

Jordi Reina
Loreto Suarez

Evaluación de diferentes genes en la detección por RT-PCR del SARS-CoV-2 en muestras respiratorias y su evolución en la infección

Unidad de Virología, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Son Espases, Palma de Mallorca.

Article history

Received: 12 May 2020; Revision Requested: 17 May 2020; Revision Received: 20 May 2020; Accepted: 21 May 2020; Published: 27 May 2020

Sr. Editor: La actual pandemia de infección respiratoria causada por el SARS-CoV-2 determina la necesidad de implementar diferentes estrategias diagnósticas. Desde que se secuenció el genoma del nuevo coronavirus causante se dispone de diferentes dianas genéticas para el desarrollo de sistemas de amplificación genómica. La RT-PCR se ha constituido como la técnica de referencia y puede encontrarse en diferentes formatos comerciales. En general la mayoría de ellas utilizan alguno de los tres genes siguientes: el gen E de la envoltura (propio del género Sarbecovirus) y los genes RpRd de la ARN-polimerasa ARN-dirigida y N del nucleocápside. La sensibilidad y capacidad de detección del SARS-CoV-2 varía dependiendo del gen amplificado [1-3].

La utilización de sistemas de amplificación comercial permite la incorporación rápida de las mismas al laboratorio y el procesado de gran cantidad de muestras de una forma automatizada. Por ello se presenta un estudio prospectivo que evalúa la capacidad de amplificación de los tres genes del SARS-CoV-2 (E, RpRd y N) en el diagnóstico de infección por este virus. Para la detección de los mismos se ha utilizado una RT-PCR en tiempo real comercial (Allplex 2019-nCoV Assay; Seegen, Corea del Sur) siguiendo las instrucciones de manejo y lectura del fabricante.

Las muestras (exudados nasofaríngeos) fueron remitidas en un medio de transporte para virus (MTV, Vircell, Granada). Sólo se han seleccionado aquellas que fueron positivas como mínimo a uno de los tres genes mencionados. Las muestras positivas se han dividido en dos grupos de 200 cada uno de ellas. Las primeras muestras corresponden a las tomadas al principio de la pandemia y se consideran representativas de la primoinfección. Las otras 200 segundas muestras corresponden al úl-

timo período de la infección y representan mayoritariamente a pacientes con infección en vías de resolución.

Como se observa en la tabla 1, en las primeras muestras el 84% de todas ellas fueron positivas de forma simultánea a los tres genes estudiados. Por su parte el gen E presentó un porcentaje de amplificación del 94%, el gen RpRd del 96,5% y el gen N del 86,5%. En 5 (2,5%) muestras sólo se amplificó el gen E, en 7 (3,5%) sólo el gen RpRd y en 2 (1%) el gen N. En las segundas muestras el gen se detectó en el 54,5% ($p<0,05$), el gen RpRd en el 60% ($p<0,05$) y el gen N en el 88,5%. En 10 (2,5%) de estas muestras sólo se detectó el gen E, en 11 (5,5%) sólo el gen RpRd y en 57 (28,5%) ($p>0,05$) en gen N.

En este trabajo se confirma que la detección del SARS-CoV-2 en la primoinfección mediante la amplificación del gen N presenta el porcentaje mas bajo (86,5%) coincidiendo con el estudio de Corman et al. [2] que no cuantifica su sensibilidad por ser excesivamente baja. Por el contrario el gen E y gen RpRd presentan una sensibilidad de detección de unos 10 genomas-copias/reacción, siendo los mas sensibles [4]. En nuestro estudio el 96,5% de las primeras muestras positivas presentaron positividad en este gen y el 94% con el gen E, a pesar que su capacidad de detección es de unas 100 genomas-copias/reacción. De acuerdo con el estudio comparativo de van Kasteren et al. [4] la elevada sensibilidad del kit utilizado en este estudio (Seegen) sería uno de los recomendables para su empleo en situaciones de baja carga viral como personal sanitario y personas asintomáticas.

Sin embargo, al analizar las segundas muestras se observa como la detección del gen E ha mostrado una disminución significativa, a pesar de que todavía el 42% de todos los pacientes seguían siendo positivos a los tres genes, frente al 84% de la primoinfección. Por ello podría afirmarse que para el primer diagnóstico de infección por SARS-CoV-2 debería utilizarse de forma preferentemente el gen E o el gen RpRd. Este mismo dato lo confirma el estudio comparativo de Nalla et al. [5] al observar que gen E permite detectar la presencia de hasta 6,3

Correspondencia:
Jordi Reina
Unidad de Virología, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Son Espases, Facultad de Medicina (UIB). Carretera Valldemossa 79, 07120 Palma de Mallorca.
E-mail: jorge.reina@ssib.es

Tabla 1		Positividad en cada uno de los genes amplificados en las muestras respiratorias estudiadas.					
Primeras muestras				Segundas muestras			
Gen E	Gen RpRd	Gen N	No (%) ^a	Gen E	Gen RpRd	Gen N	No (%) ^a
+	+	+	168 (84)	+	+	+	84 (42)
+	+	-	15 (7,5)	+	+	-	2 (1)
-	+	-	7 (3,5)	-	+	-	11 (5,5)
+	-	-	5 (2,5)	+	-	-	10 (5)
-	+	+	3 (1,5)	-	+	+	23 (11,5)
-	-	+	2 (1)	-	-	+	57 (28,5)
+	-	+	0	+	-	+	13 (6,5)
188	193	173	200	109	120	177	200
(94)	(96,5)	(86,5)		(54,5)	(60)	(88,5)	

^aNo= número de muestras (porcentaje)

copias/reacción en el 85% de las muestras frente al 65% del gen N, recomendado por el CDC [6]. Por su parte Chan et al. [7] al analizar la sensibilidad del gen RpRd comprueban que la sensibilidad de detección del gen RpRd es de cerca de 11 copias de ARN/reacción.

Debido a la capacidad de detección de nuestra RT-PCR es de 100 copias/reacción, en las muestras procedentes del final de la infección, la detección del gen E sólo se ha producido en el 54,5%. Creemos que en la cinética replicativa del SARS-CoV-2 se produce una desaparición progresiva de los diferentes genes debido a la destrucción del virus. De este modo se podría explicar el incremento significativo en la detección del gen N (88,5%) como restos genéticos de virus probablemente no viables. Además, en la mayoría de casos el valor Ct de estas muestras positivas sólo en el gen N era >39. La no detección del gen de la ARN-polimerasa (RpRd) en estos casos podría interpretarse como la pérdida de la capacidad replicativa del virus y por ello de su contagiosidad o infectividad. El seguimiento de la cinética de los diferentes genes del SARS-CoV-2 podría ser útil en el estudio de la evolución clínica de los pacientes.

FINANCIACIÓN

Los autores declaran no haber recibido financiación para la realización de este estudio.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores no presentan ningún conflicto de intereses

BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Interim guidance. 17 January 2020. WHO/2019-nCoV/laboratory/2020.3.
2. Corman VM, Landt O, Kalsner M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DC et. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time

RT-PCR. Euro Surveill 2020;25(3):pii=2000045. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.

3. Pfefferle S, Reucher S, Nörz D, Lütgehetmann M. Evaluation of a quantitative RT-PCR assay for the detection of the emerging coronavirus SARS-CoV-2 using high throughput system. Euro Surveill 2020;25(9):pii=2000152. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.9.2000152.
4. van Kasteren B, van der Veer B, van den Brink S, Wijsman L, de Jonge J, van den Brandt A et al. Comparison of commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19. J Clin Virol 2020. doi:10.1016/j.jcv.2020.104412.
5. Nalla AK, Casto AM, Huang ML, Perchetti GA, Sampoleo R, Shrestha L et al. Comparative performance of SARS-CoV-2 detection assays using seven different primer/probe sets and one assay kit. J Clin Microbiol 2020. doi:10.1128/JCM.00557-20.
6. Centers for Disease Control. Division of viral diseases. 2020. Real-time Rt-PCR panel for detection of 2019-novel coronavirus: instructions for use. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/rt-pcr-panel-for-detection-instructions.pdf>.
7. Chan JF, Yip C, To K, Tang T, Wong S, Leung K, Fung A et al. Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/He1 real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay validated in vitro and with clinical specimen. J Clin Microbiol 2020. doi:10.1128/JCM.00310-20.