

RT-qPCR Testing of SARS-CoV-2: A Primer

Stephen A. Bustin ^{1,*} and Tania Nolan ^{2,3}

¹ Medical Technology Research Centre, Faculty of Health, Education, Medicine and Social Care, Anglia Ruskin University, Chelmsford, Essex CM1 1SQ, UK

² Institute of Population Health, Faculty of Medical and Human Sciences, University of Manchester; Manchester M13 9NT, UK; tanianolan@btinternet.com

³ The Gene Team, Bury St Edmunds, Suffolk IP31 1AA, UK

* Correspondence: Stephen.bustin@aru.ac.uk or Stephen.bustin@gmail.com

Received: 13 April 2020; Accepted: 23 April 2020; Published: 24 April 2020

Publicado en International Journal of Molecular Sciences

Resumen: La prueba de la presencia de coronavirus es una herramienta de diagnóstico esencial para el seguimiento y manejo de la pandemia actual de COVID-19. La única prueba confiable en uso actual para pruebas agudas se dirige al genoma del SARS-CoV-2, y el método más utilizado es el cuantitativo. Por la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa basada en fluorescencia (RT-qPCR).

El SARS-CoV-2 fue identificado definitivamente por los CDC chinos como el agente causante de COVID-19 (neumonía atípica) y su secuencia genómica (número de acceso de GenBank MN908947) estaba disponible el 10 de enero

Existe una cantidad significativa de incertidumbre sobre cómo funciona esta prueba, el rendimiento

potencial y fiabilidad. Esto ha resultado en una tergiversación generalizada de los problemas que se enfrentan al utilizar esta prueba durante la actual epidemia de COVID-19.

Este manual proporciona información simple, directa e imparcial sobre RT-qPCR.

Se puede cuantificar, si se establecen los parámetros de ensayo adecuados y se incluyen controles [5].

El ciclo de cuantificación (Cq) está en el corazón de la precisión y reproducibilidad de la cuantificación.

el menor número de ciclos que se necesita para alcanzar un punto en el que la señal fluorescente se registra como estadísticamente significativo por encima del fondo. Este punto se define como Cq y siempre ocurre durante la fase exponencial de amplificación.

En última instancia, la confiabilidad de los resultados de RT-qPCR depende de la estandarización de mediciones [7], especialmente cuando se utiliza como herramienta de diagnóstico.

los valores de Cq están sujetos a variaciones inherentes entre ejecuciones [6] y no debe utilizarse sin los estándares de calibración adecuados [5].

Una forma imprescindible de lograr una cuantificación confiable es incluir una molécula de ARN de número de copias conocido como un pico de ARN. (lo que los CDC reconocen no tener)

Está clara la necesidad de ser capaz de comparar los resultados de una amplia gama de pruebas, instrumentos, diferentes laboratorios y diferentes países hace que sea fundamental desarrollar materiales de referencia, que en última instancia serían certificados, para permitir la armonización de datos después de la extracción. Esto permitiría tanto una medida de control de calidad, como cualquier desviación del El Cq esperado

Sin embargo, es importante recordar que la validación y verificación de los flujos de trabajo del laboratorio, y garantizar su cumplimiento con las normas internacionales, son componentes esenciales de la seguridad y de realización de

pruebas de diagnóstico molecular fiables. Ayudan a garantizar la comparabilidad y minimizan el riesgo de falsos informes.

Sin embargo, la velocidad y escala de la epidemia de COVID-19 ha dado como resultado una relajación de las normas estrictas que rigen los procedimientos llevados a cabo en laboratorios de diagnóstico clínico acreditados y otros, con la FDA abriendo un proceso de autorización de uso de emergencia para el desarrollo de ensayos regulados en la emergencia actual. Claramente, una consideración primordial para usar cualquier prueba nueva o modificada es informar con precisión y sensibilidad, reduciendo el riesgo de registrar resultados falsos positivos o falsos negativos.

Existe una necesidad urgente de generar estándares mínimos de validación y reporte, un proceso que está en curso por el Grupo de Trabajo de Estándares de Coronavirus, lanzado por la Iniciativa Conjunta para la Metrología en Biología

<https://jimb.stanford.edu/covid-19-standards>).

Ciertamente, la inclusión de conocidos negativos

y las muestras de control positivo con cada ejecución de prueba es un parámetro de control de calidad esencial

. También se ha hecho evidente que algunos kits de prueba comerciales y sondas y cebadores en particular, se han contaminado con secuencias de SARS-CoV-2, con importantes implicaciones para la detección de falsos positivos.

Hoy hay estándares desarrollados por la Organización Internacional de Normalización, incluida la serie 20166, que están diseñados específicamente para exámenes de diagnóstico molecular in vitro, así como estándares como ISO 20395: 2019, que enumera los requisitos para evaluar el desempeño de la cuantificación, métodos para secuencias diana de ácidos nucleicos con respecto a qPCR y dPCR. El objetivo de estos estándares es reducir el impacto de factores externos en los resultados de los exámenes, asegurando así que los pacientes obtienen diagnósticos lo más objetivos posible.

Estos son los cebadores y la sonda específicos del SARS-CoV-2, que deben ser 100% específico para el virus y, por lo tanto, amplifica solo las secuencias virales.

Los cebadores son el componente más crítico de un ensayo de RT-qPCR confiable, ya que sus propiedades controlan la exquisita especificidad y sensibilidad que hacen que este método sea excepcionalmente poderoso [19]

Hay varias regiones genómicas virales a las que se dirigen los ensayos RT-qPCR, y múltiples diseños de cebadores dirigidos a los mismos genes. Estos incluyen el gen RdRP (dependiente de ARN polimerasa), el gen E (gen de la proteína de la envoltura) y el gen N (proteína de la nucleocápside)

Es importante señalar que dos conjuntos diferentes de cebadores pueden ser 100% específicos para su objetivo, pero muestran diferentes eficiencias de amplificación y, por lo tanto, dan lugar a diferentes sensibilidades del ensayos [20].

Conclusiones

Los programas de pruebas de RT-qPCR para el SARS-CoV-2 son totalmente inadecuados, están mal organizados y rodeados de confusión y desinformación.

La disponibilidad no obstaculiza las pruebas exhaustivas de ensayos, reactivos, equipo o capacidad de prueba adecuados.

Son los retrasos en la validación burocrática y el proceso de aprobación y la falta de participación del proveedor de servicios comerciales y de investigación más amplio que la comunidad de los laboratorios de salud pública los que están en el centro de la incertidumbre de las pruebas.

Por ahora, el grupo de trabajo de estándares de Coronavirus (<https://jimb.stanford.edu/covid-19-standards>), liderado por la Iniciativa Conjunta para Metrología en Biología, está desarrollando un conjunto de directrices para garantizar la disponibilidad de estándares, controles, pruebas de validación y protocolos comunes y apropiados que son esenciales para la precisión de los resultados de las pruebas.