

## CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE CARGA VIRAL DE SARS-COV-2 POR PCR EN TIEMPO REAL EN INDIVIDUOS REFERIDOS AL INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE “RAFAEL RANGEL”

Valerie Ross<sup>1</sup> , Génesis Caraballo<sup>2</sup> , Pierina D'Angelo<sup>3</sup> , Cristina Gutiérrez<sup>4</sup> .

<sup>1</sup>Bioanalista, Centro Clínico de Maternidad Leopoldo Aguerrevere, <sup>2</sup>Docente Instructor Cátedra de Parasitología, Universidad Central de Venezuela, <sup>3</sup>Jefe Departamento de Virología-Dirección de Diagnóstico y Enfermedades Transmisibles-Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”, <sup>4</sup>Docente Asistente Cátedra de Virología, Universidad Central de Venezuela.  
Premio SVBE XVII Congreso Venezolano de Bioanálisis 2023

Recibido para publicación 22 julio 2023. Aceptado: 15 septiembre 2023

### RESUMEN:

**Introducción:** COVID-19, infección viral altamente transmisible y patógena causada por el SARS-CoV-2, surgió en China y se extendió por el mundo creando una pandemia. Se ha demostrado que la dinámica viral tiene influencia en el progreso de la enfermedad. Es importante contar con herramientas que permitan evaluar su curso. Por ello, se propone estandarizar la técnica de qRT-PCR para la cuantificación de los niveles de carga viral del SARS-CoV-2. **Objetivo:** Estandarizar la técnica de qRT-PCR para la cuantificación de los niveles de carga viral del SARS-CoV-2 en pacientes referidos al Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” (INHRR). **Metodología:** Se realizó una curva de calibración a partir de un estándar del gen E del SARS-CoV-2 con  $10^8$  copias virales/ $\mu\text{L}$ , se realizaron diluciones seriadas 1:10 y se establecieron 8 puntos para obtener la función lineal necesaria mediante los métodos estadísticos adecuados. Se cuantificó la carga viral de 230 muestras provenientes del tracto respiratorio superior mediante qRT-PCR, extraídas previamente con el método de perlas magnéticas y/o columnas de sílica gel. **Resultados:** Se obtuvo una curva estándar de calibración con un coeficiente de correlación ( $r^2$ ) de 0,9959 y Eficiencia (E) de 79%. Se correlacionó el Ct obtenido de las muestras con el número de copias virales presentes en ellas, obteniéndose un promedio de carga viral que oscila en el orden de  $10^4$  copias virales/ $\mu\text{L}$  en sintomáticos y  $10^3$  copias virales/ $\mu\text{L}$  en asintomáticos. **Conclusión:** Este trabajo representa el primer reporte de estandarización de una metodología para la cuantificación de los niveles de carga viral del SARS-CoV-2 en muestras del tracto respiratorio superior en Venezuela, para la implementación y uso de una herramienta útil en el monitoreo de los casos de COVID-19. Se observó que los niveles de carga viral en las muestras de estudio presentaban un promedio de carga viral que oscila en el orden de  $10^3$  -  $10^4$  copias virales/ $\mu\text{L}$ .

**Palabras clave:** carga viral, SARS-CoV-2, COVID-19, qRT-PCR.

## QUANTIFICATION OF SARS-COV-2 VIRAL LOAD LEVELS BY TIME-TIME PCR REAL IN INDIVIDUALS REFERRED TO THE NATIONAL INSTITUTE OF HYGIENE “RAFAEL RANGEL”

### ABSTRACT

**Introduction:** COVID-19, a highly transmissible and pathogenic viral infection caused by SARS-CoV-2, emerged in China and spread worldwide, creating a pandemic. Viral dynamics have been shown to influence disease progression. It is important to have tools to evaluate its course. Therefore, it is proposed to standardize the qRT-PCR technique for the quantification of SARS-CoV-2 viral load levels. **Objective:** To standardize the qRT-PCR technique for the quantification of SARS-CoV-2 viral load levels in patients referred to the INHRR. **Methodology:** A calibration curve was generated from a SARS-CoV-2 gene E standard with  $10^8$  viral copies/ $\mu\text{L}$ , serial 1:10 dilutions were performed, and 8 points were established to obtain the necessary linear function using appropriate statistical methods. The viral load of 230 upper respiratory tract samples was quantified by qRT-PCR, previously extracted with the magnetic bead and/or silica gel column methods. **Results:** A standard calibration curve with  $r^2$  of 0.9959 and Efficiency of 79% was obtained. The Ct obtained from the samples was correlated with the number of viral copies present in them, obtaining an average viral load that ranges in the order of  $10^4$  viral copies/ $\mu\text{L}$  in symptomatic patients and  $10^3$  viral copies/ $\mu\text{L}$  in asymptomatic patients. **Conclusion:** This work represents the first report of the standardization of a methodology for the quantification of SARS-CoV-2 viral load levels in upper respiratory tract samples in Venezuela, for the implementation and use of a useful tool in the monitoring of COVID-19 cases. It was observed that the viral load levels in the study samples presented an average viral load that ranges in the order of  $10^3$  -  $10^4$  viral copies/ $\mu\text{L}$ .

**Keywords:** viral load, SARS-CoV-2, COVID-19, qRT-PCR.

### Introducción

La COVID-19 es una infección viral altamente transmisible y patógena causada por el Coronavirus del

Síndrome Respiratorio Agudo Severo 2 (SARS-CoV-2), que surgió en Wuhan, China y se extendió por todo el mundo (1). El agente infeccioso fue identificado el

Solicitar copia a: Valerie Ross (valerieross97@gmail.com)

7 de enero de 2020 como un nuevo Coronavirus y se denominó provisionalmente 2019-nCoV, que se cree que se originó en el mercado de mariscos de Huanan (2,3). Debido a su marcada similitud en términos de síntomas clínicos y naturaleza biológica con el agente causante del Síndrome Respiratorio Agudo Severo, el SARS-CoV, el nuevo coronavirus fue nombrado SARS-CoV-2 por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) (2,4). El virus se informó por primera vez en diciembre de 2019 y la Organización Mundial de la Salud (OMS) la clasificó como pandemia el 11 de marzo de 2020 (5).

Tan pronto como se identificó el patógeno causal y se determinó su secuencia genómica, se estableció rápidamente un diagnóstico de laboratorio basado en tecnologías de amplificación de ácidos nucleicos, lo cual ha permitido un abordaje clínico oportuno. Se necesitan con urgencia estrategias que puedan detectar eficazmente la progresión de la enfermedad para estratificar a los pacientes para una atención adecuada y que, por lo tanto, puedan prevenir la exacerbación de la enfermedad (6).

Los Coronavirus (CoV) son un grupo de virus envueltos con genomas de ARN no segmentados, monocatenarios y de sentido positivo. Además de infectar una variedad de vertebrados importantes, pudiendo afectar el sistema nervioso central, hepático, gastrointestinal y respiratorio de vacas, aves, murciélagos, ratones y muchos otros animales salvajes. El SARS-CoV-2 es un virus nuevo perteneciente a la subfamilia Orthocoronavirinae género Betacoronavirus y al subgénero Sarbecovirus y dentro de ellos al linaje 2. Infecta y se replica de forma eficiente en los neumocitos, macrófagos y células dendríticas de las partes más profundas del parénquima pulmonar en las que reside el receptor celular ACE2 (Enzima Convertidora de Angiotensina II, por sus siglas en inglés) que es utilizado por este virus para unirse a dichas células e iniciar el proceso infeccioso (4,7).

La secuencia de SARS-CoV-2 compartida en la plataforma GISAID (Iniciativa Mundial para Compartir Datos sobre la Influenza Aviar, por sus siglas en inglés), permitió el desarrollo de varias pruebas de diagnóstico molecular a través del diseño de cebadores y sondas específicas para la detección rápida mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa con transcriptasa reversa en tiempo real (qRT-PCR) (8,9).

A lo largo del curso pandémico se ha demostrado que la dinámica viral tiene influencia en la evolución

de la enfermedad, asociada a la sintomatología que presentan los pacientes infectados por el SARS-CoV-2. Es de suma importancia contar con herramientas que permitan evaluar el curso y progreso de la enfermedad. Por ello, se propone estandarizar la técnica de qRT-PCR para la cuantificación de los niveles de carga viral del SARS-CoV-2 en pacientes referidos al Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", con la finalidad de correlacionar los valores de copias virales con el valor umbral o Ct obtenido. Estos valores serán de utilidad para poder investigar a futuro la dinámica de la infección viral en los pacientes sintomáticos y asintomáticos, así como evaluar el comportamiento de las variantes emergentes, resistencia a medicamentos, cuasiespecies y fitness viral, entre otros. (10,11).

## Materiales y métodos

### *Tipo y toma de muestras:*

Las muestras del tracto respiratorio superior corresponden al tipo de muestra empleado en este Trabajo Especial de Investigación (230 muestras), debido a que en el epitelio respiratorio superior el virus tiene una tasa de replicación importante y es de fácil obtención. Dentro de estas muestras se incluyen hisopado nasofaríngeo, orofaríngeo y nasal (12).

### *Preparación de la muestra:*

Todas las muestras se consideran potencialmente infecciosas. Es recomendable que se incuben a 56 °C en un termobloque durante 30 minutos para inactivarlas antes de la extracción de ácidos nucleicos con la finalidad de asegurar una pérdida total de la infectividad mientras se conserva la integridad de los ácidos nucleicos (13). Posterior a esto, se procede a extraer los hisopos contenidos en el medio de transporte viral que se utilizaron para la obtención de la muestra, luego de someterse a un paso de centrifugado de ser necesario (si la muestra es muy viscosa) y mezclado con vortex.

### *Extracción de ácidos nucleicos:*

Para la extracción de ácidos nucleicos se emplearon dos metodologías diferentes de acuerdo a la disponibilidad de reactivos y consumibles, las cuales son: método de extracción manual por adsorción en columnas de sílica gel y método automatizado por separación con perlas magnéticas con la utilización del equipo MGISP-960.

*Detección y amplificación del gen E mediante técnicas de RT-PCR en tiempo real:*

Para la amplificación del material genómico de cada muestra se siguen las instrucciones del protocolo desarrollado por el Instituto de Virología Charité – Universitätsmedizin Berlin en Alemania, utilizando cebadores altamente conservados de la región genómica de la envoltura E del SARS-CoV-2 (14). Cada ensayo de PCR es llevado a cabo en un volumen final de 25 µL, en presencia de Buffer 10X, los cebadores y la sonda FAM (ver Tabla 1); 5 U/µL de la enzima One Step transcriptasa reversa CWBIO. En cuanto al volumen de muestra o controles, se utilizan 5 µL de extracto de ARN.

*Diseño de una curva estándar de calibración para la cuantificación de los niveles de carga viral de SARS-CoV-2.*

Para la cuantificación de los niveles de carga viral, se requiere realizar una curva estándar de calibración a partir de un control positivo (estándar) del gen E del SARS-CoV-2 con un número conocido de copias virales. Dicho control contiene 10<sup>8</sup> copias, a partir del cual se harán diluciones seriadas 1:10 del mismo y se establecerán al menos 8 puntos para obtener la función lineal necesaria para construir la curva de calibración mediante el uso del método de los “mínimos cuadrados” con la finalidad de que se tenga exactitud y confiabilidad estadística al obtener los parámetros para la función de la curva de calibración.

*Validación de los resultados:*

Para la validación de cada placa de reacción se incluyeron controles tanto positivo (PTC) como negativo (NTC), así como una dilución del estándar SARS-CoV-2 iv-RNA E-gene de 10<sup>8</sup> copias liofilizado, correspondiente a un punto de la curva de calibración realizada, y un control del agua libre de nucleasas empleada en la extracción de los ácidos nucleicos, para la obtención de resultados validados adecuadamente.

Por otra parte, de manera de poder validar y controlar el procedimiento de extracción de ácidos nucleicos, para demostrar la recuperación exitosa del ARN del SARS-CoV-2 de las células del epitelio respiratorio, así como la integridad del reactivo de extracción, se realiza la identificación mediante qRT-PCR del gen de RNasa P (RP) humana. Esto se realiza para cada muestra ensayada en otra placa de reacción diferente, ya que el kit empleado utiliza la misma sonda que para la detección del gen E (sonda FAM).

Tabla 1. Cebadores y sonda empleados para la qRT-PCR para la detección del gen E

Ensayo	Oligonucleótido	Secuencia
Gen E	E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATA-GCGT
	E_Sarbeco_P1	FAM-ACACTAGCCATCCTTACT-GCGCTTCG-BBQ
	E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA

FAM: 6-carboxifluoresceína; BBQ: blackberry quencher (67).

**Resultados**

*Curva estándar de calibración (Número de copias virales/µL vs Ct):*

En la Tabla 2, se pueden observar los valores de Ct obtenidos para cada punto de la curva de calibración; así mismo, los valores de cada una de las réplicas de los puntos de dilución establecidos 1:10.

Tabla 2. Valores de Ct para la obtención de la curva estándar de calibración

Número de copias virales/µL	Valores de Ct	Media (X̄) Ct
10 <sup>8</sup>	14,8	14,9
	14,9	
	15,1	
10 <sup>7</sup>	18,0	18,2
	18,3	
	18,3	
10 <sup>6</sup>	22,1	22,4
	22,2	
	22,9	
10 <sup>5</sup>	28,0	26,1
	25,3	
	25,1	
10 <sup>4</sup>	33,2	31,6
	24,8*	
	30,0	
10 <sup>3</sup>	35,6	34,1
	38,1*	
	32,6	
10 <sup>2</sup>	37,1	38,3
	39,4	
	≥40	
10 <sup>1</sup>	≥40	≥40
	≥40	
	≥40	

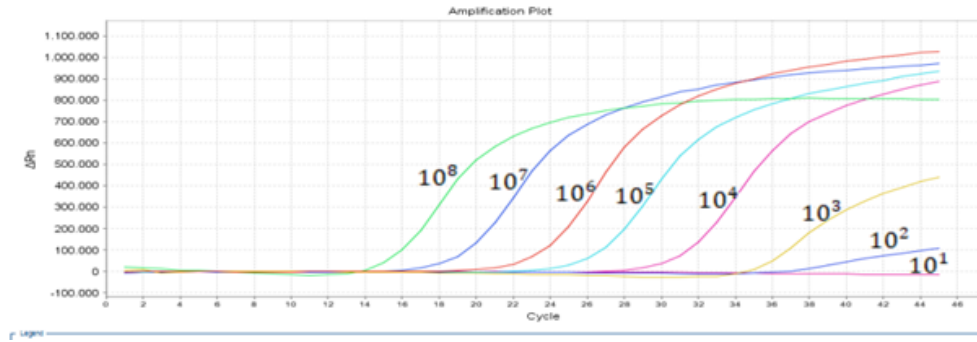


Figura 1. Curvas de amplificación de las diluciones seriadas correspondientes a la curva estándar de calibración.

Como se puede observar en los resultados obtenidos, aquellas diluciones que presentan mayor número de copias virales arrojan valores de Ct más bajos, por lo que se establece una relación inversamente proporcional en la que a menor valor de Ct, se estiman valores de carga viral elevados.

En líneas generales, en cada réplica de las diluciones del estándar de calibración hubo buena reproducibilidad y baja dispersión entre ellas, demostrando que para las diluciones  $10^7$  y  $10^8$ , todas las réplicas se encontraron dentro del rango  $\pm 1DS$ , mientras que para las diluciones  $10^6$  y  $10^5$ , solo una réplica de cada uno de ellos se alejó muy ligeramente de dicho rango. En las diluciones  $10^3$  y  $10^4$  una réplica de cada dilución se encontró muy alejada de la primera desviación estándar para cada grupo de réplicas, por lo que se excluyeron del estudio.

A continuación, en la Figura 1, se pueden contemplar las curvas de amplificación obtenidas y sus diluciones respectivas.

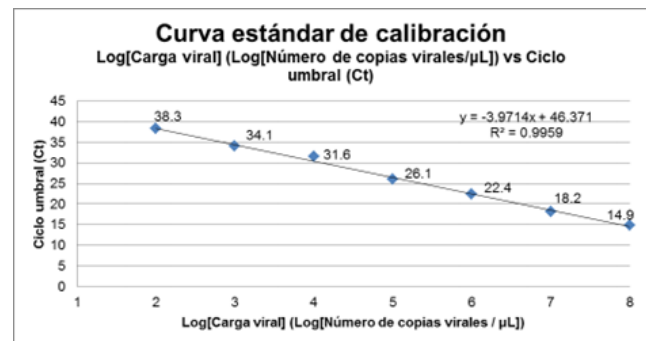
Para la construcción de la curva de calibración, fueron tomados en consideración la media de los valores de Ct obtenidos de las tres réplicas para cada dilución, exceptuando una de las réplicas para la dilución  $10^4$  y  $10^3$ , respectivamente. En el Gráfico 1, se puede detallar la curva estándar de calibración obtenida.

En el gráfico se detalla la función de la recta con sus respectivos valores de pendiente (m) de -3,9714 y punto de corte en el eje "y" (b) de 46,371, así como el valor de coeficiente de correlación lineal ( $r^2$ ) de 0,9959, lo cual es indicativo de la calidad de la curva para replicar los resultados. La eficiencia (E) de la amplificación resultó ser de 79% (15,16).

*Detección y amplificación del gen E mediante técnicas de RT-PCR en tiempo real:*

Todas las muestras procesadas amplificaron para la detección del control interno (RNAsa P) y se encontró

Gráfico 1. Curva estándar de calibración: Log[Carga viral] (Log[Número de copias virales/ $\mu$ L]) vs Ciclo umbral (Ct):



un 100% de positividad para la detección del gen E del SARS-CoV-2.

En relación a la sintomatología presentada, un total de 120 pacientes (52,2%) corresponde a pacientes sintomáticos; de los cuales 10 de ellos (4,3%) tuvieron una evolución de la enfermedad que culminó con su fallecimiento. Por otra parte, un total de 110 individuos (47,8%) cursaron la infección de forma asintomática. Estos datos se corresponden con los obtenidos a nivel mundial, donde se señala que la mayoría de los individuos padecen cuadros respiratorios leves y se recuperan sin tratamiento especial (17,18).

Aquellos individuos que presentaron sintomatología, fueron clasificados de acuerdo a la severidad de su padecimiento en cuatro categorías: enfermedad leve, enfermedad moderada, enfermedad grave y enfermedad crítica, como fue detallado en el marco teórico. Un total de 120 pacientes (52,2%) presentaron sintomatología, dentro de los cuales destacan 49 pacientes con enfermedad leve (21,3%), 45 pacientes con enfermedad moderada (19,6%), 16 pacientes con enfermedad grave (6,9%) y, por último, 10 pacientes con enfermedad crítica (4,4%).

**Correlación de los Ct de las muestras con el número de copias virales:**

Para correlacionar los valores de Ct de cada una de las muestras con el número de copias virales/ $\mu\text{L}$ , se realizó la extrapolación de dichos valores a la curva estándar de calibración, mediante el uso de la función de la recta obtenida  $y = -3,9724x + 46,371$  para así obtener los niveles de carga viral en estos individuos.

Estos valores se pueden evidenciar en la Tabla 3, donde se observa que se agruparon las muestras en estudio en grupos de acuerdo a sus valores de Ct obtenidos, entendiéndose que la relación entre el Ct y la carga viral es inversamente proporcional.

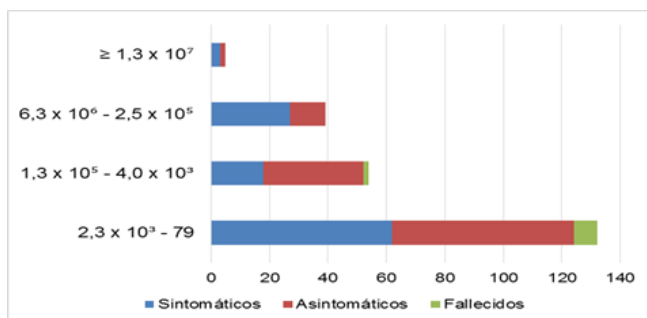
En el Gráfico 2 se demuestra una representación de los valores de carga viral obtenidos de acuerdo a la clasificación de los individuos sintomáticos, asintomáticos y fallecidos.

Tabla 3. Extrapolación de valores de Ct con el número de copias virales/ $\mu\text{L}$

Valores de Ct	Número de copias virales/ $\mu\text{L}$
$\leq 18$	$\geq 1,3 \times 10^7$
19 - 25	$6,3 \times 10^6 - 2,5 \times 10^5$
26 - 32	$1,3 \times 10^5 - 4,0 \times 10^3$
33 - 39	$2,3 \times 10^3 - 79$

Como se puede observar, la mayor parte de los individuos estudiados, tanto sintomáticos, como asintomáticos, arrojaron valores de carga viral bajos, encontrándose que el rango de valores de carga viral más frecuente fue el de  $2,3 \times 10^3 - 79$  copias virales/ $\mu\text{L}$ . Pero

Gráfico 2. Rango de valores de carga viral en la muestra estudiada.



también es importante destacar que en el caso de los grupos de cargas virales elevadas ( $\geq 1,3 \times 10^7$  y  $6,3 \times 10^6 - 2,5 \times 10^5$ ) los individuos más frecuentemente encontrados con dichos valores fueron los sintomáticos, por encima de los asintomáticos.

Se encontró que el comportamiento en líneas generales entre el grupo de pacientes sintomáticos y asintomáticos fue bastante similar. Ambos grupos mostraron valores promedios de carga viral en el orden de  $10^4$  y  $10^3$ , respectivamente.

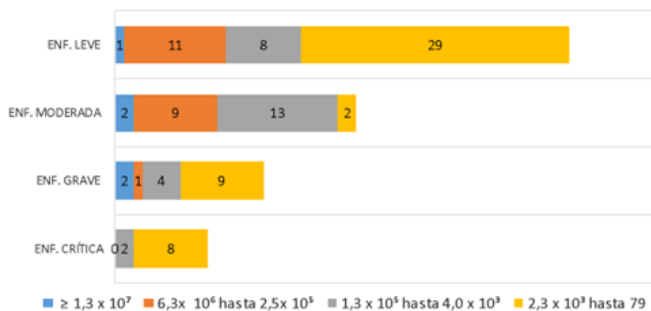
Por otra parte, los asintomáticos siguen demostrando ser un grupo de interés de estudio puesto que un 13% (14/110 individuos) presentaron también cargas virales elevadas ( $> 1 \times 10^5$  copias virales/ $\mu\text{L}$ ). Estos datos se correlacionan con resultados expuestos en otros estudios en los cuales resumen la evidencia que destaca la transmisión por individuos asintomáticos y pre-sintomáticos, resaltando que la carga viral de casos asintomáticos y sintomáticos es comparable y que la excreción viral es mayor antes de la aparición de los síntomas, lo que sugiere una alta transmisibilidad antes de los síntomas (19).

En cuanto a la severidad de la enfermedad, se pudo observar que los pacientes fallecidos, que corresponden a aquellos con enfermedad crítica, reflejaron cargas virales bajas, pudiendo obedecer esto a diversos factores tales como el momento de la toma de la muestra, ya que es importante que la toma se realice en la fase aguda de la enfermedad, es decir, en el momento que existe replicación viral activa, y no como ha ocurrido en ocasiones que se realiza de forma post mortem. Además, diversos estudios han señalado que, si bien las muestras provenientes del tracto respiratorio superior son adecuadas para el diagnóstico de los pacientes infectados con el virus, en caso de pacientes críticos las muestras de elección y más idóneas son las provenientes del tracto respiratorio inferior, tales como lavado broncoalveolar, esputo y/o aspirado endotraqueal (7,19). Incluso, es de señalarse también que aquellos pacientes críticos corresponden a pacientes que han requerido hospitalización, y que probablemente hayan sido tratados con fármacos antivirales como lo es el Remdesivir, por lo que esto pudiera subestimar también los valores de carga viral obtenidos en el análisis.

**Correlación de la carga viral con la severidad y/o progresión de la enfermedad:**

En el Gráfico 3, se evidencian los valores de carga viral que manejaron los individuos según el grado de enfermedad que desarrollaron, bien sea enfermedad

Gráfico 3. Valores de carga viral vs. Progresión de la enfermedad.



leve, enfermedad moderada, enfermedad grave o enfermedad crítica.

Como se puede observar, los individuos que desarrollaron enfermedad leve (49 individuos) obtuvieron un promedio de carga viral igual a  $1,0 \times 10^4$  copias virales/ $\mu\text{L}$ . En cuanto a aquellos que desarrollaron enfermedad moderada (45 individuos) se tiene que el promedio de carga viral obtenido fue igual a  $1,3 \times 10^4$  copias virales/ $\mu\text{L}$ . Por otra parte, los individuos que padecieron enfermedad grave (16 individuos) tuvieron un promedio de carga viral igual a  $1,8 \times 10^4$  de copias virales/ $\mu\text{L}$ . Por último, aquellos individuos que desarrollaron enfermedad crítica (10 individuos) obtuvieron un promedio de carga viral igual a  $2,5 \times 10^3$  copias virales/ $\mu\text{L}$ .

El presente estudio proporciona una herramienta útil en el laboratorio de biología molecular para el seguimiento clínico del paciente, que permita evaluar progresión de la enfermedad a través de la cuantificación de la carga viral, lo que, a su vez, permita implementar terapias de acuerdo a la severidad y pronóstico de la patología en curso, pero que, además, sirva de base para futuras líneas de investigación donde se pueda correlacionar la carga viral con la transmisibilidad del virus.

## Referencias

- Shereen MA, Khan S, Kazmi A, Bashir N, Siddique R. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *J Adv Res* [Internet]. 2020;24:91-98. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.03.005>
- Abduljalil JM, Abduljalil BM. Epidemiology, genome, and clinical features of the pandemic SARS-CoV-2: a recent view. *New Microbes New Infect* [Internet]. 2020;35(100672):1-8. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.10067>
- Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* [Internet]. 2020;382(8):727-733. Disponible en: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>
- Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* [Internet]. 2020;5:536-544. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
- World Health Organization (WHO). Coronavirus disease 2019 (COVID-19). Situation Report – 51. Data as reported by national authorities by 10 AM CET 11 March 2020 [Internet]. 2020. [actualizado 11 mar 2020; citado 12 abr 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200311-sitrep-51-covid-19.pdf>
- Fang B, Meng QH. The laboratory's role in combating COVID-19. *Crit Rev Clin Lab Sci* [Internet]. 2020;57(6):400-414. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/10408363.2020.1776675>
- Gutiérrez C. SARS-CoV-2: Aspectos biológicos, epidemiológicos y diagnósticos de un coronavirus emergente. *Acta Científ Soc Venez Bioanalistas Espec* [Internet]. 2020;23(1):3-13. [citado 8 may 2023]. Disponible en: [http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev\\_ACSVBE/article/view/19189/144814485571](http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ACSVBE/article/view/19189/144814485571)
- Mancini F, Barbanti F, Scaturro M, Errico G, Iacobino A, Bella A, et al. Laboratory management for SARS-CoV-2 detection: a user-friendly combination of the heat treatment approach and rt-Real-time PCR testing. 2020;9(1):1393-1396. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1775500>
- Wang Y, Kang H, Liu X, Tong Z. Combination of RT-qPCR testing and clinical features for diagnosis of COVID-19 facilitates management of SARS-CoV-2 outbreak. *J Med Virol* 2020;92(6):538-539. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/jmv.25721>
- Wargo AR, Kurath G. Viral fitness: Definitions, measurement, and current insights. *Curr Opin Virol* 2012;2(5):538-545. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.07.007>
- Pan Y, Zhang D, Yang P, Poon LLM, Wang Q. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Lancet Infect Dis* 2020;20(4):411-412. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30113-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30113-4)
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). Directrices de laboratorio para la 138 detección y el diagnóstico de la infección por el virus responsable de la COVID19 [Internet]. 2020. p. 1-11. [actualizado 8 jul 2020; citado 6 may 2023]. Disponible en: [https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52471/OPSIMSPHECOVID19200038\\_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52471/OPSIMSPHECOVID19200038_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- OPS/OMS. Procedimientos generales para inactivación de muestras potencialmente infecciosas con el virus ebola y otros agentes virales altamente



- patógenos [Internet]. 2014. [actualizado 23 oct 2014; citado 6 may 2023]. Disponible en: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2014/2014-cha-procedimientosinactivacion-ebola.pdf>
14. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, *et al.* Detection of 2019 -nCoV by RT-PCR. Euro Surveill [Internet]. 2020;25(3):1-8. Disponible en: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
  15. CIBERehd. PLATAFORMA BIOINFORMÁTICA [Internet]. Real-time RT-PCR: Cálculo de la eficiencia. [citado 18 abr 2023]. Disponible en: <http://bioinfo.ciberehd.org/effy.es.html>
  16. de Alba Aguayo DR, Rueda A. Determinacion del ciclo umbral y la eficiencia para la PCR cuantitativa en tiempo real. Rev educ bioquim 2013;32(1):36-39. [citado 12 may 2023]. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/reb/v32n1/v32n1a6.pdf>
  17. Maguiña C, Gastelo R, Tequen A. El nuevo Coronavirus y la pandemia del Covid19. Rev Med Hered [Internet]. 2020;31:125-131. Disponible en: <https://doi.org/10.20453/rmh.v31i2.3776>
  18. Organización Mundial de la Salud (OMS). Coronavirus [Internet]. 2020. [actualizado 28 mar 2023; citado 12 may 2023]. Disponible en: [https://www.who.int/es/health-topics/coronavirus#tab=tab\\_1](https://www.who.int/es/health-topics/coronavirus#tab=tab_1)
  19. Huff HV, Singh A. Asymptomatic Transmission During the Coronavirus Disease 2019 Pandemic and Implications for Public Health Strategies. Clin Infect Dis 2020;71(10):2752-2756 Disponible en: <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa654>.