

Identificación de SARS-CoV-2 en muestras de saliva por medio de RT-qPCR con la Solución
Desnaturalizante

Nathaniel Alejandro Navarro Barón

Trabajo de Grado para Optar al Título de Biólogo

Director

Francisco José Martínez Pérez

Doctor en Ciencias

Codirectora

Lina María Vera Cala

Doctora en Ciencias

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Pregrado en Biología

Bucaramanga

2023

Dedicatoria

Este logro va dedicado a toda mi familia. Principalmente a mis padres que me apoyaron y me enseñaron a afrontar todas las dificultades con la mirada siempre en Dios. También una dedicación especial a mi mamá Regina por todo el inmenso amor y lágrimas que derramó en mí.

Agradecimientos

Agradezco al proyecto: “Contribución al protocolo de diagnóstico del Coronavirus COVID-19 y del Virus de influenza A H1N1 por RT-PCR en tiempo real de un paso autorizado por la Organización mundial de la salud con la inclusión de genes marcadores requeridos para la infección viral y su validación por secuenciación genómica de nueva generación con la tecnología de concentraciones de nucleótidos”, MINCIENCIAS código 1102101576900 y a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la Universidad industrial de Santander, proyecto No. 76900.

Al Dr. Francisco José Martínez Pérez, por su confianza y apoyo depositado en mí. Especialmente agradecerle por toda su: dedicación, su pasión y su paciencia; por formarme como persona y como profesional. Le agradezco inmensamente todas las múltiples enseñanzas y llamados de atención que como un padre educando a su hijo deberá recordarlas sabiamente para toda la vida.

A la Dra. Lina María Vera Cala y a su esposo por todo el apoyo y la confianza depositada en mí.

Al Biólogo Cristian Enrique Cadena Caballero por sus buenos consejos y por su buen ejemplo como biólogo.

A la Bióloga Alejandra Navarro-Corredor y a todos los miembros del Laboratorio de Genómica Celular Aplicada (LGCA) por su dedicación y pasión por la Biología.

A la Dra. Martha Lucia Díaz Galvis por su paciencia, apoyo y enseñanzas. También Agradezco a William Chaparro Pico y a los coordinadores del LCI por el apoyo que me brindaron.

Agradezco a mi familia y a todas las personas que me apoyaron para conseguir este logro.

Gracias a todos realmente no hubiera sido posible este logro sin el aporte de cada uno de ustedes.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	11
1. Objetivos	17
1.1 Objetivo General.....	17
1.2 Objetivos Específicos.....	17
Competencias.....	18
2.1 Competencias Cognitivas.....	18
2.2 Competencias Actitudinales.....	18
3. Metodología	19
3.1 Aspectos Éticos.....	19
3.2 Extracción de muestras de saliva de SARS-CoV-2	19
3.3 RT-qPCR individuales y multiplex para la detección de SARS-CoV-2.....	20
3.4 Análisis estadístico.....	21
3.5 Patrón de hibridación entre las regiones N1 y N2 del protocolo del CDC respecto a secuencias genómicas consenso de SARS-CoV-2 del año 2021	21
4. Resultados	22
4.1 RT-qPCR individuales y multiplex para la detección de SARS-CoV-2.....	22
4.2 Patrón de hibridación entre las regiones N1 y N2 del protocolo del CDC respecto a secuencias genómicas consenso de SARS-CoV-2 del año 2021	27
5. Discusiones	29
6. Conclusiones	31

7. Recomendaciones	32
Referencias Bibliográficas	32
Apéndices.....	38

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1 <i>Procedimiento para purificación de ARN total de muestras biológicas.</i>	13
Tabla 2 <i>Prueba T para comparar cada grupo de protocolos.</i>	27
Tabla 3 <i>Porcentajes de identidad y número de cambios nucleotídicos por variantes.</i>	28

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1 <i>Representación de la organización de genes en el ARN genómico de SARS-CoV-2. ...</i>	12
Figura 2 <i>Posición de los cebadores y sondas del gen “N” del kit del CDC en el genoma de SARS-CoV-2.</i>	14
Figura 3 <i>Curvas de amplificación de muestras negativas a la amplificación de la región N1. ...</i>	22
Figura 4 <i>Comparaciones de los valores de CT de las RT-qPCR.</i>	24
Figura 5 <i>Curvas de amplificación de las RT-qPCR multiplex con muestras de saliva agrupadas.</i>	26

Lista de Apéndices

	pág.
Apéndice A. Análisis del patrón de hibridación	381
Apéndice B. Hojas de cálculos con los resultados de las RT-qPCR.	31
Apéndice C. Archivos con el análisis estadístico y diseño de gráficos en R.....	38

Resumen

Título: Identificación de SARS-CoV-2 en muestras de saliva por medio de RT-qPCR con la Solución Desnaturalizante.

Autor: Nathaniel Alejandro Navarro Barón

Palabras Clave: SARS-CoV-2, RT-qPCR, Identificación viral

Descripción: La pandemia producida por el virus SARS-CoV-2 incentivó el desarrollo de métodos precisos para su identificación y diagnóstico. Dentro de estos se encuentran los diseñados con base en la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Inversa en Tiempo Real de un Paso (RT-qPCR). Uno de ellos es el propuesto por el Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos de América (CDC) que emplea dos regiones del gen de la nucleocápside *N* viral. Sin embargo, la aparición de nuevas variantes y las estructuras secundarias de ARN pueden afectar la RT-qPCR generando resultados falsos negativos. Para ello, en muestras de hisopado nasofaríngeo se adiciona a la reacción una solución de Cloruro de Tetraetilamonio (TEA) o Dimetilsulfóxido; pero no se han demostrado sus efectos en muestras de saliva. En esta pasantía, se demostró que el uso de esta solución en el ARN purificado por magnetismo y con los cebadores y sondas para las dos regiones del gen *N* del kit de RT-qPCR del CDC se genera una ligera disminución o aumento de la señal de cuantificación en muestras individuales. Sin embargo, en muestras agrupadas y con ambos cebadores y sondas, con la misma reacción se mejora significativamente la señal. La validación *in silico* del patrón de hibridación con variantes de SARS-CoV-2 indica que el resultado estará en función de la variante de SARS-CoV-2. Con lo anterior se ratifica que el uso de ambos reactivos químicos en las reacciones de RT-qPCR de kits de identificación internacionales para SARS-CoV-2 son una opción de mejora para el diagnóstico en pacientes.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Biología. Director: Francisco José Martínez Pérez. Doctor en Ciencias. Codirector: Lina María Vera Cala. Doctora en Ciencias

Abstract

Title: Identification of SARS-CoV-2 in saliva samples by means of RT-qPCR with the Denaturing Solution.

Author: Nathaniel Alejandro Navarro Barón

Key Words: SARS-CoV-2, RT-qPCR, Identification viral

Description: The pandemic produced by the SARS-CoV-2 virus encouraged the development of precise methods for its identification and diagnosis. Among these are those designed based on the One-Step Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR). One of them is the one proposed by the Centers for Disease Control and Prevention of the United States of America (CDC) that uses two regions of the viral N nucleocapsid gene. However, the appearance of new variants and RNA secondary structures can affect RT-qPCR, generating false negative results. To do this, in nasopharyngeal swab samples, a solution of Tetraethylammonium Chloride (TEA) or Dimethylsulfoxide is added to the reaction, but their effects have not been demonstrated in saliva samples. In this internship, it was shown that the use of this solution on RNA purified by magnetism and with the primers and probes for the two regions of Gene N from the CDC RT-qPCR kit generates a slight decrease or increase in the signal of quantification in individual samples. However, in pooled samples and with both primers and probes with the same reaction the signal is significantly improved. The *in silico* validation of the hybridization pattern with SARS-CoV-2 variants indicates that the result will depend on the SARS-CoV-2 variant. With the above, it is confirmed that the use of both chemical reagents in the RT-qPCR reactions of international identification kits for SARS-CoV-2 are an option for improvement for diagnosis in patients.

* Bachelor thesis

*Science Faculty. School of Biology. Tutor: Francisco José Martínez Pérez. PhD. in Science. Cotutor: Lina María Vera Cala. PhD. in Epidemiology.

Introducción

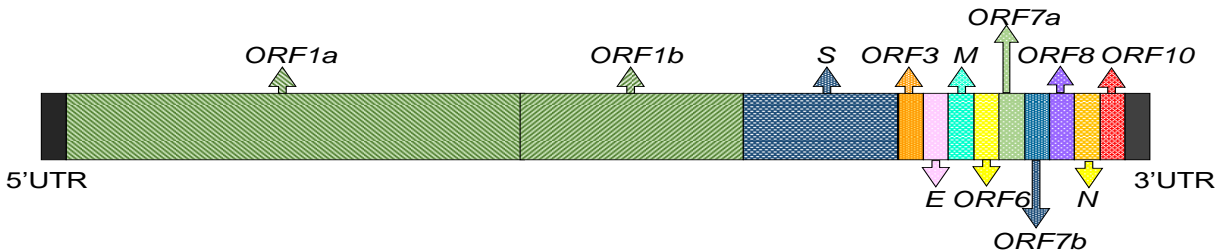
El virus SARS-CoV-2 pertenece a la familia Coronaviridae, el cual se identificó a finales del año 2019 en Wuhan, China (Zhu et al., 2019). Desde un punto de vista de salud, se caracteriza por causar infecciones respiratorias en seres humanos por medio de la enfermedad conocida como COVID-19 (Hu et al., 2021), por la cual se declaró pandemia en el año 2020 (Adil et al., 2021).

SARS-CoV-2 posee un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo de aproximadamente 30 kb (Zhu et al., 2019; Nakagawa & Miyazawa 2020) cuyo orden nucleotídico genera estructuras secundarias tallo burbujas que participan en la regulación de la traducción y vida media del genoma viral (Condé et al., 2022; Verma et al., 2021; Plant 2005). Los primeros tallos burbuja se localizan en el extremo 5' no traducido (UTR) y participan en la traducción el primer gen *ORF1ab*, que genera la respectiva proteína por otras estructuras secundarias denominadas Cambio de Marco Ribosómico Programado (Kelly et al., 2020). Inmediatamente se encuentra el gen *S* que codifica para la proteína Spike que contiene el Dominio de Unión al Receptor; después, están los genes *ORF3*, *E* y *M*, estos dos últimos codifican para las proteínas estructurales de envoltura y de membrana, y a continuación los genes *ORF6*, *ORF7a*, *ORF7b*, *ORF8* y el gen *N* que codifica para la nucleocápside. Por último, el gen *ORF10* y el extremo 3' que también presenta estructuras tallo burbuja (Hu, et al., 2021; Verma et al., 2021) (Figura 1).

Debido a que la dispersión de SARS-CoV-2 es por medio de las vías respiratorias de los seres humanos (Stadnytskyi et al., 2021) y ante la emergencia sanitaria de ese momento, fue indispensable y fundamental generar ensayos clínicos que permitieran identificar y concomitantemente, diagnosticar a la persona infectada para que recibiera el tratamiento médico pertinente y aislarlo para evitar la dispersión viral entre la población.

Figura 1

Representación de la organización de genes en el ARN genómico de SARS-CoV-2.



De acuerdo con la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos de América (FDA), se encuentran principalmente dos tipos de pruebas de laboratorio para la detección del *SARS-CoV-2*, clasificadas en pruebas de anticuerpos y de diagnóstico molecular. Las primeras examinan en la sangre del paciente la presencia de anticuerpos cuya biosíntesis fue realizada por el sistema inmune en respuesta a la infección de *SARS-CoV-2* (Karlafti, et al., 2023). Mientras que las pruebas de diagnóstico molecular, como las RT-qPCR de uno o dos pasos, que se denomina la prueba dorada de diagnóstico, localiza una región del material genético del virus por su patrón de hibridación de cebadores y una sonda con un fluoróforo y con ello, en cada ciclo de polimerización con una ADN polimerasa termoestable, se genera una señal luminosa la cual es cuantificada. Por lo tanto, en caso de que la reacción sea positiva se concluye que en la muestra tiene el genoma viral y, por ende, la persona está infectada con *SARS-COV-2* (Liu et al., 2023).

Se puede considerar que el proceso molecular general para la identificación de *SARS-CoV-2* por RT-qPCR tiene tres puntos comunes. El primero es la obtención y posterior purificación del ácido nucleico. El segundo es el diseño de los cebadores y sonda para la amplificación de la región seleccionada por RT-qPCR de un paso y el tercero es el análisis de los resultados de la reacción para determinar la presencia o ausencia del virus en la muestra.

Para la primera fase del diagnóstico, grupos de investigación generaron kits comerciales sustentados en métodos publicados para la purificación de ARN total de una muestra de hisopado nasofaríngeo y/o de la saliva del paciente cuyo diagnóstico médico indicaba que el cuadro clínico podría ser generado por SARS-CoV-2 (Lim et al., 2022; Thom et al., 2021). Independientemente del método todos se sustentan en 3 fases (Tabla 1).

Tabla 1

Procedimiento para purificación de ARN total de muestras biológicas.

Fase	Objetivo	Fundamento	Métodos
1	Rompimiento de las células, lisis de ADN y las proteínas de la muestra.	Físicos Químico	Presión, temperatura y mecánica. Reactivos químicos, pH, enzimas como la Proteinasa K o DNAsas.
2	Concentración de ARN y remoción de péptidos, DNA y lípidos azúcares sales y otros metabolitos presentes en la muestra.	Lisis física con o sin tratamiento bioquímico Columnas con sílica, Perlas magnéticas con carga positiva Químico	Lisis por métodos físico y químico sin purificación de ARN. Centrifugación. Instrumentos o equipos que generan magnetismo.
3	Recuperación de ARN.	Físico	Precipitación química. Elución de sílica o perlas magnéticas

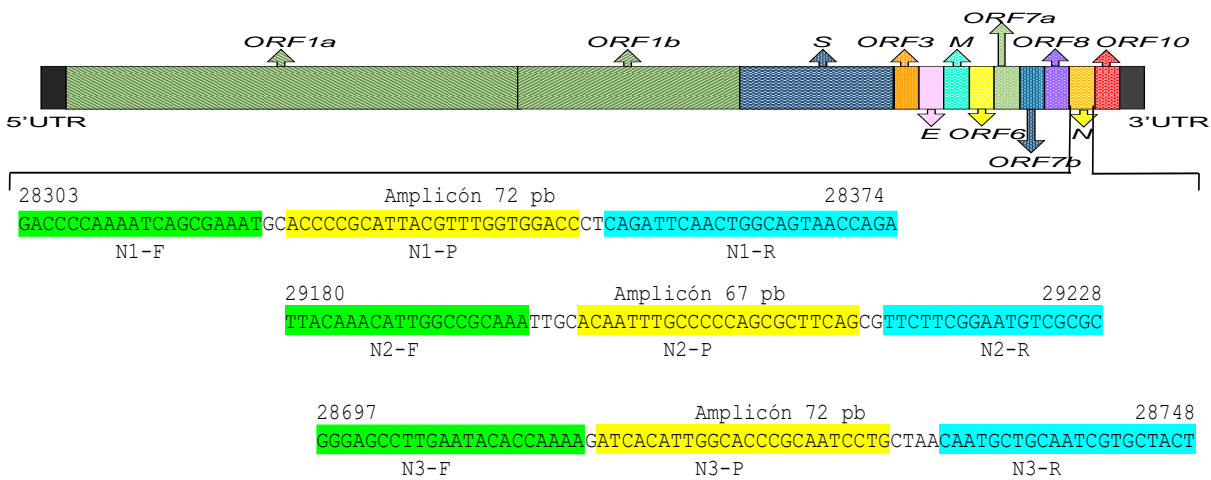
Nota. El procedimiento se adaptó de Liu et al., (2023) y Dhibika et al., (2023).

En la segunda fase del diagnóstico diseñada que corresponde a la amplificación de regiones del genoma viral por RT-qPCR; se generaron, por grupos de investigación, diversos protocolos que se comercializaron por medio de kits de diferentes países o casas comerciales. En la mayoría de ellos emplean diversas regiones de los genes *ORF1ab*, *E* y *N* de SARS-CoV-2 y del gen *RNAse P* de seres humanos como control del proceso (Guaman-Bautista et al., 2021; Benevides Lima et al., 2022). Sin embargo, la mayoría de los países, emplearon el protocolo recomendado por la Organización Mundial de la Salud conocido como Protocolo de Berlín cuyo diseño es para

reconocer las regiones de los genes: *RdRP*, *E* y *N* (Corman et al., 2020). Mientras que el protocolo de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos de América (CDC) emplea tres regiones del gen *N* denominadas: N1 y N2 cercana al del sitio de inicio y final de la traducción, respectivamente y N3 localizada entre las dos anteriores (Figura 2).

Figura 2

Posición de los cebadores y sondas del gen “N” del kit del CDC en el genoma de SARS-CoV-2.



Nota: Los números de la parte superior de la secuencia empelada para el diagnóstico corresponden a la posición en el genoma de SARS-CoV-2 y el tamaño del amplicón. Las secuencias nucleotídicas indicadas en la caja verde corresponden al cebador sentido indicado con “F”, las cajas azules y la “R” indican el cebador anti sentido y las cajas amarillas y la “P” al cebador, el cual contuvo el fluoróforo FAM.

Aun cuando los protocolos de RT-qPCR han sido un elemento fundamental para la identificación y/o diagnóstico de SARS-CoV-2, durante y después de la pandemia, debido a la que la cepa original ha mutado para genera las nuevas variantes virales (Konings et al., 2021), dichos cambios pueden producir nuevas estructuras secundarias en el ARN genómico y concomitantemente de la región empleada para la identificación en la muestra. Por lo tanto, se puede afectar la polimerización o impedir que se realice la RT-qPCR y se obtendrán, resultados parciales o falsos negativos respectivamente (Bao et al., 2022; Cadena-Caballero et al., 2022).

Para solucionar lo anterior en otros protocolos de RT-PCR, se incluyen Cloruro de Tetraetilamonio (TEA) o Dimetilsulfóxido (DMSO) para evitar lo antes indicado y con ello mejorar la polimerización, en genomas de proporción nucleotídica extrema como es el de SARS-CoV-2 (Kovarova y Draber 2000; Zhu et al., 2020).

En Colombia, al igual que otros países el diagnóstico de SARS-CoV-2 se realizó con el protocolo de la Organización Mundial de la Salud. Además, el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación (MINCIENCIAS) invitó a los grupos de investigación del país a participar en la convocatoria 1015 denominada “Mincienciatón” para generar propuestas científicas para mitigar los efectos del inicio de la pandemia generada por este virus en nuestro país.

Uno de los proyectos aprobados, fue el del grupo de investigación en el que estuvo vinculada esta pasantía, titulado: “Contribución al protocolo de diagnóstico del Coronavirus COVID-19 y del Virus de influenza A H1N1 por RT-PCR en tiempo real de un paso autorizado por la Organización Mundial de la Salud con la inclusión de genes marcadores requeridos para la infección viral y su validación por secuenciación genómica de nueva generación con la tecnología de concentraciones de nucleótidos”. Dentro de los objetivos del proyecto fue el demostrar que una solución cuya concentración de TEA y DMSO diseñada en función de la proporción nucleotídica del genoma de SARS-CoV-2 mejoraría la RT-qPCR de regiones diseñadas por el grupo y las regiones N1 y N2 propuesta en protocolo del CDC, a partir de muestras de hisopado nasofaríngeo o saliva con RT-PCR sencilla y en multiplex reportado en su momento (Kudo et al., 2020).

Los resultados confirmaron la hipótesis propuesta al mejorar los niveles de polimerización en muestras de hisopado nasofaríngeo (Cadena-Caballero et al., 2022). Sin embargo, en la búsqueda de formas menos invasivas para la obtención de la muestra a ser analizada o la generación de muestras agrupadas, la comunidad científica continuó estableciendo protocolos para

el uso de la saliva para purificar el ARN empleado en la RT-qPCR (Liu et al., 2023). Sin embargo, no se ha reportado el efecto del TEA y el DMSO en este tipo de ensayos para muestras de saliva.

En esta pasantía se evaluó la inclusión de una solución que contiene TEA y DMSO en la RT-qPCR individuales y RT-qPCR multiplex en muestras de saliva agrupadas, para las cuales previamente se determinó la presencia de SARS-CoV-2 con el protocolo de la OMS en la Colección de Muestras del Laboratorio Central de Investigaciones de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander, con el propósito de validar su efecto en la amplificación de SARS-CoV-2 por RT-qPCR de un paso con el protocolo del CDC.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Determinar el uso de la Solución Desnaturalizante para la identificación de SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR de un Paso en muestras de saliva.

1.2 Objetivos Específicos

Evaluar la identificación de SARS-CoV-2 en muestras de saliva mediante RT-qPCR individual de un Paso con la Solución Desnaturalizante y reactivos del kit 2019-nCoV TaqMan RT-PCR.

Evaluar la identificación de SARS-CoV-2 en muestras de saliva agrupadas mediante RT-qPCR multiplex de un Paso con la Solución Desnaturalizante y reactivos del kit 2019-nCoV TaqMan RT-PCR.

Competencias

2.1 Competencias Cognitivas

Aprende procedimientos de bioseguridad para trabajo en laboratorios de investigación con nivel de bioseguridad tipo 3.

Purifica ácidos nucleicos de muestras de saliva de pacientes con procedimientos robotizados sustentados en magnetismo.

Implementa RT-qPCR para la identificación de genes de SARS-CoV-2 en reacciones individuales y tipo Multiplex.

Interpreta resultados de termocicladores para RT-qPCR que muestran la polimerización de regiones genómicas de SARS-CoV-2.

Genera habilidades de razonamiento científico para la identificación de SARS-CoV-2 por RT-qPCR.

2.2 Competencias Actitudinales

Participa activamente en laboratorios de investigación para experimentos y reacciones a nivel molecular.

Desarrolla aprendizaje autónomo para el análisis de métodos de identificación genómica y molecular relacionada a SARS-CoV-2.

Genera actitudes éticas y bioéticas durante los procesos de la investigación científica y la transferencia de conocimientos.

Redacta informes de laboratorio para el análisis y discusión de resultados de la identificación de SARS-CoV-2 por RT-qPCR.

3. Metodología

3.1 Aspectos Éticos

Para la presente pasantía, la donación de las muestras del Laboratorio Central de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander y todos los procedimientos, se realizaron de acuerdo con las normas éticas de la Declaración de Helsinki, revisada en 2013 (World Medical Association, 2013). Esta pasantía se aprobó por el Comité de Ética de Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander en Acta N° 1 del 10 de febrero de 2023 para las muestras de saliva y en reunión virtual del 13 de abril de 2020 en Acta N° 5 para los procedimientos experimentales.

3.2 Extracción de muestras de saliva de SARS-CoV-2

De la colección de muestras de saliva del Laboratorio Central de Investigaciones de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander, se seleccionaron al azar 40 muestras positivas y 10 negativas a la identificación a SARS-CoV-2 con el protocolo de la Organización Mundial de la Salud, colectadas de enero a junio del 2022. Para la lisis celular y purificación del ARN total de cada muestra, la extracción se realizó a partir de 200 µL de cada una por medio de ruptura mecánica y separación con perlas magnéticas mediante el equipo ADN/ARN KingFisher Duo Prime (Catalog number: 5400110) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific - USA), mediante el kit MagMAX™ Viral/Pathogen II (MVP II - 2000 RXN - Applied Biosystems - USA).

Para la obtención del ARN total para la RT-qPCR multiplex se empleó el procedimiento antes indicado, pero se generaron 11 muestras agrupadas. Cada una contenía 20 µL de 10 muestras de saliva, cuya proporción se realizó en secuencia en cascada de muestras negativas (neg) vs positivas (pos) a SARS-CoV-2; con las proporciones: 10neg/0pos, 9neg/1pos, 8neg/2pos...

0neg/10pos. En tanto, la obtención del ARN total para la RT-qPCR individual se emplearon 200 μL de 20 muestras de saliva individual sin ningún tipo de combinación.

3.3 RT-qPCR individuales y multiplex para la detección de SARS-CoV-2

Con el fin de optimizar el uso de los reactivos del kit 2019-nCoV TaqMan RT-PCR (Ref. TM67100 - Norgen Biotek – Canadá) que emplea los cebadores y sondas de las regiones N1 y N2 del gen *N* empleado en el protocolo del CDC, se modificó de 20 a 15 μL el volumen final de reacción. Cada una contenía: 2 μL de ARN total, a los que se adicionaron 7.5 μL de 2x One-Step RT-PCR Master Mix; 1.2 μL por reacción de la mezcla de cebador y sonda para la región N1 o N2 nombradas en el kit como 2019-nCoV_Probe/Primer. Mientras que el ARNm control correspondió al ARNm de la RNase P. Se utilizaron los cebadores y sonda nombradas en el kit como Probe/Primer Mix y 4.3 μL agua libre de nucleasas.

A otro juego de reacciones se adicionaron los reactivos anteriores con 3.3 μL de agua libre de nucleasas, 0.5 μL de 636 mM de TEA (ABCAM-USA) y 0.5 μL de 423 mM DMSO (Scharlab-España) para una concentración final de reacción de 21.2 mM y 14.1 mM, respectivamente. Es de resaltar que esta combinación de reactivos químicos en la RT-qPCR se denominó solución desnaturalizante, como fue previamente reportado (Cadena-Caballero et al., 2022).

Para la RT-qPCR multiplex, se emplearon las mismas condiciones, pero el ARN correspondió al de cada pool antes indicado y el mismo volumen de N1 y N2 Probe/Primer. Las condiciones de todas las RT-qPCR correspondieron a las indicadas por el protocolo, a saber: 1 ciclo de 30 min a 50°C; un segundo ciclo de 3 minutos a 95°C; y 45 ciclos de 3 segundos a 95°C y 30 segundos a 55°C. La señal de fluorescencia se cuantificó en el sistema QuantStudio 1 (n.º A40427) en un bloque de 0,2 μL de 96 pocillos en el canal FAM (Thermo Fisher Scientific - USA).

3.4 Análisis estadístico

Se realizó una comparación de los valores de umbral de ciclos (Ct) entre cada protocolo estándar, a saber: N1, N2, RNaseP y multiplex N1/N2-Estándar y los protocolos con la Solución Desnaturalizante: N1-SD, N2-SD, RNase-SD y multiplex N1/N2-SD. Los valores de Ct se representaron con diagramas de cajas y se evaluó la prueba T (Test-T) para cada pareja de protocolos, es decir: N1-estandar y N1-SD, N2-Estándar y N2-SD, RNaseP-Estándar y RNaseP-SD, N1/N2-Estándar y N1/N2-SD. Todos los análisis estadísticos se realizaron en RStudio versión 2023.03.0+386 (Posit team, 2023), utilizando el software R versión 4.2.2 (R Core Team, 2022).

3.5 Patrón de hibridación entre las regiones N1 y N2 del protocolo del CDC respecto a secuencias genómicas consenso de SARS-CoV-2 del año 2021

Para analizar el patrón de homología de las sondas y cebadores N1 y N2 del kit del CDC para SARS-CoV-2, para el gen *N* de las variantes de SARS-CoV-2: Alfa, Beta, Delta, Gamma, GH490R, Lambda, Mu y Omicron. A partir de la base datos pública de secuencias genómicas de Sars CoV-2 reportada por Cadena-Caballero et al. (2023), se obtuvieron las respectivas secuencias consenso con umbrales de frecuencia del 20% y 100% del año 2021. Con estas, se realizaron los respectivos alineamientos con el software MEGA *V.11*, respecto a la secuencia de referencias de SARS-CoV-2 (Tamura et al., 2021). A partir del resultado anterior, se determinó el porcentaje de identidad y la cantidad cambios nucleótidos por sitio de acuerdo con la nomenclatura del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica (NC-IUB, 1986) con base a equivalencias para cada posición respecto a las regiones N1 y N2 del gen *N* de SARS-CoV-2.

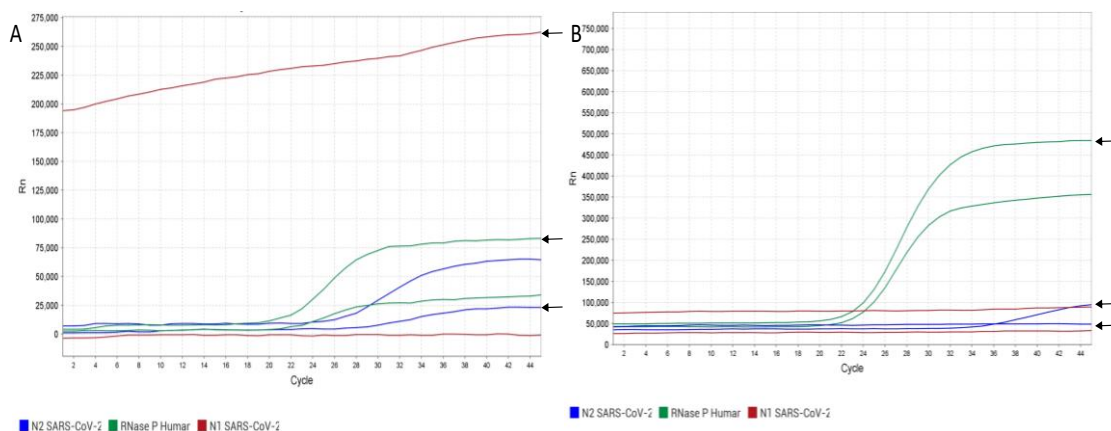
4. Resultados

4.1 RT-qPCR individuales y multiplex para la detección de SARS-CoV-2

El procedimiento automatizado de extracción de RNA generó 50 μ L de ARN total de cada una de las 20 muestras de saliva. La calidad de cada una de estas se determinó mediante las RT-qPCR individuales a partir de la amplificación de las regiones N1, N2 del gen *N* y el ARNm control de RNase P donde se determinó que todas generaron el resultado esperado y únicamente 2 muestras fueron negativas para la detección de N1 (Figura 3 y Apéndice A). Un aspecto sobresaliente de este resultado fue que las muestras que tuvieron la solución desnaturalizante mostraron diversos patrones de graficación de Ct; y en la muestra 1, aun cuando no se observó polimerización, la señal se determinó con la mayor cantidad de Ct, mientras que en la 17 ocurrió lo inverso. Además de que en las RT-qPCR de la región N2 y RNase P el resultado fue significativo (Figura 3 y Apéndice A).

Figura 3

Curvas de amplificación de muestras negativas a la amplificación de la región N1.



Nota. Las curvas de color rojo muestran la ausencia de señal en la reacción para la región N1 mientras que la amplificación de la región N2 y de la RNasa P es la esperada. El gráfico A y B corresponden a las muestras 1 y 17 respectivamente. Además, las flechas indican las RT-qPCR que contuvieron la Solución Desnaturalizante.

Los resultados en conjunto de las comparaciones de los valores de Ct de las RT-qPCR individuales para las regiones N1, N2 y RNase P graficados en las Figura 4A y B; muestran que los valores de Ct de N1-Estándar se observa un rango intercuartil entre 21-29. En cambio, en los valores de N1-SD se observa un rango intercuartil reducido entre 21-26 lo cual muestra una distribución de valores más bajos. El promedio de N1-Estándar fue de 24.80 y el N1-SD fue de 23.86. Por lo tanto, los resultados de las RT-qPCR individuales con uso de la SD pueden disminuir el número de ciclos necesarios para la detección N1 en comparación con el protocolo N1-Estándar (Figura 4A). Sin embargo, se evidenció un aumento de los valores de Ct en 6 muestras con la adición de la SD para la detección de N1 (Figura 4B, Apéndice B).

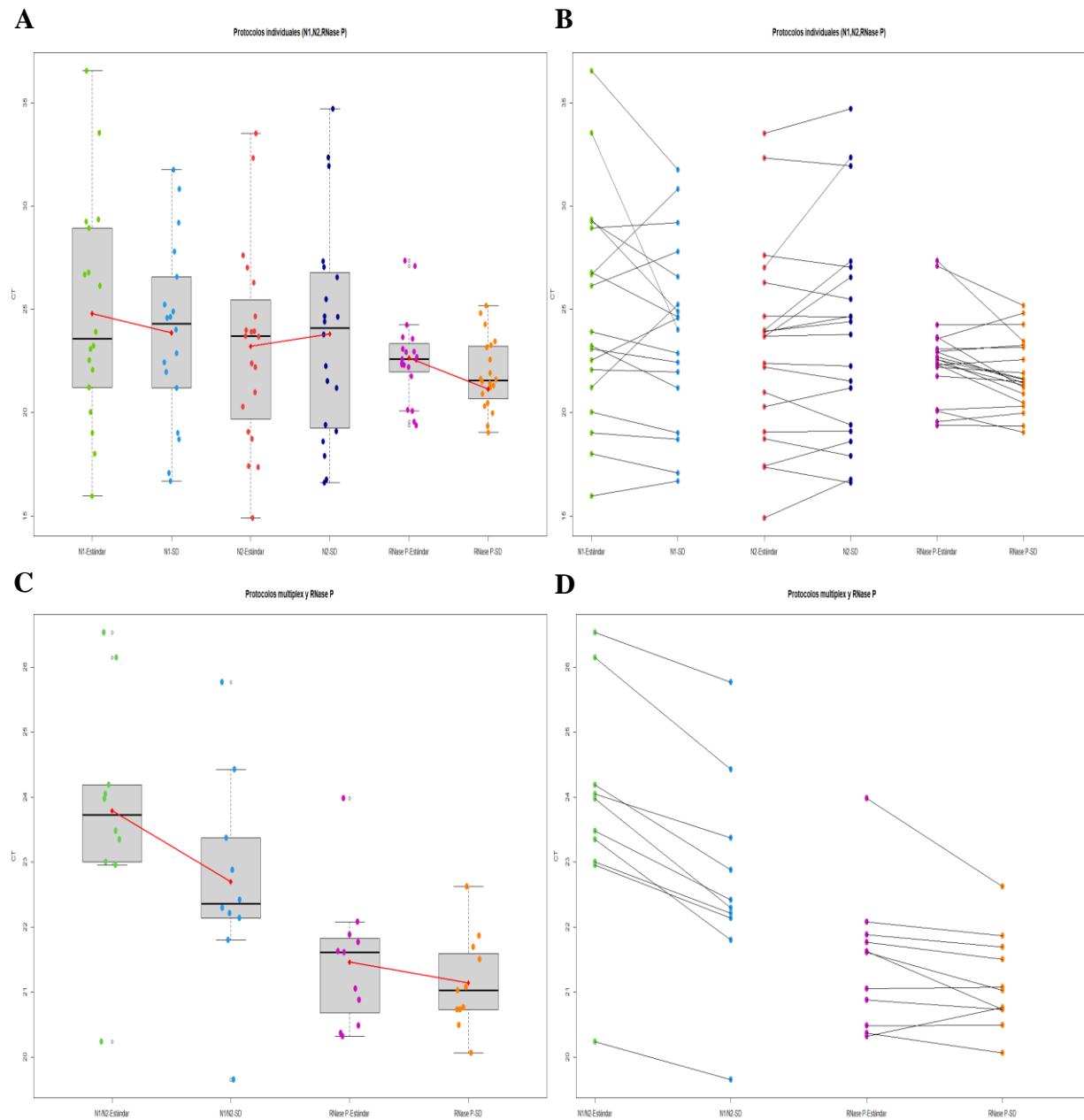
Las RT-qPCR individuales para la detección de N2 mostraron valores de Ct muy similares para los protocolos N2-Estándar y N2-SD. Sin embargo, el promedio de N2-Estándar fue 23.20 y el de N2-SD fue 23.82 lo que indica un ligero aumento en los valores de Ct de las RT-qPCR con el protocolo N2-SD (Figura 4A). Por lo anterior, la detección de N2 con la SD aumentó en los Ct en 10 muestras, de las cuales 2 también presentaron aumento en N1 y en RNase P.

En la detección del control los valores de Ct de los protocolos de RNase P, al comparar los primeros 2 cuartiles, se determinó que la distribución de los Ct con la RNase P-SD se encuentran por debajo de los Ct con la RNaseP-Estándar y sus promedios fueron 22.65 para la RNaseP-Estándar y 21.87 para RNase P-SD (Figura 4A).

Lo anterior evidencia que los valores de Ct del protocolo RNase P-SD fueron menores respecto a RNase P-Estándar. Pero, en 7 de las 20 muestras la detección de RNaseP con la SD mostró un aumento de Ct, en las cuales 2 aumentaron también en el protocolo N1-SD, 1 en el protocolo N2-SD y 2 aumentaron en los protocolos N1-SD, N2-SD y RNase P-SD (Apéndice B).

Figura 4

Comparaciones de los valores de CT de las RT-qPCR.



Nota. Gráficos de los valores de Ct de RT-qPCR individuales (A y B) y en multiplex (C y D) comparando entre los tratamientos Estándar y SD. El promedio de los valores de Ct de cada uno de los protocolos se muestran en los segmentos con puntos rojos en las gráficas A y D. Mientras que cada valor de Ct está emparejado por muestra entre sus 2 tratamientos con SD y Estándar. Los emparejamientos se muestran con segmentos negros en las gráficas B y D.

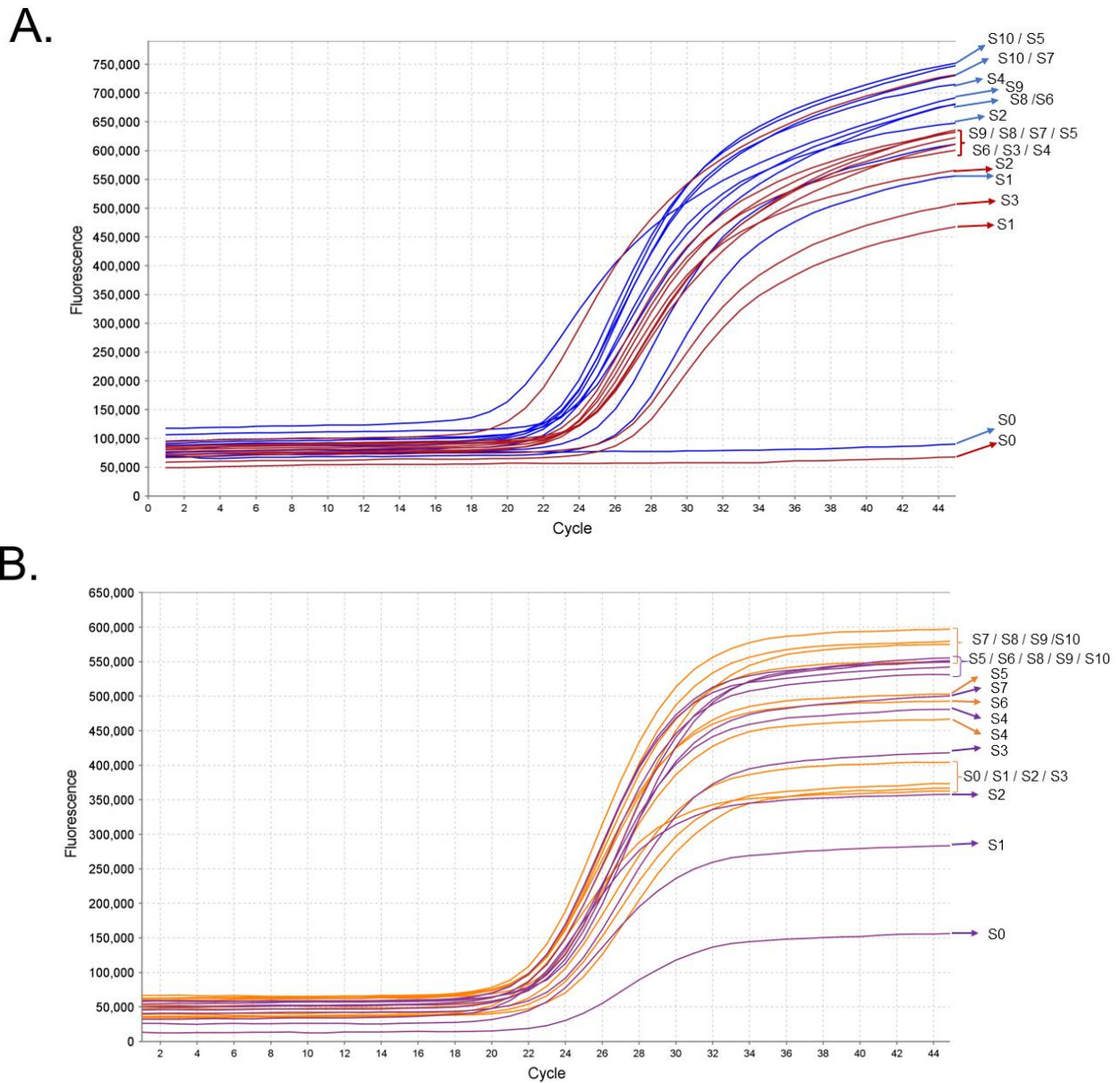
Las pruebas de las RT-qPCR multiplex para la detección de N1/N2 y el control RNaseP se realizaron a las 11 muestras agrupadas, de las cuales todas fueron positivas para N1/N2 y el control, a excepción de la muestra agrupada que contenía la proporción de 10neg/0pos ya que generó un resultado negativo para la detección de N1/N2 y positivo para el control de RNaseP.

Para los valores de Ct de las RT-qPCR multiplex de un paso se observa que todas las pruebas con N1N2-SD presentaron valores de Ct menor que las pruebas con N1N2-Estándar (Figura 2D). Además, se muestran en segmentos rojos el promedio de N1N2-Estándar 23.78 y para N1N2-SD 22.69 (Figura 4C); tanto para las reacciones multiplex como para sus controles con RNaseP, se evidencia una detección temprana y además de acuerdo con las curvas de amplificación para las RT-qPCR multiplex (Figura 4D), el tratamiento con la Solución Desnaturalizante también puede potenciar la amplificación total, ya que se obtuvieron valores de fluorescencia más altos en las pruebas RT-qPCR multiplex con los protocolos N1/N2-SD y RNase P-SD (Figura 5A y B).

A lo anterior las comparaciones realizadas con la Prueba T (Test-T) para los valores de CT de las RT-qPCR entre los tratamientos con SD y Estándar indicaron que no había diferencias significativas entre los protocolos con la SD y Estándar (Tabla 2).

Figura 5

Curvas de amplificación de las RT-qPCR multiplex con muestras de saliva agrupadas.



Nota. Gráficos de amplificación lineal (Fluorescencia vs ciclo). (A) Las líneas azules representan las pruebas con el protocolo N1/N2-SD y las rojas N1/N2-Estándar. (B) Los resultados de RNase P-SD se muestran en líneas naranjas y RNase P-Estándar en líneas púrpuras. Las flechas indican el número de muestras positivas presentes en cada reacción.

Tabla 2

Prueba T para comparar cada grupo de protocolos.

Protocolo	Promedio		Valor P
	Estándar	SD	
N1	24.80	23.86	0.572
N2	23.20	23.82	0.698
RNase P	22.65	21.87	0.204
N1/N2	23.78	22.69	0.165
RNase P (multiplex)	21.45	21.14	0.421

Nota. Valores obtenidos de la comparación entre cada tratamiento (SD y Estándar) para cada protocolo de detección. Para diferencias significativas entre las medias de 2 grupos P-valor <0.05.

4.2 Patrón de hibridación entre las regiones N1 y N2 del protocolo del CDC respecto a secuencias genómicas consenso de SARS-CoV-2 del año 2021

Las secuencias genómicas consensos del 20% de las variantes de SARS-CoV-2 presentaron un porcentaje de identidad mayor al 97.1% para N1 y para N2 un porcentaje de identidad del 100%. Mientras que las secuencias genómicas consensos del 100% presentaron un porcentaje de identidad entre 32% a 99% para N1 y para N2 entre 52% a 100% (Tabla 3).

De las variantes estudiadas, la variante Delta de SARS-CoV-2 presentó el menor porcentaje de identidad y la mayor cantidad de cambios nucleotídicos para las regiones de los Cebadores/Sondas de N1 y N2. Los análisis y cálculos para cada uno de los consensos de las variantes en las regiones de los Cebadores/Sondas de N1 y N2, están en Tabla 3 y Apéndice A.

Tabla 3*Porcentajes de identidad y número de cambios nucleotídicos por variantes.*

Tipo de Variante	N1				N2			
	Consenso 20%		Consenso 100%		Consenso 20%		Consenso 100%	
	ID (%)	Cambios en N1	ID (%)	Cambios en N1	ID (%)	Cambios en N2	ID (%)	Cambios en N2
Alfa	100	0	60.3	32	100	0	75.4	17
Beta	100	0	70.6	22	100	0	88.5	8
Delta 1	100	0	45.6	48	100	0	60.7	29
Delta 2	100	0	32.4	68	100	0	52.5	40
Gamma	100	0	98.5	1	100	0	100	0
GH490R	97.1	2	97.1	2	100	0	100	0
Lambda	98.5	1	92.6	5	100	0	98.4	1
Mu	100	0	73.5	20	100	0	78.7	13
Ómicron	98.5	1	97.1	2	100	0	100	0

Nota. Esta tabla muestra los cálculos del porcentaje de identidad (ID) y los cambios nucleotídicos para las variantes empleadas de SARS-CoV-2 del año 2021 respecto a las regiones de los cebadores/sondas para N1 y N2.

5. Discusiones

Desde el inicio de la pandemia por COVID-19 surgió el desafío a nivel mundial de diseñar protocolos para el diagnóstico e identificación de SARS-CoV-2, con el objetivo de que lo más importante era prevenir la propagación del virus para mitigar sus efectos. Por ende, se incentivó la implementación de métodos precisos, rápidos, y asequibles para todo el mundo (Dhar, 2022).

Por tal motivo desde la notificación del descubrimiento, el grupo CAGE participó con la implementación de mejoras en los sistemas de identificación del virus por RT-qPCR.

Por tal razón en este trabajo se evaluó e implementó una mejora al método antes citado por su sensibilidad y especificidad (Martín et al., 2021). Para verificar los resultados que se generaron por su implementación, se incluyó un análisis del patrón teórico de hibridación puesto que en una muestra de un paciente se desconoce qué tipo de variante de SARS-CoV-2 además de sus genomas canónicos o no canónicos y las estructuras secundarias que puedan formar (Cadena –Caballero et al., 2022). Dicho análisis permitió obtener información importante sobre la pérdida de los sitios de hibridación específicos de los cebadores/sondas N1 y N2 para cada variante de SARS-CoV-2. Lo anterior permitió establecer que la región N1 presentó mayor variabilidad y cantidad de cambios en comparación con la región N2 de SARS-CoV-2 para el año 2021. Lo cual indica que los métodos enfocados en la detección de la región N1 tendrían una alta probabilidad de generar resultados falsos negativos en RT-qPCR.

También se evidenció que la variante Delta de SARS-CoV-2 presentó una mayor cantidad de cambios de nucleótidos para las regiones de los Cebadores/Sondas de N1 y N2. Es decir, la variante Delta estaría perdiendo los sitios de reconocimiento específico de los cebadores/sondas N1 y N2. Por tanto, las detecciones enfocadas a regiones gen *N* como el protocolo del CDC,

deberían ser actualizadas, si se tiene en cuenta que la evolución del genoma viral de variantes como Delta generarían posibles falsos negativos para RT-PCR en regiones del gen *N*.

Acorde a lo anterior y a los resultados obtenidos con el par de muestras evaluadas con RT-qPCR individual que no amplificaron la región N1, pero sí amplificaron la región N2 y la RNase P; se debe al patrón de mutación antes mencionado, el cual afectó la hibridación en alguno de los cebadores o sondas, lo que generó 2 falsos negativos para la detección de N1.

Por ende, se razonó que en los casos de las RT-qPCR en los que aumentaron los valores de Ct individual en muestras identificadas con el protocolo que incluyó la solución con los reactivos desnaturalizantes para las estructuras Tallo burbuja en el ARN de la muestra, se pueden dar por las características intrínsecas de esta y por ende no se forman varias estructuras secundarias para establecer diferencias significativas.

Se destaca que el uso de la Solución Desnaturalizante mejoró el rendimiento de las RT-qPCR multiplex en las 11 muestras de saliva agrupadas, ya que tanto los valores de Ct como la señal fluorescente fueron óptimos en comparación con las reacciones que no contenían la solución desnaturalizante.

De manera general, los resultados mostraron que la inclusión de la solución mejora el rendimiento de la RT-qPCR de un paso en muestras de saliva. Lo cual sugiere el efecto del TEA y del DMSO sobre los enlaces de puentes de hidrógeno formados por los ácidos nucleicos de la región a amplificar del genoma de SARS-CoV-2, cuyo principio ya fue demostrado de forma general (Kovarova y Draber 2000). Por lo tanto, el uso de ambos reactivos contribuirá a mejorar la identificación viral en las muestras de saliva como se demostró con las de hisopado nasofaríngeo, al participar en la hibridación, lo que facilitará el reconocimiento específico de los cebadores (Cadena-Caballero et al 2022).

Por lo anterior y con los resultados obtenidos se puede sugerir como se ha propuesto por otros autores (Jiang et al., 2022) que, para el diagnóstico e identificación viral, es fundamental tener el conocimiento genómico del virus y constantemente actualizar los estudios sobre la variabilidad de genomas para mejorar el reconocimiento de nuevas variantes emergentes. Además, es importante considerar el patrón mutacional en las regiones donde ocurrirá la hibridación de los cebadores y sonda con su región blanco (Amato et al., 2021).

6. Conclusiones

1. El sistema automatizado de extracción de ARN total en muestras de saliva genera purificaciones pertinentes para ser empleadas en el diagnóstico de SARS-CoV-2 por RT-qPCR de un paso

2. La inclusión de la Solución Desnaturalizante compuesta por TEA y DMSO cuya concentración está en función de la proporción nucleotídica del genoma SARs-CoV-2 en la prueba de diagnóstico de RT-qPCR de un paso autorizado por el CDC permite una mejoría en la amplificación de los ácidos nucleicos de las regiones del gen *N* a partir de muestras de saliva.

3. La generación de agrupación de muestras de saliva en RT-qPCR de un paso en multiplex con la Solución Desnaturalizante mejora significativamente la cantidad de Ct de la reacción.

4. La validación *in silico* de los resultados de RT-qPCR de un paso mediante el patrón teórico de hibridación cebadores-sonda- región blanco con diferentes parámetros de umbrales de frecuencia permitirá una mejor vigilancia genómica de las variantes de SARS-CoV-2.

7. Recomendaciones

Actualizar los cebadores y sondas del protocolo de SARS-CoV-2 del kit del CDC y otros, previo análisis *in silico* de los patrones de hibridación con las regiones blanco.

Continuar con la constante actualización de bases de datos de genomas de SARS-CoV-2 para determinar la eficiencia de los kits empleados en el diagnóstico por RT-qPCR de un paso.

Referencias Bibliográficas

- Adil, M. T., Rahman, R., Whitelaw, D., Jain, V., Al-Ta'an, O., Rashid, F., Munasinghe, A., & Jambulingam, P. (2021). SARS-CoV-2 and the pandemic of COVID-19. *Postgraduate medical journal*, 97(1144), 110–116. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2020-138386>.
- Amato, L., Jurisic, L., Puglia, I., Di Lollo, V., Curini, V., Torzi, G., Di Girolamo, A., Mangone, I., Mancinelli, A., Decaro, N., Calistri, P., Di Giallonardo, F., Lorusso, A., D'Alterio, N. (2021). Multiple detection and spread of novel strains of the SARS-CoV-2 B.1.177 (B.1.177.75) lineage that test negative by a commercially available nucleocapsid gene real-time RT-PCR. *Emerg Microbes Infect*, 10(1):1148-1155. doi: 10.1080/22221751.2021.1933609.
- Bao, C., Zhu, M., Nykonchuk, I., Wakabayashi, H., Mathews, D. H., & Ermolenko, D. N. (2022). Specific length and structure rather than high thermodynamic stability enable regulatory mRNA stem-loops to pause translation. *Nature Communications*, 13(1), 988.
- Benevides Lima, L., Mesquita, F. P., Brasil de Oliveira, L. L., Andréa da Silva Oliveira, F., Elisabete Amaral de Moraes, M., Souza, P. F. N., & Montenegro, R. C. (2022). True or false: what are the factors that influence COVID-19 diagnosis by RT-qPCR? *Expert review of molecular diagnostics*, 22(2), 157–167. <https://doi.org/10.1080/14737159.2022.2037425>.
- Cadena-Caballero, C. E., Vera-Cala, L. M., Barrios-Hernandez, C., Rueda-Plata, D., Forero-Buitrago, L. J., Torres-Jimenez, C. S., ... & Martinez-Perez, F. (2022). Denaturing and dNTPs reagents improve SARS-CoV-2 detection via single and multiplex RT-qPCR. *F1000Research*, 11(331), 331.
- Cadena-Caballero CE, Navarro-Corredor MA, Vera-Cala LM et al. (2023). dNTPs and adjuvant reagent solutions in 3' RACE improve the characterization of noncanonical RNA SARS-CoV-2 genomes [Data set]. *Zenodo*, Version 1, 1–4. <https://doi.org/10.5281/zenodo.8247578>

- Condé, L., Allatif, O., Ohlmann, T., & de Breyne, S. (2022). Translation of SARS-CoV-2 gRNA Is Extremely Efficient and Competitive despite a High Degree of Secondary Structures and the Presence of an uORF. *Viruses*, 14(7), 1505. <https://doi.org/10.3390/v14071505>.
- Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Schmidt, M. L., Mulders, D. G., Haagmans, B. L., van der Veer, B., van den Brink, S., Wijsman, L., Goderski, G., Romette, J. L., Ellis, J., Zambon, M., Peiris, M., ... Drosten, C. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 25(3), 2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>.
- Dhar, B. C. (2022). Diagnostic assay and technology advancement for detecting SARS-CoV-2 infections causing the COVID-19 pandemic. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 414(9), 2903-2934. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-03918-7>
- Dhibika, M., Madhusudhan, N. S., Malini, A., & Natarajan, M. (2023). Comparison of Manual and Automated Nucleic Acid (RNA) Extraction Methods for the Detection of SARS-CoV-2 by qRT-PCR. *Cureus*, 15(3), e36773. <https://doi.org/10.7759/cureus.36773>.
- Dutta, D., Naiyer, S., Mansuri, S., Soni, N., Singh, V., Bhat, K. H., Singh, N., Arora, G., & Mansuri, M. S. (2022). COVID-19 Diagnosis: A Comprehensive Review of the RT-qPCR Method for Detection of SARS-CoV-2. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 12(6), 1503. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12061503>.
- Guaman-Bautista, L. P., Moreta-Urbano, E., Oña-Arias, C. G., Torres-Arias, M., Kyriakidis, N. C., Malcı, K., Jonguitud-Borrego, N., Rios-Solis, L., Ramos-Martinez, E., López-Cortés, A., & Barba-Ostria, C. (2021). Tracking SARS-CoV-2: Novel Trends and Diagnostic Strategies. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 11(11), 1981. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11111981>.

- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z. L. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature reviews. Microbiology*, 19(3), 141–154. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>.
- Jiang W, Ji W, Zhang Y, Xie Y, Chen S, Jin Y, Duan G. An Update on Detection Technologies for SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Viruses*. 2022 Oct 22;14(11):2324. doi: 10.3390/v14112324. PMID: 36366421
- Karlafti, E., Tsavdaris, D., Kotzakioulafi, E., Kaiafa, G., Savopoulos, C., Netta, S., Michalopoulos, A., & Paramythiotis, D. (2023). The Diagnostic Accuracy of SARS-CoV-2 Nasal Rapid Antigen Self-Test: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Life (Basel, Switzerland)*, 13(2), 281. <https://doi.org/10.3390/life13020281>.
- Kelly, J. A., Olson, A. N., Neupane, K., Munshi, S., San Emeterio, J., Pollack, L., Woodside, M. T., & Dinman, J. D. (2020). Structural and functional conservation of the programmed -1 ribosomal frameshift signal of SARS coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *The Journal of biological chemistry*, 295(31), 10741–10748. <https://doi.org/10.1074/jbc.AC120.013449>.
- Konings, F., Perkins, M. D., Kuhn, J. H., Pallen, M. J., Alm, E. J., Archer, B. N., Barakat, A., Bedford, T., Bhiman, J. N., Caly, L., Carter, L. L., Cullinane, A., de Oliveira, T., Druce, J., El Masry, I., Evans, R., Gao, G. F., Gorbalenya, A. E., Hamblion, E., Herring, B. L., ... Van Kerkhove, M. D. (2021). SARS-CoV-2 Variants of Interest and Concern naming scheme conducive for global discourse. *Nature microbiology*, 6(7), 821–823. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00932-w>.
- Kovárová, M., & Dráber, P. (2000). New specificity and yield enhancer of polymerase chain reactions. *Nucleic acids research*, 28(13), E70. <https://doi.org/10.1093/nar/28.13.e70>.
- Kudo, E., Israelow, B., Vogels, C. B. F., Lu, P., Wyllie, A. L., Tokuyama, M., Venkataraman, A., Brackney, D. E., Ott, I. M., Petrone, M. E., Earnest, R., Lapidus, S., Muenker, M. C., Moore, A. J., Casanovas-Massana, A., Yale IMPACT Research Team, Omer, S. B., Dela Cruz, C. S.,

- Farhadian, S. F., Ko, A. I., ... Iwasaki, A. (2020). Detection of SARS-CoV-2 RNA by multiplex RT-qPCR. *PLoS biology*, 18(10), e3000867. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000867>.
- Lim, H. J., Jung, H. S., Park, M. Y., Baek, Y. H., Kannappan, B., Park, J. Y., Yang, J. H., Seol, J. H., Lee, M. W., Jung, S. K., Lee, S. H., Park, J. E., & Yang, Y. J. (2022). Evaluation of Three Automated Extraction Systems for the Detection of SARS-CoV-2 from Clinical Respiratory Specimens. *Life (Basel, Switzerland)*, 12(1), 68. <https://doi.org/10.3390/life12010068>.
- Liu, Y., Kumblathan, T., Tao, J., Xu, J., Feng, W., Xiao, H., Hu, J., Huang, C. V., Wu, Y., Zhang, H., Li, X. F., & Le, X. C. (2023). Recent advances in RNA sample preparation techniques for the detection of SARS-CoV-2 in saliva and gargle. *Trends in analytical chemistry: TRAC*, 165, 117107. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117107>.
- Martín, J., Tena, N., & Asuero, A. G. (2021). Current state of diagnostic, screening and surveillance testing methods for COVID-19 from an analytical chemistry point of view. *Microchemical Journal*, 167, 106305. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106305>
- Nakagawa, S., & Miyazawa, T. (2020). Genome evolution of SARS-CoV-2 and its virological characteristics. *Inflammation and regeneration*, 40, 17. <https://doi.org/10.1186/s41232-020-00126-7>.
- Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB). (1986). Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences: recommendations 1984. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 4-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.1.4>.
- Plant, E. P., Pérez-Alvarado, G. C., Jacobs, J. L., Mukhopadhyay, B., Hennig, M., & Dinman, J. D. (2005). A three-stemmed mRNA pseudoknot in the SARS coronavirus frameshift signal. *PLoS biology*, 3(6), e172. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030172>.

- Posit team. (2023). RStudio: Integrated Development Environment for R [Software]. Posit Software, PBC. <http://www.posit.co/>
- R Core Team. (2022). R: A Language and Environment for Statistical Computing [Software]. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Stadnytskyi, V., Anfinrud, P., & Bax, A. (2021). Breathing, speaking, coughing or sneezing: What drives transmission of SARS-CoV-2?. *Journal of internal medicine*, 290(5), 1010–1027. <https://doi.org/10.1111/joim.13326>.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular biology and evolution*, 38(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- Thom, R. E., Eastaugh, L. S., O'Brien, L. M., Ulaeto, D. O., Findlay, J. S., Smither, S. J., Phelps, A. L., Stapleton, H. L., Hamblin, K. A., & Weller, S. A. (2021). Evaluation of the SARS-CoV-2 inactivation efficacy associated with buffers from three kits used on high-throughput rna extraction platforms. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 716436. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.716436>.
- Verma, R., Saha, S., Kumar, S., Mani, S., Maiti, T. K., & Surjit, M. (2021). RNA-Protein Interaction Analysis of SARS-CoV-2 5' and 3' Untranslated Regions Reveals a Role of Lysosome-Associated Membrane Protein-2a during Viral Infection. *mSystems*, 6(4), e0064321. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00643-21>.
- World Medical Association (2013). World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*, 310(20), 2191–2194. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.281053>.

Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F., Tan, W., & China Novel Coronavirus Investigating and Research Team (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *The New England journal of medicine*, 382(8), 727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>.

Apéndices

Apéndice B. Análisis del patrón de hibridación.

Apéndice B. Hojas de cálculos con los resultados de las RT-qPCR.

Apéndice C. Archivos con el análisis estadístico y diseño de gráficos en R.