARNm codificador de la proteína S de coronavirus de longitud completa generaron títulos de anticuerpos neutralizantes mucho más altos en comparación con la



subunidad S2 que codifica la proteína S. Conejos blancos de Nueva Zelanda inmunizados con la vacuna. El ARNm de SARS-CoV que codifica la proteína S de longitud completa redujo más del 90 de la carga viral en los pulmones de conejo e indujo una cantidad significativa de anticuerpo neutralizante contra SARS-CoV.

Moderna anunció el 24 de febrero de 2020, lanzó el primer lote de ARNm-1273 contra el SARS-CoV-2 para uso en humanos. Moderna informa que el ARNm-1273 es una vacuna de ARNm dirigida a una forma de proteína de prefusión de estabilización S asociada con el SARS-CoV-2, que fue seleccionada por Moderna en colaboración con investigadores del Centro de Investigación de Vacunas del NIAID. La fabricación de este lote fue financiada por la Coalición para la Preparación de Epidemias e Innovaciones. La solicitud de patente WO2018115527 describe vacunas que comprenden *ARNm* que codifica al menos un antígeno de un coronavirus *MERS*, una proteína S o un fragmento de proteína S (S1), una proteína de envoltura (E), una proteína de membrana (M) o una proteína de nucleocápside (N), todos los cuales fueron efectivos para inducir una respuesta inmune específica de antígeno. Se demostró que la administración intradérmica en ratones de una mezcla de ARNm encapsulado en nanopartículas lipídicas (LNP) que codifica proteínas SARS-CoV S da como resultado la traducción in vivo e inducción de respuestas inmunes humorales.<sup>(34)</sup>

Los nanosistemas de alto rendimiento contribuyen a las vacunas al actuar como adyuvantes o portadores, así como barreras efectivas. Las vacunas apoyadas por nanosistemas protegen los antígenos contra la degradación prematura, pueden atravesar las membranas celulares, permitir la liberación sostenida, mejorar la estabilidad y fomentar la administración dirigida de inmunógenos. La BNT162b, una de las vacunas efectivas contra el COVID-19, BioNTech y Pfizer, contiene nanoformulación basada en lípidos. Como resultado, se mantiene la conformación de prefusión de la proteína S y el dominio de unión al receptor, lo que permite la neutralización efectiva de las células inmunes.<sup>(35)</sup>

En conclusión, el ensayo de rRT-PCR proporciona alta sensibilidad y especificidad. El ensayo ORF 1b junto con el ensayo upE son pruebas confirmatorias. Las dianas que se emplean para la detección específica del genoma del SARS-CoV-2 por rRT-PCR se encuentran en las regiones ORF1a y 1b, RdRp, N, S y E del ARN viral.



Los CDC de los EE.UU. han desarrollado RT-PCR dirigidos a la proteína N de la nucleocápside del material genético SARS-CoV-2, que puede complementar los ensayos upE y gen de la proteína 1b (ORF 1b) para detección y confirmación. Los candidatos a las vacunas en investigación se agrupan en seis grandes grupos; virus completo inactivado, virus atenuado, vector viral, vacuna de ADN, subunidades y partículas. En general, se basan en la proteína S de la columna vertebral viral, pero también en otras como la del nucleocápside (N), la envoltura (E) e incluso proteínas no estructurales (NSP16).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. de Groot RJ, Baker SC, Baric RS, Enjuanes L, Gorbalenya AE, Holmes KV, et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. *J Virol.* 2013; 87(14): 7790-2. DOI:10.1128/JVI.01244-13
2. Gloza-Rausch F, Ipsen A, Seebens A, Götsche M, Panning M, Drexler JF, et al. Detection and prevalence patterns of group I coronaviruses in bats, northern Germany. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14(4): 626-31. DOI: 10.3201/eid1404.071439
3. Hamre D, Procknow JJ. A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1966; 121(1): 190-3. DOI: 10.3181/00379727-121-30734
4. Drosten C, Günther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med.* 2003; 348(20): 1967-76. DOI: 10.1056/NEJMoa030747
5. Fouchier RA, Hartwig NG, Bestebroer TM, Niemeyer B, de Jong JC, Simon JH, et al. A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101(16): 6212-6. DOI: 10.1073/pnas.0400762101
6. Woo PC, Lau SK, Chu CM, Chan KH, Tsoi HW, Huang Y. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol.* 2005; 79(2): 884-95. DOI: 10.1128/JVI.79.2.884-895.2005



7. Zlateva KT, Coenjaerts FE, Crusio KM, Lammens C, Leus F, Viveen M. No novel coronaviruses identified in a large collection of human nasopharyngeal specimens using family-wide CODEHOP-based primers. *Archives of Virology*. 2013; 158(1):251-5. DOI: 10.1007/s00705-012-1487-4
8. Lan L, Dan X, Guangming Y. Positive RT-PCR Test Results in Patients Recovered From COVID-19. *JAMA*. 2020; 323(15): 1502- 03. DOI:10.1001/jama.2020.2783
9. Peng W, Xinxin H, Eric H Y, Jessica Y, Kathy S, Joseph T, et al. Real-time tentative assessment of the epidemiological characteristics of novel coronavirus infections in Wuhan, China. *Euro Surveill Bull*. 2020; 25(3): pii=2000044. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000044
10. Paules CI, Marston HD, Fauci AS. Coronavirus Infections-More Than Just the Common Cold. *JAMA*. 2020; 323(8):707- 8. DOI:10.1001/jama.2020.0757
11. Cuadra TE, Guadrón Meléndez AA, Cruz Aguilar R de J, Vásquez Rodríguez EA. Factores relevantes sobre el ensayo RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2, virus causante del COVID-19. *Alerta*. 2021; 4(1): 31-9. DOI: 10.5377/alerta.v4i1.10060
12. Palm D, Pereyaslov D, Vaz J, Broberg E, Zeller H, Gross D, et al. Laboratory capability for molecular detection and confirmation of novel coronavirus in Europe, November 2012. *Euro Surveill*. 2012; 17(49): 20335. DOI: 10.2807/ese.17.49.20335-eeen
13. Van Boheemen S, de Graaf M, Lauber C, Bestebroer TM, Raj VS, Zaki AM, et al. Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. *mBio*. 2012; 3(6): e00473-12. DOI: 10.1128/mBio.00473-12
14. Timothy M, Bernstein H, Bradley J, Englund J, File T, Gravenstein S, et al. Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America: 2018 Update on Diagnosis, Treatment, Chemoprophylaxis, and Institutional Outbreak Management of Seasonal Influenza. *Clinical Infectious Diseases*. 2019; 68 (6): 1-47. DOI: 10.1093/cid/ciy866
15. Corman VM, Eckerle I, Bleicker T, Zaki A, Landt O, Eschbach-Bludau M. Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Euro Surveill*. 2012; 17(39): 20285. DOI: <https://DOI.org/10.2807/ese.17.39.20285-en>
16. Herzog P, Drosten C, Müller M. Plaque assay for human coronavirus NL63 using human colon carcinoma cells. *Viol J*. 2008; 5(1):138-142. DOI: <https://DOI.org/10.1186/1743-422X-5-138>



17. Rabenau HF, Cinatl J, Morgenstern B, Bauer G, Preiser W, Doerr HW. Stability and inactivation of SARS coronavirus. *Med Microbiol Immunol.* 2005; 194(1-2):1-6. DOI: 10.1007/s00430-004-0219-0
18. Yong CY, Ong HK, Yeap SK, Ho KL, Tan WS. Recent Advances in the Vaccine Development Against Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus. *Front. Microbiol.* 2019; 10:1781. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01781
19. Liu R, Han H, Liu F, Lv Z, Wu K, Liu Y, et al. Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020. *Clin Chim Acta.* 2020; 505: 172-5. DOI: 10.1016/j.cca.2020.03.009
20. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu D, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 2020; 25(3): 2000045. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045
21. Corman VM, Müller MA, Costabel U, Timm J, Binger T, Meyer B, et al. Assays for laboratory confirmation of Novel human Coronavirus (hCoV-EMC) Infections. *Euro Surveill.* 2012; 17(49): 20334. DOI: 10.2807/ese.17.49.20334-en
22. Lippi G, Simundic AM, Plebani M. Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Clin Chem Lab Med.* 2020; 58(7):1070-1076. DOI: 10.1515/cclm-2020-0285
23. Ai T, Yang Z, Hou H, Zhan C, Chen C, Lv W, et al. Correlation of chest CT and RT-PCR testing in coronavirus disease 2019 (COVID19) in China: a report of 1014 cases. *Radiology.* 2020; 96(2): 32-40. DOI: 10.1148/radiol.2020200642
24. Long C, Xu H, Shen Q, Zhang X, Fan B, Wang C, et al. Diagnosis of the coronavirus disease (COVID-19): rRT-PCR or CT? *Eur J Radiol.* 2020; 126: 108961. DOI: 10.1016/j.ejrad.2020.108961
25. Shen Z, Xiao Y, Kang L, Ma W, Shi L, Zhang L, et al. Genomic diversity of SARS-CoV-2 in coronavirus disease 2019 patients. *Clin Infect Dis.* 2020; 71(15): 713-720. DOI: 10.1093/cid/ciaa203
26. Folegatti PM, Bittaye M, Flaxman A, Lopez FR, Bellamy D, Kupke A, et al. Safety and immunogenicity of a candidate Middle East respiratory syndrome coronavirus viral-vectored vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, uncontrolled, phase 1 trial. *Lancet Infect Dis.* 2020; 20(7): 816-26. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30160-2



27. Pan American Health Organization / World Health Organization. Epidemiological Update: Novel Coronavirus (2019 nCoV) 20 January 2020. Washington, D.C.: PAHO/WHO; 2020. [acceso: 03/03/2020]. Disponible en: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51851>
28. Richardson P, Griffin I, Tucker C, Smith D, Oechsle O, Phelan A, et al. Baricitinib as potential treatment for 2019-nCoV acute respiratory disease. *Lancet*. 2020; 395(10223): e30-e31. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30304-4
29. Li Y, Xie Z, Lin W, Cai W, Wen C, Guan Y, et al. Efficacy and Safety of Lopinavir/ Ritonavir or Arbidol in Adult Patients with Mild/Moderate COVID-19: An Exploratory Randomized Controlled Trial. *Med (NY)*. 2020; 1(1): 105-113.e4. DOI: 10.1016/j.medj.2020.04.001
30. Pitts J, Li J, Perry J, Du Pont V, Riola N, Rodriguez L, et al. Remdesivir and GS-441524 retain antiviral activity against Delta, Omicron, and other emergent SARS-CoV-2 variants. *BioRxiv*. 2022;1(1): 1-46. DOI: 10.1101/2022.02.09.479840
31. Ionescu MI. An Overview of the Crystallized Structures of the SARS-CoV-2. *Protein J*. 2020; 39(6): 600-18. DOI: 10.1007/s10930-020-09933-w
32. Lisa M. IL-6 blockers tested against COVID-19. *C&EN*. 2020; 98(11):13–20. DOI: 10.1021/cen-09811-buscon3
33. Cision PR Newswire. Inovio Accelerates Timeline for COVID-19 DNA Vaccine INO-4800. Pensilvania: Inovio Pharmaceuticals; 2020. [acceso: 03/03/2020]. Disponible en: <https://www.prnewswire.com/news-releases/inovio-accelerates-timeline-for-covid-19-dna-vaccine-ino-4800-301015031.html>
34. Hussey C. Moderna ships mRNA vaccine against novel coronavirus (mRNA-1273) for phase 1 study. Cambridge, Mass: Business Wire; 2020. [acceso: 24/02/2020]. Disponible en: <https://www.bloomberg.com/press-releases/2020-02-24/moderna-ships-mrna-vaccine-against-novel-coronavirus-mrna-1273-for-phase-1-study>
35. Campos E, Pereira A, Oliveira J, Carvalho L, Guilger-Casagrande M, De Lima R, et al. How can nanotechnology help to combat COVID-19? Opportunities and urgent need. *J Nanobiotechnol*. 2020; 18(1).1-23. DOI: 10.1186/s12951-020-00685-4



### **Conflictos de interés**

El autor declara que no existen conflictos de interés. El estudio fue financiado por el autor.