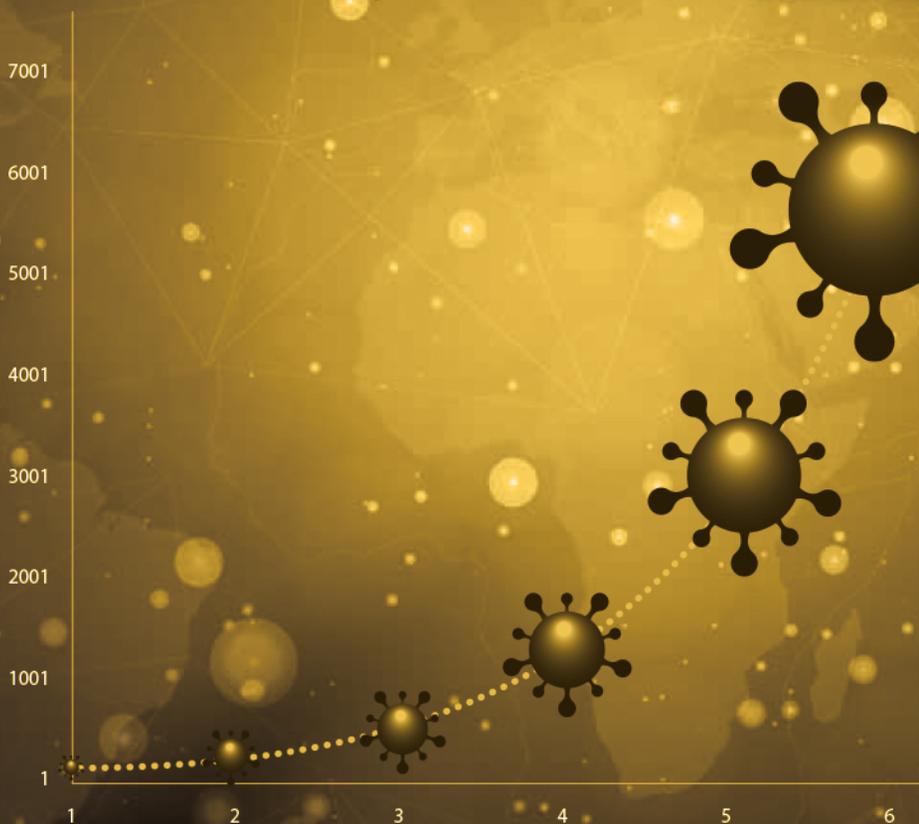


INVESTIGACIÓN Y METRÍA DE LA INFORMACIÓN SOBRE COVID-19: diversos enfoques de la pandemia

Salvador Gorbea Portal
Maricela Piña Pozas

(COORDINADORES)

$$y = ae^{bx}$$



$$\lambda = \frac{\beta(\chi I_{Ga} + I_{Ap} + I_{As} + I_{Hp} + I_{Hs})}{N}$$



Z669.8
I59

Investigación y metría de la información sobre COVID-19 :
diversos enfoques de la pandemia / Coordinadores Salva-
dor Gorbea-Portal, Maricela Piña-Pozas. – México : UNAM.
Instituto de Investigaciones Bibliotecológicas y de la In-
formación : Instituto Nacional de Salud Pública, 2021.

xxii, 427 p. – (Metría de la información y del
conocimiento científico)

ISBN:

1. Bibliometría. 2. COVID- 19 - Investigación. 3. COVID- 19
- Aspectos sociales. 4. Pandemia de COVID-19, 2020-. I.
Gorbea Portal, Salvador, coordinador. II. Piña Pozas, Ma-
ría Maricela, coordinadora. III. Ser.

Diseño de portada: Mario Ocampo Chávez

Primera edición: agosto de 2021

D.R. © UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Ciudad Universitaria, 04510, Ciudad de México

Impreso y hecho en México

ISBN:

Publicación dictaminada

Impreso y hecho en México

SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



Instituto Nacional
de Salud Pública

SECRETARÍA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

Contenido

| | |
|--------------------------------|------|
| Prólogo..... | xi |
| JUAN ÁNGEL RIVERA DOMMARCO | |
| Prefacio | xvii |
| GEORGINA ARACELI TORRES VARGAS | |
| Introducción | xix |
| SALVADOR GORBEA-PORTAL | |
| MARICELA PIÑA-POZAS | |

PRIMERA PARTE. INVESTIGACIONES CLÍNICAS Y DE SALUD PÚBLICA SOBRE LA COVID-19

| | |
|--|----|
| Desarrollo y validación de un ensayo RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico del SARS-CoV-2 en Puerto Rico y Estados Unidos | 3 |
| ERNESTO C. GONZÁLEZ | |
| IVELISSE MARTIN | |
| Modelación matemática en medidas de mitigación para la epidemia de COVID-19 | 25 |
| ROBERTO A. SAENZ | |
| Variación en la respuesta al SARS-CoV-2: un enfoque genético y cardiovascular | 45 |
| ROCÍO GÓMEZ | |
| ¿Medidas generalizadas o focalizadas? Del confinamiento social al uso de cubrebocas e inmunidad de rebaño en México y en el mundo..... | 75 |
| DIANA PALAMI ANTUNEZ | |
| PERLA RÍOS VILLALBA | |

| | |
|---|-----|
| Alteraciones de la Respuesta Inmune en COVID-19 | 111 |
| EMMA S. CALDERÓN-ARANDA | |
| NORMA A. CALDERÓN-PADILLA | |
| VANESSA C. SÁNCHEZ-ESCALANTE | |

| | |
|--|-----|
| Nutrición y modulación del sistema inmune frente a COVID-19..... | 137 |
| ESTHER ALHELÍ HERNÁNDEZ TOBIÁS | |

SEGUNDA PARTE.
ESTUDIOS MÉTRICOS DE LA INFORMACIÓN
Y REVISIONES SISTEMÁTICAS

| | |
|---|-----|
| Crecimiento de la producción científica y de su impacto sobre la COVID-19 | 161 |
| SALVADOR GORBEA-PORTAL | |
| MARICELA PIÑA-POZAS | |

| | |
|--|-----|
| Multidisciplinariedad de la producción científica sobre COVID-19: estudio bibliométrico comparativo de enfermedades pandémicas | 199 |
| RICARDO ARENCIBIA-JORGE | |
| MARÍA DE LOURDES GARCÍA-GARCÍA | |
| ERNESTO GALBÁN-RODRÍGUEZ | |
| HUMBERTO CARRILLO-CALVET | |

| | |
|---|-----|
| Prioridades científicas de las naciones ante el COVID-19..... | 225 |
| DARLENIS HERRERA VALLEJERA | |
| YANIRIS RODRÍGUEZ SÁNCHEZ | |

| | |
|--|-----|
| Preparación y respuesta del sistema de investigación de México ante la pandemia por la enfermedad COVID-19. Un análisis desde los estudios métricos..... | 259 |
| YOSCELINA IRAIDA HERNÁNDEZ GARCÍA | |
| MÓNICA ANZALDO MONTOYA | |

| | |
|---|-----|
| Incremento de la conducta suicida durante la pandemia COVID-19: revisión rápida..... | 281 |
| ROSARIO VALDEZ SANTIAGO MARICELA PIÑA-POZAS ERÉNDIRA MARÍN MENDOZA VANIA MARTÍNEZ GUZMÁN MARÍA ANTONIETA CHAGOYÁN SÁNCHEZ | |
| Uso, efectividad y evidencia de las Medicinas Complementarias para el COVID-19 | 311 |
| VICTORIA SANDOVAL-ESLAVA | |

TERCERA PARTE.
 ASPECTOS SOCIALES RELACIONADOS
 CON LOS EFECTOS DE LA PANDEMIA

| | |
|--|-----|
| Comunicación de riesgos en el regreso a la nueva normalidad durante la pandemia de COVID-19 en México..... | 343 |
| GUADALUPE RODRÍGUEZ-OLIVEROS BRENDA NATHALY GUZMAN VALENCIA EDWARD A. FRONGILLO | |
| Resiliencia en la nueva normalidad: aprender a convivir con la COVID-19 | 373 |
| LORENA ELIZABETH CASTILLO CASTILLO LAURA MAGAÑA VALLADARES | |
| Educación superior en el medio rural y COVID-19 | 395 |
| NOELIA RODRÍGUEZ PIÑA | |
| Retos de la enseñanza superior a distancia durante la pandemia por COVID-19. Ventajas, desventajas, experiencias | 413 |
| MARÍA DE LA LUZ ARENAS SORDO | |

Desarrollo y validación de un ensayo RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico del SARS-CoV-2 en Puerto Rico y Estados Unidos

ERNESTO C. GONZÁLEZ

GK Pharmaceuticals Contract Manufacturing Operations LLC, Puerto Rico

IVELISSE MARTIN

*GK Pharmaceuticals Contract Manufacturing Operations LLC;
Laboratorio Clínico Martin, Puerto Rico*

INTRODUCCIÓN

La pandemia mundial causada por el coronavirus de tipo 2, responsable del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2, siglas en inglés), y la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) han causado más de 27 millones de infecciones y han provocado la muerte de más 900 000 personas, mientras continuamos observando la extensión del virus alrededor del mundo (WHO 2020).

En ausencia de vacunas específicas o de terapias eficaces para el tratamiento de COVID-19, la mejor manera de prevenir la enfermedad es evitar la exposición al virus. El establecimiento de protocolos por parte de los sistemas de salud pública para la prevención de la infección con el virus, en los cuales se incluyen medidas de rastreo y aislamiento de contactos, es actualmente la mejor alternativa para detener la transmisión. Para el adecuado funcionamiento de estos protocolos, es necesario contar con pruebas de diagnóstico rápidas y precisas que puedan ser utilizadas de manera generalizada en las poblaciones afectadas.

Actualmente, en Puerto Rico se están realizando dos tipos de pruebas de laboratorio. La primera prueba es serológica, comúnmente conocida como prueba rápida. Ésta detecta la presencia de anticuerpos

en la sangre contra el COVID-19 que se generan como parte de la respuesta inmune del cuerpo a la presencia del virus. Sin embargo, esta prueba no es considerada una herramienta diagnóstica única para el COVID-19, por lo que se requiere hacer una prueba molecular para confirmar el diagnóstico de la enfermedad. La prueba molecular detecta la presencia del virus en el organismo humano, por lo que se considera como la herramienta más certera para determinar si existe una infección activa del coronavirus.

Dentro de los esfuerzos a nivel mundial para contar con pruebas de diagnóstico molecular, la detección del SARS-CoV-2 por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (RT-PCR) se ha convertido en una herramienta imprescindible para el diagnóstico clínico del COVID-19.

El alza de contagios y la falta de disponibilidad de reactivos para realizar las pruebas de diagnóstico molecular del coronavirus ha sido un problema recurrente en Puerto Rico desde el inicio de la pandemia. Por ello, nuestro grupo de trabajo se dio a la tarea de desarrollar en corto tiempo una metodología simple para la detección de SARS-CoV-2 en muestras respiratorias de vías altas, como una alternativa que podría ser empleada en laboratorios clínicos de Puerto Rico y Estados Unidos. El presente trabajo expone los principales resultados de este esfuerzo.

METODOLOGÍA

Prueba diagnóstica GK ACCU-RIGHT SARS-CoV-2 RT-PCR

El GK ACCU-RIGHT SARS-CoV-2 RT-PCR es un ensayo molecular para la detección cualitativa de ARN del virus SARS-CoV-2 en muestras de las vías respiratorias superiores (hisopos nasofaríngeos u orofaríngeos, de cornete medio y nasales) extraídas de individuos sospechosos de padecer el COVID-19.

La prueba desarrollada, tomando como referencia el procedimiento descrito inicialmente por el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, siglas en inglés) de los Estados Unidos (CDC

2020), se presenta en un formato de 1 000 reacciones de RT-PCR, y está constituida por seis reactivos fundamentales (*Tabla 1*).

Tabla 1. Reactivos de la prueba diagnóstica GK ACCU-RIGHT SARS-CoV-2 RT-PCR

| GK ACCU-RIGHT SARS-CoV-2 RT-PCR (1 000 reacciones) | | |
|--|---|------------------------------------|
| Reactivos | Composición | Temperatura de almacenamiento (°C) |
| Mezcla maestra RT-PCR | Tris-HCl, MgCl ₂ , dinucleótidos y enzimas (Trascriptasa inversa y Taq polimerasa) | -15°C 25°C |
| Conjunto de Cebadores/ Sonda 1 | Cebadores/sonda para secuencia diana N1 | -15°C 25°C |
| Conjunto de Cebadores/ Sonda 2 | Cebadores/sonda para secuencia diana N2 | -15°C 25°C |
| Conjunto de Cebadores/ Sonda 3 | Cebadores/sonda para secuencia diana del gen RNase P humano | -15°C 25°C |
| Control Positivo | ADN plasmídico con secuencias diana del gen N y del gen RNase P humano | -15°C 25°C |
| Control Negativo | Agua libre de nucleasas | -15°C 25°C |

El ensayo que utiliza sondas y cebadores de secuencias diana específicas del gen N (nucleocápsida del virus) del SARS-CoV-2 y del gen RNase P humano como control interno (*Tabla 2*) fue validado utilizando el procedimiento de extracción *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (número de catálogo 52906) y el instrumento de *RT-PCR Applied Biosystems 7500 Fast Dx*.

Tabla 2. Cebadores y sondas de la prueba diagnóstica GK ACCU-RIGHT SARS-CoV-2 RT-PCR

| Reactivo | Descripción | Secuencia de oligonucleotidos (5'→3') | Marcadores | Concentración (nM) |
|-----------------------|---------------------------------|---|------------|--------------------|
| | 2019-nCoV_N1 Cebador directo | 5-GAC CCC AAA ATC AGC GAA AT-3' | - | 500 |
| Sondas y cebadores | 2019-nCoV_N1 Cebador reverso | 5-TCT GGT TAC TGC CAG TTG AAT CTG-3' | - | 500 |
| Mezcla 1 | 2019-nCoV_N1 Sonda | 5-FAM-ACC CCG CAT TAC GTT TGG TGG ACC BHQ1-3' | FAM-BHQ-1 | 250 |

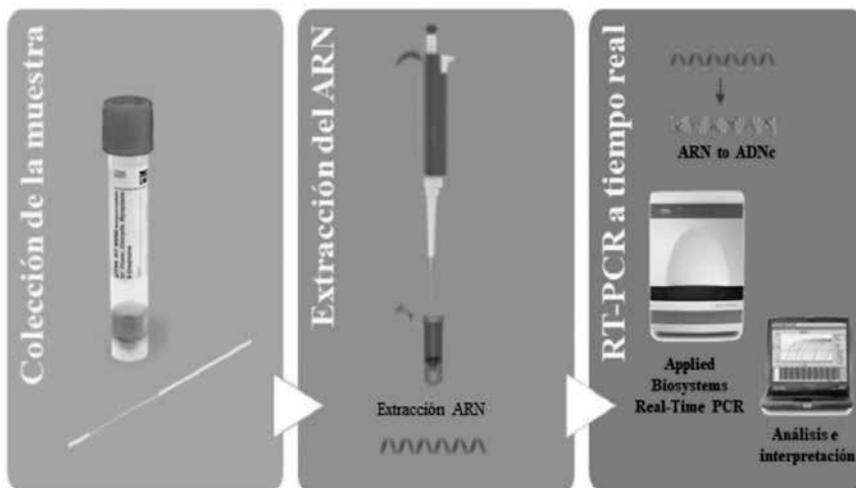
Investigación y Metría...

| | | | | |
|-----------------------------|------------------------------|---|-----------|-----|
| Sondas y cebadores Mezcla 2 | 2019-nCoV_N2 Cebador directo | 5-TTA CAA ACA TTG GCC GCA AA-3' | - | 500 |
| | 2019-nCoV_N2 Cebador reverso | 5-GCG CGA CAT TCC GAA GAA-3' | - | 500 |
| Sondas y cebadores Mezcla 3 | 2019-nCoV_N2 Sonda | 5-FAM-ACA ATT TGC CCC CAG CGC TTC AGBHQ1-3' | FAM-BHQ-1 | 250 |
| | RNase P Cebador directo | 5-AGA TTT GGA CCT GCG AGC G-3' | - | 500 |
| | RNase P Cebador reverso | 5-GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT-3' | - | 500 |
| | RNase P Sonda | 5-FAM TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG BHQ-1-3' | FAM-BHQ-1 | 250 |

Fases principales del GK ACCU-RIGHT SARS-CoV-2 RT-PCR

El ensayo se compone de tres fases principales: 1) la colección de las muestras, 2) la extracción de los ácidos nucleicos y 3) el desarrollo del RT-PCR (*Figura 1*).

Figura 1. Fases de la prueba diagnóstica GK ACCU-RIGHT SARS-CoV-2 RT-PCR



Colección de las muestras

La recolección, el transporte y el almacenamiento adecuado de las muestras es esencial para obtener resultados sensibles y precisos. El GK ACCU-RIGHT SARS-CoV-2 RT-PCR utiliza muestras colectadas de las vías respiratorias superiores (hisopos nasofaríngeos u orofaríngeos, de cornete medio y nasales) extraídas de individuos sospechosos de padecer el COVID-19. Los hisopos se recogieron en medio de transporte viral (VTM, siglas en inglés), una solución desarrollada según las recomendaciones publicadas por el CDC (CDC, sf). Las muestras fueron almacenadas a 2-8°C y se analizaron en menos de 72 horas. De ser necesario las muestras pueden conservarse a -20°C, y para almacenamiento prolongado se recomiendan temperaturas $\leq -70^{\circ}\text{C}$.

Extracción de los ácidos nucleicos

El rendimiento de las pruebas basadas en la amplificación por RT-PCR depende de la cantidad y calidad de la muestra de ARN. Los procedimientos de extracción de ARN deben ser calificados y comprobados por recuperación y pureza antes de examinar las muestras. La extracción de ácidos nucleicos propuesta en nuestro ensayo se basa en la utilización del *qiaamp® Viral RNA Mini Kit*, un procedimiento de extracción disponible comercialmente que genera un ARN altamente purificado cuando se siguen las recomendaciones del fabricante (Qiagen, sf). El procedimiento utiliza 140 μL de controles y muestras y un volumen de 60 μL de solución tamponada para la elución del ARN. Los controles negativos y positivos de la prueba GK ACCU-RIGHT SARS-CoV-2 RT-PCR requieren un pre-tratamiento antes de la extracción:

En un área diferente a la del procesamiento de las muestras y de preparación de la mezcla de la reacción de RT-PCR, 70 μL del Control Negativo se diluyen con 70 μL de agua libre de nucleasas.

En un área diferente a la del procesamiento de las muestras y de preparación de la mezcla de la reacción de RT-PCR, 70 μL del Control Positivo se diluyen con 70 μL de agua libre de nucleasas para una concentración final de 10 copias/ μL .

Esta presentación de los controles negativos y positivos, siguiendo los mismos procedimientos de extracción que las muestras de los pacientes, es una de las modificaciones que hemos realizado al método original descrito por el CDC.

El ácido nucleico extraído se almacena a 2-8°C si se utiliza dentro de las cuatro horas posteriores a su extracción, o se pueden conservar a temperaturas entre -20°C y -70°C si es necesario almacenarlas por un tiempo prolongado.

RT-PCR a tiempo real

Preparación de la mezcla maestra de reacción y configuración de la placa de RT-PCR

La prueba detecta la presencia del SARS-CoV-2 a partir de la identificación de secuencias diana en la nucleocápsida del virus (N1 y N2). La transcripción inversa y la amplificación se llevan a cabo en un único paso RT-PCR, utilizando la mezcla maestra de reacción. Para garantizar la ausencia de inhibición durante el PCR, y la integridad del ARN de la muestra, se incluye en cada análisis como control interno la detección del gen RNase P humano.

La *Tabla 3* muestra la composición de la mezcla maestra de reacción. Durante la preparación de las pruebas, todos los reactivos deben mantenerse en una gradilla fría. La mezcla maestra RT-PCR es descongelada y mezclada por inversión mientras que los conjuntos de cebadores/sondas son descongelados, mezclados mediante *vortex* y, finalmente, centrifugados durante cinco segundos antes de su utilización.

Tabla 3. Mezcla maestra de reacción del GK ACCU-RIGHT SARS-CoV-2 RT-PCR

| Reactivos | Volumen (µL) 1 reacción | Volumen (µL) N reacciones |
|-------------------------------------|----------------------------|------------------------------|
| Mezcla Maestra RT-PCR | 5.0 | N x 5.0 |
| Conjunto cebadores/sonda específica | 1.5 | N x 1.5 |
| Agua libre de nucleasas | 8.5 | N x 8.5 |
| Volumen final | 15.0 | N x 15.0 |

Se prepara una mezcla maestra de reacción por cada conjunto de cebadores/sondas. Un volumen de 15 µL de cada mezcla maestra de reacción y 5 µL del ARN extraído de los controles y muestras es dispensado en los pocillos correspondientes para un volumen final de 20 µL por pozo de reacción.

Finalmente, las placas son selladas y centrifugadas durante 10-15 segundos. Para comenzar la corrida, las placas son colocadas en el *RT-PCR Applied Biosystems 7500 Fast Dx* y las condiciones del termociclado son configuradas (*Tabla 4*). Otra de las modificaciones realizadas al método original descrito por el CDC está relacionado con las condiciones de termociclado del ensayo, con el objetivo de hacer más eficiente la detección de la secuencia diana N2.

Tabla 4. Parámetros de termociclado del GK ACCU-RIGHT SARS-CoV-2 RT-PCR

| | Ciclos | Temperatura (°C) | Tiempo (min:seg) |
|-----------------------------|--------|------------------|------------------|
| Transcripción Inversa | 1 | 50 | 15:00 |
| Activación de la Polimerasa | 1 | 95 | 02:00 |
| Desnaturalización | 42 | 95 | 00:15 |
| Hibridación y extensión | | 58 | 01:00 |

Análisis e interpretación de resultados

Después de completar la corrida, los datos son guardados y analizados siguiendo las instrucciones del ensayo. A través del software se determina el umbral de la corrida y se analizan los ciclos umbral (Ct) obtenidos para cada control y muestra. Los umbrales deben establecerse de manera coherente y encontrarse dentro de la fase exponencial de las curvas de fluorescencia y por encima de cualquier señal de fondo (*background*).

Antes de interpretar los resultados de los pacientes, los resultados obtenidos con los controles positivos y negativos deben ser analizados. Si los controles no cumplen con los requerimientos descritos en la *Tabla 5*, el ensayo no es validado; esto puede significar que la prueba no se configuró ni/o ejecutó correctamente, o que los reactivos o el equipo de RT-PCR funcionan incorrectamente. En cualquiera de los casos los resultados de los pacientes no se pueden interpretar.

Tabla 5. Resultados esperados para los controles del ensayo

| Control | Utilidad en el ensayo | Secuencia Diana N1 | Secuencia Diana N2 | Secuencia Diana RP | Valores Ct esperados |
|-----------------|--|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| Negativo | Prever contaminación ambiental o de reactivos | - | - | - | No detectado |
| Positivo | Prever fallo de los reactivos, incluida la integridad de cebadores/sonda o contaminación durante la extracción | + | + | + | < 40 Ct |

Otra de las modificaciones realizadas al método descrito por el CDC está relacionada con la interpretación de los resultados. La *Tabla 6* resume los resultados posibles que se pueden obtener en una corrida que ha sido validada.

Tabla 6. Interpretación de resultados del GK ACCU-RIGHT SARS-CoV-2 RT-PCR

| Secuencia Diana N1 | Secuencia Diana N2 | Secuencia Diana RP | Interpretación de los resultados | Acción |
|--|--------------------|--------------------|--|---|
| + | + | + o - | Resultado positivo para SARS-CoV-2 | Informar los resultados positivos al proveedor de atención médica y a las autoridades de salud pública. |
| Una de las secuencias diana es positiva | | + | Resultado positivo para SARS-CoV-2 | Informar los resultados positivos al proveedor de atención médica y a las autoridades de salud pública. |
| Una de las secuencias diana es positiva | | - | Resultado presuntivo positivo para el SARS-CoV-2 | Repitir la extracción y RT-PCR. Si aún no es concluyente, se recomienda nueva colecta de muestra. |

| | | | | |
|---|---|---|------------------------------------|---|
| - | - | + | Resultado negativo para SARS-CoV-2 | Informar los resultados negativos al proveedor de atención médica. Considerar la posibilidad de realizar pruebas para detectar otros patógenos. |
| - | - | - | Resultado inválido | Repitir la extracción y RT-PCR. Si el resultado sigue siendo inválido, coleccionar una nueva muestra. |

Pruebas de validación

Los estudios de validación del ensayo tuvieron en cuenta las recomendaciones hechas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, siglas en inglés) para los ensayos de diagnóstico molecular del SARS-CoV-2. Estos estudios incluyeron la determinación del límite de detección, las pruebas de inclusividad y reactividad cruzada, y la evaluación clínica de muestras de pacientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación del límite de detección del ensayo

Primeramente, para la determinación de la menor concentración de virus que puede ser detectada con un 95% de probabilidad en el RT-PCR, se analizaron tres niveles diferentes de concentración del virus (LoD preliminar). Muestras clínicas de exudados nasofaríngeos negativos fueron mezcladas con ARN viral genómico aislado, cultivado, cuantificado e inactivado (*BEI Resources Catalog No. NR-52286*) para obtener concentraciones de 4, 2 y 1 copias/ μ L. Por cada dilución fueron extraídas tres muestras utilizando el *ARN Viral QIAamp Mini kit* (Qiagen, número de catálogo 52906), y luego se analizaron con la prueba diagnóstica GK ACCU-RIGHT SARS-CoV-2 RT-PCR en el *Applied Biosystems™ 7500 Fast Dx Real-Time PCR* con SDS (software v1.4).

Para confirmar el LoD preliminar, se seleccionó la concentración de dos copias/ μL . Las muestras ($n=20$) se extrajeron de forma independiente utilizando el mini kit *de ARN viral QIAamp* (número de catálogo 52906) y luego se desarrolló el RT-PCR de acuerdo con la metodología establecida para el ensayo. Los valores de Ct y la tasa de detección se muestran en la *Tabla 7*. Con base en este estudio, se confirmó que el LoD era de dos copias/ μL . Estos resultados son similares a los reportados en otros ensayos con Autorización de Uso de Emergencia (EUA, siglas en inglés) utilizando el mismo equipo y una metodología similar (CDC 2020; NYSDOH 2020).

Pruebas de inclusividad y exclusividad (reactividad cruzada)

Para evaluar la inclusividad se realizan análisis *in silico*, donde, a partir de la búsqueda en bases de datos especializadas disponibles públicamente, se puede conocer los porcentajes de identidad u homología entre los cebadores y sondas del ensayo y las distintas cepas de SARS-CoV-2 que han sido secuenciadas y reportadas a nivel mundial.

Las secuencias de los cebadores/sondas N1 y N2 utilizadas en nuestra prueba diagnóstica son idénticas a las secuencias descritas y utilizadas en el Panel Diagnóstico del CDC (ensayo con EUA autorizado por la FDA). El CDC ha otorgado el derecho de referencia a los desarrolladores de ensayos para utilizar los datos generados en su panel diagnóstico, con lo cual no sería del todo necesario realizar este estudio de inclusividad.

Sin embargo, una característica de los virus de ARN como el SARS-CoV-2 es que mutan rápidamente, y que van acumulando cambios en su genoma. Hoy, con la información proporcionada por los diferentes equipos de investigadores a nivel mundial, se sabe que el virus está mutando. Por ello, se debe mantener una vigilancia continua sobre las variantes del genoma de COVID-19 y sus efectos sobre los resultados de estudios con pruebas diagnósticas que tengan como base la técnica de PCR.

Tabla 7. Límite de detección de la prueba diagnóstica GK ACCU-RIGHT SARS-CoV-2 RT-PCR

| LoD Preliminar | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|------------------|---|---------------|----------|-----------------------|---------------|----------|-----------------------|--------------------|----------|-----------------------|
| Concentración (copias/ μ L) | Réplicas válidas | Réplicas detectadas según la interpretación de resultados | SARS-CoV-2 N1 | | | SARS-CoV-2 N2 | | | Control interno RP | | |
| | | | n | Media Ct | Tasa de detección (%) | n | Media Ct | Tasa de detección (%) | n | Media Ct | Tasa de detección (%) |
| 4 | 3 | 3 (100%) | 3 | 36.5 | 100% | 3 | 36.0 | 100% | 3 | 34.8 | 100% |
| 2 | 3 | 3 (100%) | 3 | 36.6 | 100% | 3 | 37.9 | 100% | 3 | 33.3 | 100% |
| 1 | 3 | 2 (67%) | 1 | 36.1 | 33% | 2 | 37.5 | 67% | 3 | 33.2 | 100% |
| LoD Confirmatorio | | | | | | | | | | | |
| Concentración (copias/ μ L) | Réplicas válidas | Réplicas detectadas según la interpretación de resultados | SARS-CoV-2 N1 | | | SARS-CoV-2 N2 | | | Control interno RP | | |
| | | | n | Media Ct | Tasa de detección (%) | n | Media Ct | Tasa de detección (%) | n | Media Ct | Tasa de detección (%) |
| 2 | 20 | 20 (100%) | 17 | 36.8 | 85% | 17 | 36.0 | 85% | 20 | 33.2 | 100% |

De esta manera, realizamos nuestro propio estudio utilizando la herramienta de búsqueda de alineamiento de secuencias (BLAST, siglas en inglés) en el sitio web del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, siglas en inglés). El análisis informático del 3 de septiembre de 2020 incluyó 10 692 secuencias completas del SARS-CoV-2 de la base de datos de Betacoronavirus.

En nuestro estudio se encontraron un total de 98 (0.92%) desapareamientos puntuales de nucleótidos, 57 para la secuencia diana N1 y 41 para la N2, un número que indica que la prevalencia de desajustes o desapareamiento fue esporádica. Los desapareamientos específicos de nucleótidos en las regiones cebadores/sonda con una frecuencia de desajuste > 0.05% se muestran en la *Tabla 8*. Sólo se identificó una secuencia (0.009%) con dos desajustes de nucleótidos en el cebador directo de la secuencia diana N2. No se encontró que ninguna secuencia tuviera más de un emparejamiento incorrecto en ninguna región del conjunto cebadores/sonda N1.

Tabla 8. Estudio de inclusividad del ensayo GK ACCU-RIGHT SARS-CoV-2 RT-PCR

| Cebadores/sonda | Sonda N1 | Cebador reverso N1 | Sonda N2 | Cebador reverso N2 |
|---|----------|--------------------|----------|--------------------|
| Ubicación (5'>3') | 13 | 6 | 13 | 8 |
| Nucleótidos desapareado | G>T | C>A | C>T | C>T |
| Número de desapareamientos específicos* | 8 | 6 | 7 | 7 |
| Frecuencia de desajuste (%)** | 0.07 | 0.06 | 0.07 | 0.07 |

* Número de secuencias obtenidas para un desapareamiento específico.

** Porcentaje de secuencias que no coinciden con el nucleótido de referencia.

Los estudios realizados por el CDC en junio 2020 que evaluaron 31 623 secuencias disponibles en la base de datos de la Iniciativa Global para Compartir Datos de Influenza (GISAID, <https://www.gisaid.org>) también mostraron frecuencias de desapareamientos a nivel de las secuencias de cebadores/sonda N1 y N2 (CDC 2020). La frecuencia mayor de desajuste (2%) la reportaron para un desapareamiento puntual en la posición 3 de la sonda de la secuencia diana N1.

El CDC indicaba que el riesgo de que este tipo de desajustes puntuales provoque una pérdida significativa de reactividad que genere resultados falsos negativos es extremadamente bajo, debido al diseño de los cebadores y las sondas y a las condiciones de termociclado de la prueba donde las temperaturas de desnaturalización para cebadores/sondas $>60^{\circ}\text{C}$ y las temperaturas de hibridación entre $55-58^{\circ}\text{C}$ permiten tolerar hasta dos desajustes (CDC 2020).

Desde el inicio de la pandemia de COVID-19, investigadores de diferentes países han estado compartiendo las secuencias de SARS-CoV-2 aisladas de las personas infectadas, lo que ha permitido conocer la evolución del virus y elaborar un registro de cómo va mutando y la prevalencia de las distintas cepas en cada territorio. Esto es una herramienta de trabajo muy importante no sólo para trabajar en el desarrollo de tratamientos eficaces (por ejemplo, el desarrollo de vacunas), sino para estimar cómo las diferentes pruebas diagnósticas pueden ver afectadas su sensibilidad analítica a partir de la pérdida de homología entre las secuencias del virus y la combinación de cebadores/sondas utilizadas en los ensayos. Si las variaciones del virus se ubican en las regiones de los cebadores/sondas, la fiabilidad de la prueba se reduciría y causaría resultados falsos negativos con un impacto importante en el diagnóstico y control de la pandemia.

Así, con el diseño de ensayo propuesto es posible cumplir con las expectativas del FDA de que el 100% de las secuencias de SARS-CoV-2 conocidas sean detectables con la combinación de cebadores y sondas utilizados en nuestra prueba diagnóstica.

La reactividad cruzada del GK ACCU-RIGHT SARS-CoV-2 RT-PCR se evaluó mediante pruebas *in vitro* y análisis *in silico*.

Para acceder a la exclusividad *in silico* del ensayo se utilizó la herramienta de búsqueda de alineamiento de secuencias (BLAST, siglas en inglés) en el sitio web del NCBI, con el objetivo de identificar las regiones de homología entre los cebadores y sondas del ensayo y los genomas conocidos de diferentes microorganismos. Los estudios se generaron a partir de varios patógenos de alta prioridad de la misma familia genética que el SARS-CoV-2, así como otros patógenos de alto perfil, probablemente en el mismo nicho biológico que el nuevo virus.

Investigación y Metría...

Se llevó a cabo el análisis *in silico* para detectar una posible reactividad cruzada con los organismos enumerados en la *Tabla 9*, y se encontró una homología $\geq 80\%$ sólo para el coronavirus SARS y el coronavirus SARS derivado del murciélago.

Tabla 9. Microorganismos evaluados en el estudio *in silico*

| NNO | Microorganismo | NO | Microorganismo |
|-----|---------------------------------------|----|--|
| 11 | Coronavirus SARS | 22 | <i>Bordetella pertussis</i> |
| 22 | Coronavirus MERS | 23 | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| 33 | Coronavirus humano 229E | 24 | <i>Mycoplasma pneumoniae</i> |
| 44 | Coronavirus humano OC43 | 25 | <i>Pneumocystis jirovecii</i> (PJP) |
| 55 | Coronavirus humano HKU1 | 26 | <i>Candida albicans</i> |
| 66 | Coronavirus humano NL63 | 27 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| 77 | Adenovirus humano 71 | 28 | <i>Staphylococcus epidermis</i> |
| 88 | Metapneumovirus humano (hMPV) | 29 | <i>Neisseria meningitidis</i> |
| 99 | Virus de la parainfluenza 1 | 30 | <i>Neisseria elongata</i> |
| 110 | Virus de la parainfluenza 2 | 31 | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| 111 | Virus de la parainfluenza 4a | 32 | <i>Streptococcus salivarius</i> |
| 112 | Virus de la parainfluenza 4b | 33 | <i>Corynebacterium diphtheria</i> |
| 113 | Influenza A | 34 | <i>Bacillus anthracis</i> (Anthrax) |
| 114 | Influenza B | 35 | <i>Moraxella catarrhalis</i> |
| 115 | Enterovirus | 36 | <i>Leptospira</i> |
| 116 | Virus sincitial respiratorio humano A | 37 | <i>Chlamydia psittaci</i> |
| 117 | Rinovirus humano | 38 | <i>Coxiella burnetii</i> (Q-Fever) |
| 118 | <i>Chlamydia pneumoniae</i> | 39 | <i>Homo sapiens</i> |
| 119 | <i>Haemophilus influenzae</i> | 40 | <i>Legionella pneumophila</i> |
| 220 | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 41 | Betacoronavirus de murciélago |
| 221 | <i>Streptococcus pyogenes</i> | 42 | Coronavirus SARS derivado del murciélago |

De manera similar a lo reportado anteriormente por el CDC, el análisis *in silico* para el conjunto de cebadores/sonda N1 mostró una alta homología de la secuencia de la sonda N1 con el coronavirus SARS humano y el coronavirus SARS derivado del murciélago. Sin embargo, los cebadores directos y reversos no mostraron homología de secuencia con el coronavirus SARS humano y el genoma del coronavirus SARS derivado del murciélago (CDC 2020).

Combinando los resultados de los cebadores y las sondas para la secuencia diana N1, no hay homologías significativas con el genoma

humano, otros coronavirus o la microflora humana que puedan predecir posibles resultados falsos positivos en el RT-PCR.

De manera similar, el análisis del cebador directo de la secuencia diana N2 mostró una alta homología con el coronavirus SARS derivado del murciélago. Sin embargo, las secuencias del cebador reverso y de la sonda no mostraron una homología significativa con el genoma humano, otros coronavirus o la microflora humana.

Como informaba anteriormente el CDC, al combinar los resultados de los cebadores y las sondas para ambas secuencias diana del SARS-CoV-2, no hay predicción de posibles resultados falsos positivos en el RT-PCR (CDC 2020).

Para la prueba *in vitro*, se evaluó un panel de patógenos respiratorios con el GK ACCU-RIGHT SARS-CoV-2 RT-PCR. Un total de 16 microorganismos inactivados y dos transcritos de ARN fueron combinados con medio de transporte viral negativo para obtener las concentraciones indicadas en la *Tabla 10*.

Tabla 10. Estudio de reactividad cruzada *in vitro* del GK ACCU-RIGHT SARS-CoV-2 RT-PCR

| NNO | Microorganismo | Origen | Concentración copias/mL | Resultado RT-PCR |
|-----|--|-------------------|-------------------------|------------------|
| 11 | Coronavirus humano 229E | Zeptomatrix panel | 1.0×10^6 | Negativo |
| 22 | Coronavirus humano NL63 | Zeptomatrix panel | 1.13×10^5 | Negativo |
| 33 | Coronavirus humano oc43 | Zeptomatrix panel | 3.3×10^5 | Negativo |
| 44 | Enterovirus B111 (2015 Isolate) | Zeptomatrix panel | 8.0×10^6 | Negativo |
| 55 | <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b; Eagan | Zeptomatrix panel | 1.5×10^9 | Negativo |
| 66 | Influenza A H1N1pdm (NY/02/09) | Zeptomatrix panel | 0.7×10^5 | Negativo |
| 77 | Influenza B (Colorado/06/17) | Zeptomatrix panel | 0.9×10^5 | Negativo |
| 88 | <i>Mycoplasma pneumoniae</i> M129 | Zeptomatrix panel | 2.1×10^6 | Negativo |
| 99 | Virus de la Parainfluenza Tipo 1 | Zeptomatrix panel | 2.3×10^7 | Negativo |
| 110 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (clinical isolate) | Zeptomatrix panel | 5.6×10^9 | Negative |
| 111 | Virus sincitial respiratorio Tipo A (RSV-A) | Zeptomatrix panel | 3.3×10^5 | Negativo |
| 112 | Rinovirus (Isolate: 10/2014 Isolate #1) | Zeptomatrix panel | 1.1×10^5 | Negativo |
| 113 | <i>Streptococcus pneumoniae</i> 19F; Z022 | Zeptomatrix panel | 1.5×10^9 | Negativo |

Investigación y Metría...

| | | | | |
|-----|--------------------------------------|-------------------|-----------------------|----------|
| 114 | <i>Streptococcus pyogenes</i> Z018 | Zeptomatrix panel | 6.0 x 10 ⁸ | Negativo |
| 115 | <i>Candida albicans</i> Z006 | Zeptomatrix panel | 4.2 x 10 ⁸ | Negativo |
| 166 | <i>Streptococcus salivarius</i> Z127 | Zeptomatrix panel | 5.5 x 10 ⁸ | Negativo |
| 117 | <i>Coronavirus SARS</i> | ARN transcrito | 1.3 x 10 ³ | Negativo |
| 118 | <i>Coronavirus MERS</i> | ARN transcrito | 1.3 x 10 ³ | Negativo |

Las muestras fueron extraídas con el *ARN Viral QIAamp Mini Kit* y analizadas en el *Applied Biosystems 7500 Fast Dx* de acuerdo con las instrucciones de uso del ensayo. Los resultados mostraron que ninguno de los patógenos produjo reactividad detectable con el GK ACCU-RIGHT SARS-CoV-2 RT-PCR.

Con base en los resultados de estos estudios y lo que ha sido reportado en otros ensayos con EUA utilizando una combinación similar de cebadores/sondas, se puede concluir que los cebadores y sondas de las secuencias diana N1 y N2 no amplificarán ni detectarán ninguna de las secuencias patogénicas analizadas, con lo cual garantizan la no presencia de reactividad cruzada en el ensayo.

Evaluación clínica

Se realizó un estudio para evaluar el desempeño clínico del GK ACCU-RIGHT SARS-CoV-2 RT-PCR en comparación con el Panel Diagnóstico de RT-PCR en tiempo real del CDC. Para ello, 90 muestras individuales de hisopos nasofaríngeos clínicos naturales (45 negativos y 45 positivos) fueron colectados y almacenadas en un laboratorio certificado de alta complejidad (CLIA) de Puerto Rico. Los hisopos se recogieron en 3 mL del medio de transporte viral, preparados según las recomendaciones del CDC (CDC, sf). El resultado obtenido con el Panel Diagnóstico de RT-PCR en tiempo real del CDC fue utilizado como referencia en la comparación de los métodos.

Las muestras se analizaron de forma ciega y aleatorizada en el GK ACCU-RIGHT SARS-CoV-2 RT-PCR siguiendo las instrucciones de uso del ensayo para la extracción de los ácidos nucleicos de las muestras y controles, la preparación de la mezcla de reacción y las condiciones de la corrida de RT-PCR.

Los resultados de la evaluación clínica se muestran en la *Tabla 11*. El desempeño de la prueba demostró un 100% de coincidencia de porcentaje positivo (PPA, siglas en inglés) y un 100% de coincidencia de porcentaje negativo (NPA, siglas en inglés) en comparación con el ensayo del CDC.

Tabla 11. Evaluación clínica con muestras de hisopos nasofaríngeos de individuos confirmados como positivos o negativos

| GK ACCU-RIGHT SARS-CoV-2 RT-PCR | Método Comparador (Panel Diagnóstico de RT-PCR en tiempo real del CDC) | | |
|--|---|----------|-------|
| | Positivo | Negativo | Total |
| Positivo | 45 | 0 | 45 |
| Negativo | 0 | 45 | 45 |
| Total | 45 | 45 | 90 |
| Coincidencia del porcentaje positivo (PPA) | 100% (95% IC: 92.1% – 100%) | | |
| Coincidencia del porcentaje negativo (NPA) | 100% (95% IC: 92.1% – 100%) | | |

CONSIDERACIONES FINALES

En este trabajo se muestran los resultados obtenidos durante la validación de la prueba diagnóstica GK ACCU-RIGHT SARS-CoV-2 RT-PCR, un ensayo molecular para la detección del SARS-CoV-2 en muestras respiratorias humanas.

Desde el inicio de la pandemia los juegos de cebadores y sondas descritos por el CDC han sido recomendados para las pruebas clínicas en los Estados Unidos (WHO, sf), y esto ha provocado que diversos grupos de investigación en universidades y en el sector público y el privado hayan desarrollado sus propias metodologías utilizando como referencia estas secuencias diana (Kudo *et al.* 2020). También ha sido reconocido que la sensibilidad de este conjunto de cebadores y sondas es comparable a las descritas por el CDC de China (China CDC, sf), el Charité Institute of Virology, Universitätsmedizin Berlin (Corman *et al.* 2020) y la Universidad de Hong Kong (Chu *et al.* 2020), entre otros.

Por ello consideramos que esta combinación de cebadores/sondas, elegida primeramente por nuestro grupo de trabajo por ser una manera simple y reproducible de realizar el diagnóstico clínico del COVID-19, fue una decisión acertada. Después de seis meses de trabajo, este ensayo ha demostrado ser una importante herramienta para realizar diagnóstico rápido y preciso, cuyo costo no ha sido prohibitivo para detectar los individuos infectados con el virus. Gracias a esta metodología, ha sido posible analizar muestras de 5 735 individuos y detectar 592 individuos afectados con el SARS-CoV-2.

Sin embargo, fue necesario realizar varias modificaciones al protocolo original descrito por el CDC de Atlanta (CDC 2020) para cumplir con el objetivo de desarrollar una prueba que en formato de estuche diagnóstico pudiera convertirse en una alternativa viable para otros laboratorios clínicos de Puerto Rico y Estados Unidos. En este caso las concentraciones de los conjuntos de cebadores/sondas y las condiciones de la mezcla maestra de reacción se corresponden con las establecidas en el método original.

Los cambios realizados al protocolo original fueron enfocados hacia: 1) la utilización e interpretación de los controles en el ensayo, 2) mejorar la detección de la secuencia diana N2 (mediante ajustes al protocolo de termociclado), y 3) mejorar la eficiencia de la interpretación de los resultados.

En el caso del protocolo de termociclado habíamos observado problemas con la detección del conjunto de cebadores/sonda de la secuencia diana N2, con respecto a la secuencia diana N1. Esta observación también ha sido reportada por otros investigadores (Kudo *et al.* 2020), y consideramos que con las modificaciones realizadas a nuestro protocolo se aumenta la capacidad de detección de la secuencia diana N2 sin afectar la detección del N1, mejorando aún más la sensibilidad del ensayo, sobre todo en aquellas muestras con pocas copias del virus. Los resultados mostrados en este trabajo avalan estas aseveraciones, pues la nueva prueba ha funcionado de una manera similar al ensayo original, cuando fueron evaluadas muestras clínicas positivas y negativas.

Respecto a la interpretación de los resultados, consideramos importante utilizar el criterio de reportar como positiva una muestra

donde al menos una de las secuencias diana del SARS-CoV-2 ha sido detectada, en presencia de señal para el gen RNase P humano. En el protocolo original esta muestra sería reportada como presuntiva positiva o indeterminada, lo que haría necesario repetir la extracción y el RT-PCR para esa muestra, con el consiguiente gasto de recursos y atrasos en el reporte de los resultados. Incluso en muchos pacientes la detección de una sola secuencia diana se mantiene y por protocolo debe colectarse una nueva muestra, con lo que se incrementan aún más los costos y el tiempo de espera. En nuestra experiencia este criterio es aún más relevante para el diagnóstico en pacientes que se están recuperando de la infección, y que necesitan de resultados negativos en las pruebas moleculares, por ejemplo, como constancia para poder reincorporarse a la vida laboral.

La nueva metodología puede ser aplicable a varios equipos de RT-PCR y es posible establecer diferentes procedimientos de extracción. Sin embargo, para la validación del nuevo ensayo se utilizaron sólo muestras extraídas con el método de extracción *QIAamp Viral RNA Mini Kit* y el sistema *RT-PCR Applied Biosystems 7500 Fast Dx*. Es conocido que las condiciones de los ciclos de PCR pueden variar según los instrumentos de RT-PCR, el tipo de muestra utilizado y por supuesto las secuencias dianas detectadas. Por lo tanto, al momento de implementar éste u otro ensayo, los laboratorios deben validar y optimizar las condiciones específicas sobre las que se pretende realizar el diagnóstico, modificar y/o entregar la documentación requerida que avalen el desempeño analítico del método propuesto.

La pandemia de SARS-CoV-2 ya se ha cobrado la vida de más de 900 000 personas y ha impactado de manera negativa la economía a nivel mundial, con lo cual ha cambiado nuestra rutina de vida de modo significativo (WHO 2020). Ante el alza de los casos de COVID-19, muchos sistemas de salud han articulado estrategias que pretenden establecer programas eficientes de rastreo de contacto, para cortar las cadenas de transmisión y de esa manera intentar disminuir el número de casos o retrasar su crecimiento. En esta ecuación, tanto el diagnóstico molecular como el serológico cobran una importancia vital. En teoría, estos programas podrían ser exitosos, pero en la realidad la no disponibilidad de pruebas diagnósticas hace que en muchos casos los

resultados pueden tardar entre cuatro y siete días para estar disponibles. De esa manera, los programas podrían volverse inoperantes y no cumplir el objetivo de intentar controlar la pandemia.

De esta manera nuestra metodología sería una alternativa que permitiría incrementar las capacidades de diagnóstico durante la pandemia, reduciendo el tiempo requerido para la detección del coronavirus en Puerto Rico y apoyando el establecimiento de protocolos adecuados para la prevención de la infección con el virus.

La documentación asociada a esta investigación fue presentada ante la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) para la obtención de la Autorización de Uso de Emergencia (EUA). Con esta aprobación, dicha metodología en formato de ensayo diagnóstico (GK ACCU-RIGHT SARS-CoV-2 RT-PCR) podría ser utilizada en territorio norteamericano y proporcionar una solución rentable y disponible territorialmente para el diagnóstico del COVID-19 en Puerto Rico y los Estados Unidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). “CDC 2019 -Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel”. Instruction for use (revisión 05). Disponible en <https://www.fda.gov/media/134922/download>.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). “Preparation of viral transport medium. SOP#: DSR-052-05”. Disponible en <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/Viral-Transport-Medium.pdf>.

China CDC. “Specific primers and probes for detection 2019 novel coronavirus”. Disponible en http://ivdc.chinacdc.cn/kyjz/202001/t20200121_211337.html.

- Chu, D. K. W., Pan, Y., Cheng, S. M. S., Hui, K. P. Y., Krishnan, P., Liu, Y., Ng, D. Y. M., *et al.* (2020). "Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia", *Clin Chem*, 66: 549-555. Disponible en [http://doi: 10.1093/clinchem/hvaa029](http://doi:10.1093/clinchem/hvaa029).
- Corman Victor, M. Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K. W., Bleicker, T., *et al.* (2020). "Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR", *Euro Surveill*, 25 (3): 1-8. Disponible en [http://doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045](http://doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045).
- Kudo, E., Israelow, B., Vogels, C. B. F., Lu, P., Wyllie, A. L. Tokuyama, M., Venkataraman, A., *et al.* "Detection of SARS-CoV-2 RNA by multiplex RT-qPCR", *BioRxiv*. Disponible en <https://doi.org/10.1101/2020.06.16.155887>.
- Qiagen. "QIAamp® Viral RNA Mini Handbook" (2020). Disponible en <https://www.qiagen.com/gb/resources/resourcedetail?id=c80685c0-4103-49ea-aa72-8989420e3018&lang=en>.
- NYSDOH. "New York SARS-CoV-2 Real-time Reverse Transcriptase (RT)- PCR Diagnostic Panel". Instruction for use. Disponible en <https://www.fda.gov/media/135847/download>.
- World Health Organization (WHO). "Coronavirus disease (COVID-19) Situation Report – Weekly Epidemiological Update". Disponible en https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200907-weekly-epi-update-4.pdf?sfvrsn=f5f607ee_2
- World Health Organization (WHO). "US_CDC 2019-Nov-el Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel: Primers and Probes". Disponible en https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/uscdcrtpcr-panel-primer-probes.pdf?sfvrsn=fa29cb4b_2

Investigación y Metría de la Información sobre COVID-19: diversos enfoques de la pandemia, fue editado por el Instituto de Investigaciones Bibliotecológicas y de la Información/UNAM. Coordinación editorial, Anabel Olivares Chávez; revisión especializada y revisión de pruebas, Valeria Guzmán González y LOGIEM, análisis y soluciones S. de R.L. de C.V.; formación, Mario Ocampo Chávez. Fue impreso en los talleres de Gráfica Premier S.A. de C.V. en papel cultural de 90 g. Se terminó de imprimir en septiembre de 2021.