



Artículo Científico | Scientific Article

## Evaluación de la relación entre el umbral de ciclo (Ct) de la RTqPCR y la clínica de COVID-19 en pacientes ambulatorios

Evaluation of the relationship between the cycle threshold (Ct) of RTqPCR and COVID-19 clinical symptoms in outpatients

Carlos Alexander Ortega Pérez<sup>1,2</sup>, Noe Rigoberto Rivera<sup>1,3</sup>,  
Juan José Vindell<sup>1,4</sup>, Marleny Yamileth Ayala<sup>1,5</sup>

Correspondencia:  
[carlos.ortega@ues.edu.sv](mailto:carlos.ortega@ues.edu.sv)

- 1 Universidad de El Salvador
- 2 ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1612-8386>
- 3 ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9553-0554>
- 4 ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4640-4452>
- 5 ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-7209-9689>

### RESUMEN

El diagnóstico gold estándar (GSDP) para COVID-19 es amplificación del ARN viral mediante retrotranscripción y reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RT-qPCR), utilizando una muestra de hisopado nasofaríngeo (NPS), procesada con una extracción de ARN tradicional. Respecto a la muestra, se han utilizado algunas sustituciones en el proceso diagnóstico, como muestras de saliva y secreción nasofaríngea con autotoma sin necesidad de utilizar hisopo con el objetivo de disminuir el tiempo, el costo de las pruebas y principalmente reducir el riesgo biológico del personal sanitario. El dato utilizado de la RT-qPCR para su positividad o negatividad es el valor del ciclo umbral (Ct), pudiendo este dato aportar según algunos estudios una importante herramienta como valor pronóstico en el

**DOI:** <https://doi.org/10.5377/revminerva.v7i4.19264>

Enviado: 23 de agosto de 2024  
Aceptado: 12 de septiembre de 2024

**Palabras clave:** Diagnóstico, muestra, pruebas.

**Keywords:** Diagnosis, sample, tests.



Este contenido está protegido bajo la licencia CC BY  
(<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

contexto clínico epidemiológico del paciente, incidiendo en la toma de decisiones terapéuticas del personal sanitario, con un posible impacto positivo en la evolución clínica de los pacientes, sin embargo varios de los estudios publicados demuestran baja o en algunos casos ninguna relación significativa entre el valor del Ct y la evolución clínica del paciente. OBJETIVO: evaluar la relación entre el umbral de ciclo (Ct) de la RTqPCR y la clínica de COVID-19 en pacientes ambulatorios. METODOLOGÍA: se procesaron 479 muestras de pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión, la amplificación se realizó por dos protocolos ya estandarizados de RT-qPCR de los genes E y RdRp de SARS CoV2, 4 muestras positivas se secuenciaron por NGS para confirmación diagnóstica. Se evaluaron los factores relacionados (signos y síntomas) con la carga viral SARS-CoV-2. Se determinó la carga viral, con base en la reacción de RT-qPCR y el valor umbral (CT). Se estratificó dos grupos; carga viral alta (Ct<30) y carga viral baja (Ct>30). Los datos se registraron en una planilla de Excel, posteriormente fueron analizados con el software estadístico R 4.4.1. de Project for Statistical Computing. Se consideró significativos valores de  $p \leq 0,05$ , se midió la fuerza de la asociación con el Odds Ratio y sus intervalos de confianza (IC 95 %). RESULTADOS: de 479 muestras procesadas, 87 muestras fueron positivas, las variables mayor gravedad(N:3) y letalidad(N:1) agruparon en el Ct< 30, solo un paciente grave se agrupó en el Ct>30. El resto (N:84) sin mortalidad o gravedad se agruparon de forma similar en ambos grupos Ct<30 y Ct>30, en todos los casos con una débil o ninguna relación significancia respecto al umbral Ct ( $p \geq 0.05$ ). De igual forma no se observó un impacto significativo de la vacuna en el valor de Ct. CONCLUSIÓN: la utilidad del Ct como predictor de gravedad de COVID-19 y para otras infecciones virales respiratorias debería ser sometida a estudios más rigurosos, mientras tanto dada la información disponible y los resultados del presente estudio se confirma que la utilidad del umbral Ct en el pronóstico clínico de los pacientes COVID-19 se acompaña de ciertas limitaciones. En cualquier caso, si se utiliza el valor Ct como factor pronóstico de pacientes COVID-19, debe hacerse con precaución y conscientes de las limitaciones.

#### ABSTRACT

The gold standard diagnosis (GSDP) for COVID-19 is amplification of viral RNA by retrotranscription and real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR), using a

nasopharyngeal swab sample (NPS), processed with a traditional RNA extraction. Regarding the sample, some substitutions have been used in the diagnostic process, such as saliva and nasopharyngeal secretion samples with auto collection without the need to use a swab to reduce the time and cost of these tests and mainly to reduce the biological risk of health personnel. The data used in RT-qPCR for its positivity or negativity is the value of the threshold cycle (Ct), and according to some studies this data can provide an important tool as a prognostic value in the clinical epidemiological context of the patient, influencing the therapeutic decision making of health personnel, with a possible positive impact on the clinical evolution of patients; however, several of the published studies show low or in some cases no significant relationship between the Ct value and the clinical evolution of the patient. OBJECTIVE: To evaluate the relationship between RTqPCR cycling threshold (Ct) and clinical COVID-19 in outpatients. METHODOLOGY: 479 samples from patients who met the inclusion criteria were processed, amplification was performed by two already standardized RT-qPCR protocols of SARS CoV2 E and RdRp genes, 4 positive samples were sequenced by NGS for diagnostic confirmation. Factors related (signs and symptoms) to SARS-CoV-2 viral load were evaluated. Viral load was determined based on RT-qPCR reaction and threshold value (CT). Two groups were stratified; high viral load (Ct<30) and low viral load (Ct>30). The data were recorded in an excel spreadsheet and subsequently analyzed with the statistical software R 4.4.1. from Project for Statistical Computing. Values of  $p \leq 0.05$  were considered significant, the strength of the association was measured with the Odds Ratio and its confidence intervals (95% CI). RESULTS: Of 479 samples processed, 87 samples were positive, the highest severity(N:3) and lethality(N:1) variables clustered in Ct< 30, only one severe patient clustered in Ct>30. The rest (N:84) without mortality or severity clustered similarly in both groups Ct<30 and Ct>30, in all cases with a weak or no relationship significance with respect to the Ct threshold ( $p \geq 0.05$ ). Similarly, no significant impact of the vaccine on the Ct value was observed. CONCLUSION: The usefulness of Ct as a predictor of severity of COVID-19 and for other respiratory viral infections should be subjected to more rigorous studies, meanwhile given the available information and the results of the present study confirm that the usefulness of the Ct threshold in the clinical prognosis of COVID-19 patients is accompanied by certain

limitations. In any case, if the Ct value is used as a prognostic factor in COVID-19 patients, it should be done with caution and awareness of the limitations.

## INTRODUCCIÓN

De los coronavirus, dos virus altamente patógenos: SARS-CoV y MERS-CoV, ambos causan síndrome respiratorio severo en humanos desde hace 2 décadas y SARS-CoV2 causó la pandemia desde inicios del 2020 a la actualidad, hoy en día es un virus endémico sin alerta sanitaria (Su et al., 2016) (Woo et al., 2012) (Wu et al., 2020). En El Salvador los primeros casos se reportaron en marzo de 2020, utilizando como técnica diagnóstica la RT-qPCR y como muestra hisopado nasofaríngea recomendada en las orientaciones provisionales para pruebas de SARS-CoV-2 (WHO, 2020a). Para marzo 2023 el panel interactivo COVID-19 del Centro de Ciencia e Ingeniería de Sistemas (CSSE) de la Universidad Johns Hopkins (Dong et al., 2020) reportaba a nivel mundial 676,609,95 de casos y 6,881,955 fallecidos por SARS-CoV-2. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó para agosto de 2024 un número de 775,867,547 casos y 7,057,145 de fallecidos y se habían aplicado 13.64bn dosis de vacuna, superando posiblemente el 70 % de las personas que necesitaban ser inmunizadas contra el virus para lograr inmunidad colectiva (WHO, 2020b), (Randolph & Barreiro, 2020; ElBagoury et al., 2020). A pesar de lo anterior y de la implementación del mecanismo COVAX por OMS (Herzog et al., 2021) la inmunidad colectiva es temporal necesitando refuerzo de vacunas, por lo que se volvió una necesidad importante continuar, de manera permanente, con la vigilancia epidemiológica mediante el diagnóstico molecular y secuenciación de SARS-CoV2.

La pandemia por el SARS-CoV-2 persiste con un comportamiento endémico, con brotes de nuevas variantes quizás igual o menos virulentas que las anteriores, pero con la misma capacidad infectante. Lo anterior a pesar de las más de 13bn de vacunas suministradas a más 146 economías alrededor del mundo (Covax, 2024).

Esta realidad mantiene vigente la posibilidad del surgimiento de variantes más virulentas, por lo que la

optimización del uso de la técnica diagnóstica que se aplicó masivamente durante la pandemia (RTqPCR) podría también utilizarse como un factor adicional de tipo predictivo sobre la posible evolución clínica de los pacientes ambulatorios o ingresados, lo cual sería de gran utilidad ante futuros brotes de variantes más virulentas de SARS CoV2 o incluso extrapolar este abordaje a otras infecciones virales respiratorias que utilizan RTqPCR solamente con fines diagnósticos, como la infección por virus influenza o virus sincitial respiratorio (RSV).

## Genoma de SARS-CoV-2

El genoma de SARS-CoV-2 está formado por una única cadena de ARN monocatenario de polaridad positiva (+ssARN) de 29.82 kb, que codifica para 14 marcos de lectura abiertos. La cadena de ARN se asemeja, estructuralmente a un ARN mensajero (ARNm) de células eucarióticas, ya que presenta un capuchón metilado en el extremo 5' (5' cap) y una cola poliadenilada (poli-A) en el extremo 3' (Chen et al., 2020).

En el extremo 5' se encuentran los ORF1a y ORF1ab, estos se traducen en poliproteínas que se dividen en proteínas no estructurales (NSP) que forman el complejo replicación-transcripción (RTC) que consta de múltiples enzimas, incluida la proteasa similar a la papaína (NSP3), la proteasa principal (NSP5), el complejo primasa NSP7-NSP8, la ARN polimerasa dependiente de ARN de baja fidelidad o RdRp (NSP12), una helicasa trifosfatasa (NSP13), una exoribonucleasa (NSP14), una endonucleasa (NSP15), N7- y 2'-O-metiltransferasa (NSP10 y NSP16), respectivamente. En el extremo 3' otros ORFs codifican para al menos cuatro proteínas estructurales principales: proteína de espícula (S), glicoproteína de membrana (M), envoltura (E) y nucleocápside (N) (Chen et al., 2020; Perlman & Netland, 2009).

## Uso del CtRT-qPCR para diagnóstico y pronóstico de la infección SARS-CoV2

En una revisión sistemática se evaluaron un total de 67 trabajos utilizando la RT-qPCR como estándar de referencia y se encontró una heterogeneidad considerable entre las pruebas, los valores de umbral

y los contextos en que se aplicaron (Stegeman, et al., 2020). La RT-qPCR para el diagnóstico de COVID-19 se realiza con hisopos nasofaríngeos u otras muestras del tracto respiratorio superior, incluidos hisopos de garganta o más recientemente, saliva. Se utilizan una variedad de primers dirigidos a uno o más genes de la envoltura (Env), nucleocápside (N), pico (S), ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) y ORF1, la sensibilidad y capacidad de detección del SARS-CoV-2 varía dependiendo del gen amplificado (Reina & Suarez, 2020).

En la infección sintomática por COVID-19, el ARN viral en frotis nasofaríngeo, medido por el umbral del ciclo (Ct), es detectable desde el día 1 de los síntomas y alcanza el máximo dentro de la primera semana del inicio de los síntomas (Sethuraman et al., 2020; Pinilla et al., 2020). La evolución temporal de la positividad y la seroconversión de la PCR puede variar en niños y otros grupos etarios, incluida la gran población de individuos asintomáticos. La positividad de la qPCR disminuye más lentamente en el esputo y aún puede ser positiva después de que los hisopados nasofaríngeos sean negativos.

En 205 pacientes con infección confirmada por COVID-19, la positividad fue más alta en las muestras de lavado broncoalveolar (93 %), seguida de esputo (72 %), frotis nasal (63 %) y frotis faríngeo (32 %). La persistencia de la qPCR positiva en el esputo y las heces fue similar (Sethuraman et al., 2020; Wölfel et al., 2020). En un ensayo de evaluación de la sensibilidad de la RT-qPCR se encontró mayor sensibilidad del gen E y del gen RdRp, respecto a otras dianas (5,2 y 3,8 copias por reacción respectivamente con una probabilidad de detección del 95 % para ambas). En este estudio el ensayo del gen N demostró que era menos sensible (Reina & Suarez, 2020; Corman et al., 2020).

Conocer el número indicativo del valor Ct, junto a su validación en el laboratorio responsable, mejoró la toma de decisiones con mayores garantías tanto en la predicción clínica como en la incorporación del paciente a sus actividades sociales (Cumplido-Serrano et al., 2021). Un estudio retrospectivo realizado en Nueva York mostró la relación entre el valor del Ct y la mortalidad o la necesidad de

intubación, asociándose de forma independiente el valor  $Ct < 25$  (en comparación con  $Ct > 30$ ) tanto con la mortalidad intrahospitalaria [ORajustado = 6,05 (IC 95 %: 2,92-12,52)] como con la necesidad de intubación [ORajustado = 2,73 (1,68-4,44)] (Cumplido-Serrano et al., 2021).

Algunos estudios mostraron relación entre valores de Ct y el resultado clínico de los pacientes. Además, se demostró relación entre el valor de Ct y la progresión a enfermedad grave e incluso mortalidad. Algunos parámetros, como aumento de lactato deshidrogenasa, disminución de linfocitos y el aumento de la troponina de alta sensibilidad mostraron una asociación con valores de Ct o carga viral (Aykac et al., 2021).

Si bien el valor de Ct es inversamente proporcional a la carga viral, esta correlación no es lineal, y muchos factores influyen en esta asociación: la recolección de muestras, el ensayo RT qPCR y el impacto del momento de la recolección de muestras, en etapa más temprana del curso de la enfermedad, habrá mayor carga viral. A pesar de estas limitaciones, existe interés generalizado entre los médicos sobre cómo el valor de la Ct puede utilizarse para una mejor gestión clínica de los pacientes infectados con SARS-CoV-2 (Shah et al., 2021).

Es así como diversos estudios, conforme la pandemia avanzó en el tiempo, se enfocaron en otras utilidades del Ct, como el hecho de predecir el aislamiento viral en cultivo celular demostrando que un valor de  $Ct < 24$  mostró correlación con la posibilidad de aislamiento viral, y  $Ct > 24$  mostró una fuerte correlación con una recuperación reducida del virus en cultivo celular. La positividad del cultivo disminuyó al aumentar hasta un Ct de 33 y el SARS CoV-2 no se pudo aislar de cualquier muestra con valor  $Ct > 34$ , estos autores dedujeron que los pacientes con valores de  $Ct > 34$  no excretan virus y por tanto tienen una reducida posibilidad de transmitir el virus (Al Bayat et al., 2021). Algunos estudios demuestran que a menor valor Ct se espera una clasificación de mayor gravedad de la COVID-19; no obstante, la mayoría mostraron que la correlación es débil (Chimoy-effio, 2022).

En otro estudio para predecir la gravedad de la

enfermedad, supervivencia y secuelas a seis meses utilizando el valor umbral del ciclo Ct, concluyeron que entre los pacientes sintomáticos hospitalizados y no hospitalizados, se demostró una asociación del valor de Ct (detectado en hisopos nasofaríngeos recolectados dentro de la primer semana desde el inicio del cuadro clínico) con muertes relacionadas a COVID-19, con la gravedad de la enfermedad, número de signos y síntomas en el momento del diagnóstico y con persistencia de secuelas a los 6 meses, estas relaciones se mantuvieron incluso después de ajustar otros parámetros relevantes que se espera que afecten la cantidad del virus al inicio de la infección (Trunfio et al., 2021). Otro estudio concluyó que los valores de Ct podrían usarse o informarse, pero con precaución para predecir de manera confiable la gravedad de la enfermedad (Shoaib et al., 2022).

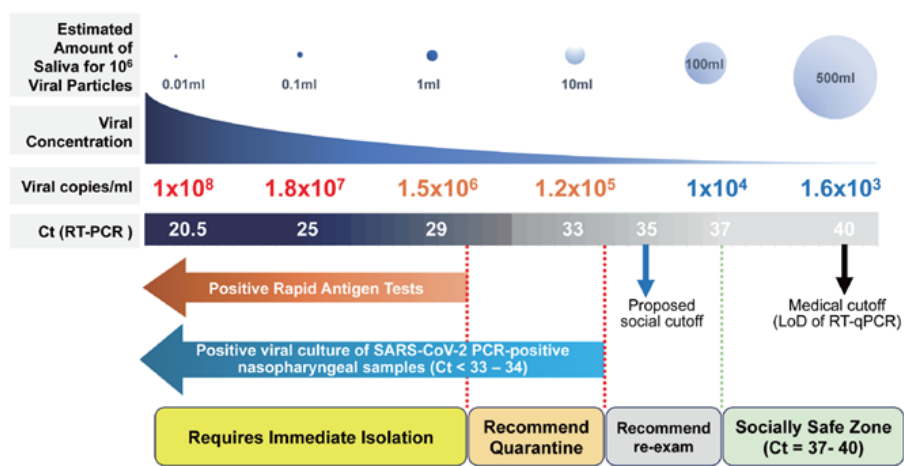
En un estudio de evaluación de 678 pacientes con COVID-19, un Ct más bajo (carga viral alta) se asoció con pacientes de mayor edad, con comorbilidades y tabaquismo y reciente quimioterapia. La mortalidad hospitalaria fue del 35,0 % (Ct <25; n = 220), del 17,6 % (Ct 25-30; n = 216) y del 6,2 % (Ct >30; n = 242) con carga viral alta, media y baja respectivamente (P < 0,001). El riesgo de intubación también fue mayor en pacientes con carga viral alta (29,1 %) en comparación con aquellos con una carga viral media (20,8 %) o baja (14,9 %; p < 0,001). La carga viral alta

fue independientemente asociada con la mortalidad (odds ratio ajustado [aOR], 6,05; intervalo de confianza [IC] del 95 %, 2,92–12,52) y la intubación (Ora, 2,73; IC 95 %, 1,68–4,44), concluyendo que la carga viral(Ct) al ingreso entre pacientes hospitalizados se correlaciona de forma independiente con el riesgo de intubación y mortalidad hospitalaria, proporcionar esta información a los médicos podría utilizarse potencialmente para guiar la atención al paciente (Magleby et al., 2021). Otros estudios encontraron valores de Ct más bajos en pacientes que fallecieron, sin embargo, el valor de Ct no fue significativamente asociado con un peor resultado clínico en el estudio de análisis multivariado (Martínez et al., 2022).

También se ha propuesto la utilidad del Ct de “corte social” y estratificación del riesgo basada en estudios que evalúan la correlación entre los valores de Ct y la infectividad como guía para una seguridad de niveles de actividad social con restricciones menos estrictas proponiendo una estratificación (Figura 1) de riesgo basada en valores de Ct de RT-qPCR y pruebas rápidas de antígenos (Oba et al., 2021). Finalmente, la cuantificación temprana por medio del Ct puede ser un marcador predictivo útil en la toma de decisiones en la gestión clínica y asignación de recursos (Trunfio et al., 2021).

**Figura 1**

Propuesta de estratificación de riesgo basada en valores de RT-qPCR y pruebas rápidas de antígenos.



Nota. Tomado de Oba J, et al: RT-qPCR Testing for COVID-19 with Saliva Samples, DOI: 10.2302/kjm.2021-0003-OA; Keio J Med 70 (2): 35–43, June 2021)

## Muestras para el diagnóstico de Infección de SARS-CoV-2

La toma del hisopado nasofaríngeo causa estornudos, tos y dolor nasofaríngeo en la mayoría de los casos, los pacientes generan gotitas o partículas de aerosol que son peligrosas para los trabajadores sanitarios que recogen estas muestras, esta exposición del personal sanitario dificulta la toma de muestras (World Health Organization, 2020a). Una alternativa no invasiva y confiable serían las pruebas de detección SARS-CoV-2 en saliva y secreción nasofaríngea que se compara con las pruebas de hisopado convencionales, obteniendo resultados comparables entre las muestras al momento de realizar la RTqPCR (man Leung et al., 2021) (Takeuchi et al., 2020; Fakheran et al., 2020).

## METODOLOGÍA

El objetivo fue evaluar la relación del cuadro clínico respecto al valor ciclo umbral (Ct) en la búsqueda de una asociación significativa que se pudiese utilizar como valor pronóstico, resultado de la interacción de estas variables y el Ct en la posible evolución clínica de pacientes COVID-19 ambulatorios. En la muestra se incluyeron pacientes mayores de 18 años con sintomatología respiratoria compatibles con COVID 19 dentro de los 14 días previos a la toma de muestra, con o sin historial de contacto con caso confirmado o sospechoso. Todo se sistematizó con check list de auto llenado rápido, solamente 479 participantes firmaron el consentimiento informado. Para el día de toma de la muestra se dieron recomendaciones a los participantes para que 1 hora antes de la toma no ingirieran alimentos sólidos, ni líquidos, excepto agua; no masticar golosinas o chicles, no fumar o utilizar vaporizador con o sin sabor; no utilizar algún tipo de spray bucal; no lavarse los dientes, ni utilizar enjuagues bucales o hilo dental y no utilizar productos cosméticos como pintalabios, bálsamos o cremas labiales. A todos los participantes se les indicó que deberían llevar su respectivo bolígrafo. Se recolectaron 479 muestras de 2 ml como volumen mínimo de una mezcla de saliva y secreción faríngea por carraspeo autotomada por el paciente utilizando tubos de polipropileno de 14 ml vacíos y estériles (sin medio de transporte o SSN), la recolección

fue realizada en espacios abiertos con distancia mayor a 5 metros entre cada persona. Las muestras recolectadas fueron trasladadas con cadena de frío hacia el laboratorio. Previo al procesamiento, las muestras se centrifugaron a 2000 RPM por 5 segundos y sin abrir los tubos se procedió a inactivar el virus a 65 °C por 30 minutos buscando una reducción mayor de 4 log de los coronavirus infectantes, esta temperatura se determinó de acuerdo con resultados de diversos estudios de inactivación de SARS-CoV2 por temperatura (Kampf et al., 2020) (Rabenau et al., 2005; Abraham et al., 2020). La extracción se realizó con el kit PureLink Viral RNA/DNA Mini Kit Invitrogen de ThermoFisher Scientific®. Los eluidos fueron conservados a -80 °C pos extracción. La concentración de ARN fue determinada por fluorimetría con Quantus fluorometer, Promega® siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó amplificación por RT-qPCR de los genes E y RdRp con dos protocolos: Charité, Berlin /EVAg (Corman et al., 2020b) con la AgPath-ID One-Step RT-PCR de ThermoFisher Scientific® y con el PowerChek 2019-nCoV Real-time PCR kit® (<https://www.fda.gov/media/140069/download>). Las amplificaciones se realizaron en el QuantStudio 5 Real-Time PCR instrument de Applied Biosystems®.

## Positividad de las muestras

Se consideraron como muestras positivas si los valores de Ct de los genes E y RdRp eran <39, y negativas cuando los valores de Ct de ambos objetivos eran  $\geq 39$ . Se estableció que a las muestras con resultados de Ct discordantes entre los genes investigados. Por ejemplo, muestras con gen E con un valor de Ct de 38 y gen RdRp con un valor de Ct de  $\geq 39$  o viceversa, se les repetiría el ensayo y si la discordancia persistía en esos valores de Ct estas se catalogaron como negativas. Las muestras positivas se almacenaron a -80 °C en alícuotas de 250  $\mu$ L para futuros proyectos de investigación. De las muestras positivas se seleccionaron 4 para ser secuenciadas por NGS en la plataforma MiniSeq Illumina con el kit de Paragon CleanPlex® SARS-CoV-2 by SOPHiA siguiendo el protocolo del fabricante. Para el alineamiento se utilizó la plataforma bioinformática SOPHiA-DDMV5.7.10. La toma y procesamiento de

muestra, amplificación y análisis de resultados de la Rt-qPCR y secuenciación NGS fueron realizados por el Laboratorio de Virología y Microbiología Molecular del Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de El Salvador.

### Análisis estadístico

El trabajo fue un estudio observacional, analítico y retrospectivo, donde se evaluaron los factores relacionados (signos y síntomas) con la carga viral SARS-CoV-2. Se determinó la carga viral, con base en la reacción de RT-qPCR y el valor umbral (CT). Se estratificaron dos grupos; carga viral alta (<30) y carga viral baja (>30). Los datos se registraron en una planilla de Excel, posteriormente fueron analizados con el software estadístico R 4.4.1. Se realizó el análisis descriptivo de las variables cualitativas mediante frecuencias absolutas y relativas, y para las cuantitativas con medidas de tendencia central. Luego, se efectuó análisis bivariado entre la variable dependiente y las covariables, con el empleo de la prueba de Ji cuadrado de independencia y la prueba T de Student. Se consideraron significativos valores de  $p \leq 0,05$ . Para el análisis estadístico de los factores de riesgo se midió la fuerza de la asociación con el Odds Ratio y sus intervalos de confianza (IC 95 %) y luego se aplicó la regresión logística binaria para el análisis multivariado, donde fueron incluidas las variables significativas resultantes del análisis bivariado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De 479 pacientes seleccionados con cuadro clínico respiratorio, 87 (18.1 %) fueron positivos a SARS CoV-2 para los genes RdRp y E (Figura 2) y 392 (81.9 %)

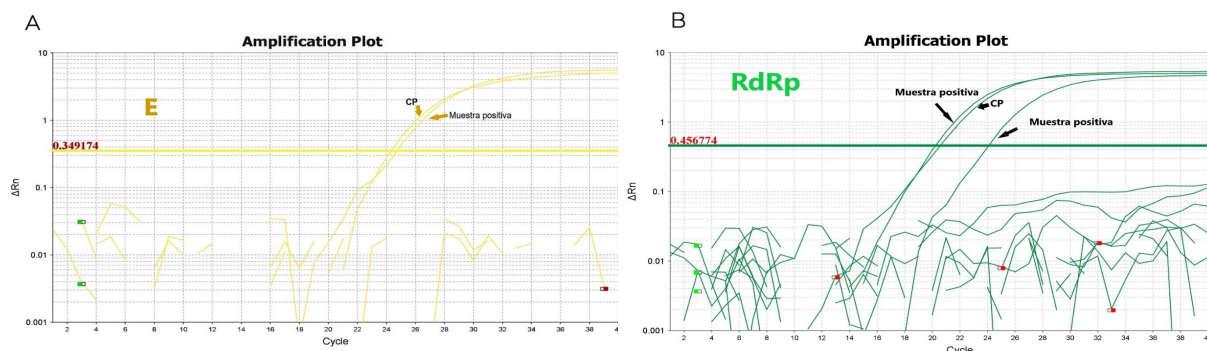
fueron negativos por Rt-qPCR para SARS-CoV-2. Entre los pacientes positivos, se categorizaron 36(41.4 %) personas con una carga viral alta (Ct<30) y 51(58.6 %) con carga viral baja (Ct>30). De las cuatro muestras positivas seleccionadas para secuenciación por NGS, las cuatro se confirmaron como positivas para SARS-CoV2, disponibles con los números de acceso GISAID-ID: EPI\_ISL\_3299814, EPI\_ISL\_3299422, EPI\_ISL\_3299050, EPI\_ISL\_3298771.

Las características demográficas y comorbilidades, comparadas entre los grupos de carga viral alta y baja se muestran en la Tabla 1. La edad promedio de los pacientes con RT-qPCR positivo fue de 44 años (SD: 12), el 52.9 % eran hombres y las comorbilidades asociadas más frecuentes fueron el contacto con personas positivas o sospechosas de COVID 19, fiebre, dolor de garganta y otros síntomas con un 80.5 %, 60.9 % y 51.7 %, respectivamente. En el grupo de carga viral alta, se observó una mayor proporción de hombres (58.3 %) y mayor frecuencia de los pacientes con contacto con personas positivas o sospechosas de COVID 19, ninguna variable resultó estadísticamente significativa. En el análisis multivariante, todas las variables predictoras en conjunto no presentaron valores significativos ( $p \geq 0.05$ , Tabla 1).

Es importante mencionar que las variables «rinorrea» y «cansancio» presentaron dependencia lineal (colinealidad), por lo que se realizó un análisis descriptivo a parte de los otros regresores (Figura 3). Entre los pacientes con una carga viral alta, el 78.0 % presentaron una sintomatología de rinorrea (Figura 3a), mientras que solamente el 33 % presentaron cansancio (Figura 3b).

**Figura 2**

A) Amplificación de gen E por RT-qPCR muestra saliva y secreción nasofaríngea. B) Amplificación de gen RdRp muestra de saliva y secreción nasofaríngea.



**Tabla 1**

*Características demográficas y comorbilidades con Covid-19 estratificadas por carga viral*

Carga Viral		N=87	<CTs30(N=36)	>CTs 30(N=51)	OR (univariable)	OR (multivariable)
	Mean (SD)	43.9 (12.4)	43.9 (12.1)	44.7 (12.7)	0.99 (0.95-1.02, p=0.503)	0.98 (0.94-1.02, p=0.422)
Género	masculino	46 (52.9)	21 (58.3)	25 (49.0)	1.46 (0.62-3.48, p=0.392)	1.14 (0.42-3.07, p=0.792)
	femenino	41 (47.1)	15 (41.7)	26 (51.0)	-	-
Fiebre	sí	53 (60.9)	25 (69.4)	28 (54.9)	1.87 (0.77-4.70, p=0.173)	1.21 (0.34-4.42, p=0.768)
	No	34 (39.1)	11 (30.6)	23 (45.1)	-	-
Tos seca	Sí	32 (36.8)	15 (41.7)	17 (33.3)	1.43 (0.59-3.47, p=0.428)	3.86 (0.90-19.54, p=0.080)
	No	55 (63.2)	21 (58.3)	34 (66.7)	-	-
Tos productiva	Sí	38 (43.7)	18 (50.0)	20 (39.2)	1.55 (0.66-3.70, p=0.319)	4.10 (0.86-23.23, p=0.089)
	No	49 (56.3)	18 (50.0)	31 (60.8)	-	-
Estornudos	Sí	68 (78.2)	28 (77.8)	40 (78.4)	0.96 (0.34-2.77, p=0.942)	0.32 (0.06-1.41, p=0.144)
	No	19 (21.8)	8 (22.2)	11 (21.6)	-	-
Dificultad Respiratoria	Sí	25 (28.7)	12 (33.3)	13 (25.5)	1.46 (0.57-3.75, p=0.427)	0.98 (0.32-3.02, p=0.973)
	No	62 (71.3)	24 (66.7)	38 (74.5)	-	-
Pérdida olfato	Sí	32 (36.8)	14 (38.9)	18 (35.3)	1.17 (0.48-2.82, p=0.732)	0.83 (0.15-4.15, p=0.826)
	No	55 (63.2)	22 (61.1)	33 (64.7)	-	-
Pérdida gusto	Sí	30 (34.5)	14 (38.9)	16 (31.4)	1.39 (0.57-3.42, p=0.468)	0.93 (0.20-4.57, p=0.926)
	No	57 (65.5)	22 (61.1)	35 (68.6)	-	-
Dolor garganta	Sí	45 (51.7)	22 (61.1)	23 (45.1)	1.91 (0.81-4.63, p=0.143)	1.68 (0.40-7.38, p=0.479)
	No	42 (48.3)	14 (38.9)	28 (54.9)	-	-
Contacto paciente COVID 19	Sí	70 (80.5)	27 (75.0)	43 (84.3)	0.56 (0.19-1.63, p=0.284)	0.40 (0.11-1.37, p=0.151)
	No	17 (19.5)	9 (25.0)	8 (15.7)	-	-
Vacunado	Sí	35 (40.2)	17 (47.2)	18 (35.3)	1.64 (0.69-3.95, p=0.265)	1.57 (0.45-5.71, p=0.484)
	No	52 (59.8)	19 (52.8)	33 (64.7)	-	-



Las variables: letalidad (N: 1 letalidad) se presentó en el grupo de Cts < de 30, necesidad de atención hospitalaria y uso de tratamiento antiviral e interferón(N: 4) se asociaron a Cts menores de 30 (N:3) y Cts mayores o iguales a 30 (N:1); por la baja frecuencia presentada por estas variables no se procesaron con el modelo de regresión logística, sin embargo, se destaca que estas variables se presentaron en los casos con mayor carga viral.

La representación gráfica de los Odds Ratio (OR) y sus intervalos de confianza del 95 % de cada uno

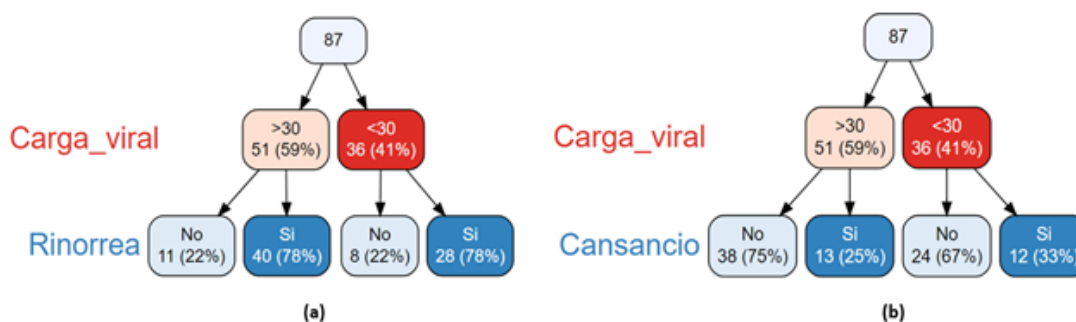
de los factores de riesgo de carga viral en pacientes positivos lo podemos observar en la Figura 4, donde vemos que ninguno resultó estadísticamente significativo ( $p \geq 0.05$ ), además los intervalos de confianza incluyen el valor de 1.

### DISCUSIÓN

La detección del SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR no garantiza la presencia de virus infectivos, aunque valores de Ct bajos se asocian con mayor infectividad y carga viral; debido a esto se ha estudiado el valor

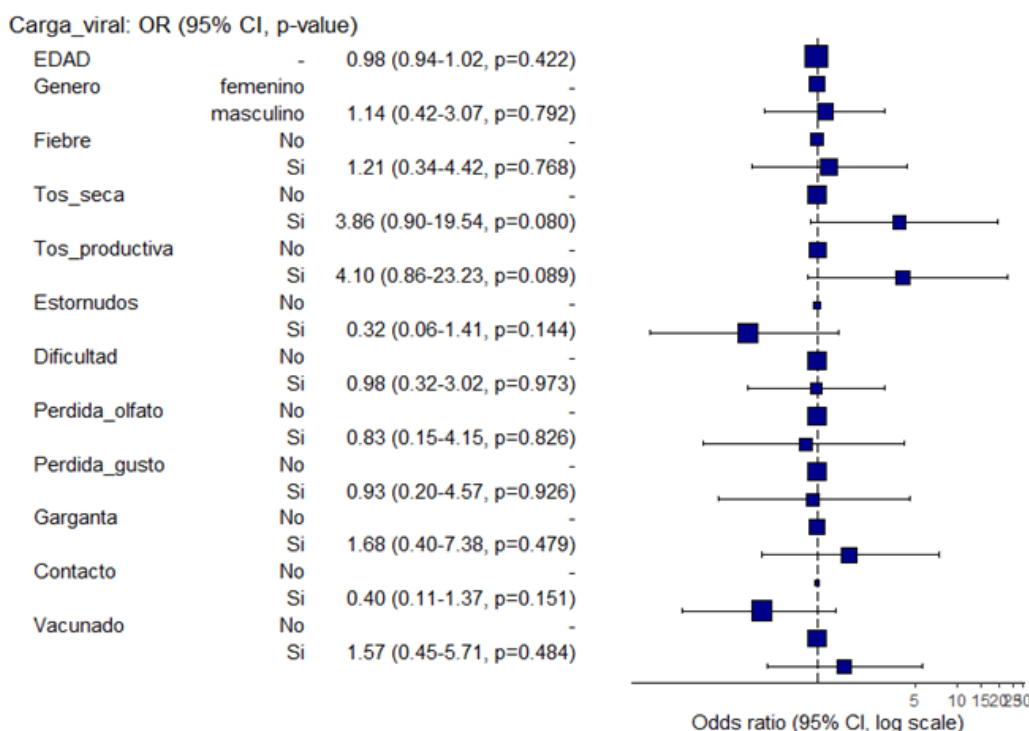
**Figura 3**

Diagrama de los factores rinorrea (a) y cansancio respecto a la carga viral (b).



**Figura 4**

Gráfico de OR representando los resultados de análisis de regresión logística binaria multivariada



Ct como indicador de gravedad en infecciones respiratorias (Aykaç et al., 2021), pero algunos resultados de los referidos estudios indican su utilidad en COVID-19 es debatida. En el presente estudio no se encontró una relación significativa entre síntomas que sugieren mayor gravedad de la enfermedad respecto de los Cts más bajos (<30 Cts), esto coincide con estudios que encontraron una relación muy débil entre el valor Cts bajos y la gravedad de la infección, sin embargo a pesar de estos resultados, en esos mismos estudios se observó que los casos graves tenían cargas virales más altas y que los sintomáticos presentan valores de Ct más bajos que los asintomáticos (Cumplido-Serrano et al., 2021; Aykaç et al., 2021), coincidentemente con este estudio, y a pesar de la baja frecuencia de la variable «letalidad» (N: 1 letalidad) esta se agrupó con carga viral más alta, así mismo la variable «necesidad de atención hospitalaria, uso de tratamiento antiviral e interferón»(N:3) se asoció a CTs menores de 30. De manera similar, el cansancio y dificultad para respirar, aunque estadísticamente no significativo, fue mayor en el grupo de carga viral alta.

Otro aspecto a tomar en cuenta es la muestra de secreción nasofaríngea utilizada para el presente trabajo, ya que algunos estudios han demostrado que las muestras del tracto respiratorio superior, tienen menor carga viral que las del tracto respiratorio inferior, lo que podría incidir importantemente en la correlación clínica o de gravedad y el valor umbral Ct, coincidentemente estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios que utilizaron una muestra similar o que evaluaron la carga viral en vía aérea superior e inferior (Chimoy-effio, 2022; Martínez et al., 2022).

El hecho de que las variables clínicas operacionalizadas con el modelo aplicado no hayan presentado correlación significativa o esta fue muy débil, podría parecer contradictorio, pero es coincidente con estudios similares que encontraron valores de Ct más bajos en pacientes que fallecieron o que tenían COVID grave, pero que en el análisis estadístico de estos estudios el valor de Ct bajo no fue significativamente asociado con un peor resultado de la enfermedad en el análisis multivariado.

En el grupo de carga viral alta <30 Ct, se observó una mayor proporción de hombres (58.3 %) y mayor frecuencia de los pacientes con contacto con personas positivas o sospechosas de COVID 19, pero al igual que el resto de variables no resultaron estadísticamente significativas ( $p \geq 0.05$ ), coincidiendo con estudios que revelan que el sexo puede o no mostrar una asociación significativa con el valor Ct; y otros estudios que han demostrado no asociación del sexo y umbral Cts (Chimoy-effio, 2022; Shah et al., 2021).

En lo concerniente a la edad tampoco se evidenció correlación significativa en los pacientes de mayor edad, su clínica y el valor umbral Ct, de forma similar otros estudios indican que en los pacientes mayores de 65 años de edad no se observó significancia estadística entre su estado clínico y el valor umbral Ct (Cumplido-Serrano et al., 2021; Aykaç et al., 2021; Chimoy-effio, 2022; Shah et al., 2021).

## LIMITANTES

A pesar de que algunos estudios no encontraron correlación entre el Ct y la gravedad, otros sugieren que factores como comorbilidades y el tiempo desde el inicio de síntomas son más relevantes, variables que no se pudieron tomar en cuenta en el presente estudio.

La muestra de vía respiratoria alta utilizada que difiere significativamente de la muestra de vía respiratoria baja respecto a la carga viral, el estadio de la infección, y el hecho que el umbral Ct no es una medida directa de carga viral, junto con una muestra limitada de pacientes positivos (N:87) podrían haber influido en los resultados del presente estudio.

## CONCLUSIÓN

Acorde con los resultados, hay evidencia para indicar que a menor Ct se podría esperar una clasificación de mayor gravedad de la COVID-19, sobre todo cuando la variable letalidad y cuadros más graves se presentaron en el grupo de umbral Cts más bajo <30; no obstante, debido al tamaño de la muestra estudiada no se pudo demostrar asociación significativa de estas variables, ni del resto de signos y síntomas respecto al umbral Ct. Es importante

destacar que a pesar de que algunos estudios han logrado demostrar corrección entre gravedad y umbral Ct, esta correlación es débil y se reconoce que el valor Ct de una misma muestra puede ser influenciada por variados factores limitantes descritos anteriormente. La utilidad del Ct como predictor de gravedad de COVID-19 y para otras infecciones virales respiratorias debería ser sometida a estudios más rigurosos y con muestra más representativa, mientras tanto dada la información disponible y los resultados del presente estudio se confirma que la utilidad del umbral Ct en el pronóstico clínico de los pacientes COVID-19 se acompaña de ciertas limitaciones, que requieren mayores estudios estadísticos, en donde se compare el valor Ct con la verdadera carga viral, se compare con muestras de vías respiratoria inferiores y además relacionando el valor Ct con otras variables como comorbilidades, vejez y secuelas post COVID 19 entre otras, en todo caso si se decide utilizar el valor Ct como factor pronóstico de pacientes COVID-19 debe hacerse con precaución y conscientes de las limitaciones antes mencionadas.

### CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflictos de interés en el estudio ni haber recibido patrocinio de instituciones privadas; la fuente de financiamiento utilizada fueron recursos estatales designados para investigación.

### CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente trabajo fue elaborado y ejecutado tomando en cuenta las guías éticas de experimentación humana y en respeto estricto con la declaración de Helsinki. De igual forma la investigación fue avalada por la Unidad de Investigaciones Científicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de El Salvador; todos los participantes firmaron y aceptaron las condiciones del consentimiento informado, todos los pacientes que no firmaron o aceptaron parcialmente las condiciones del consentimiento informado fueron excluidos del estudio. Todas las muestras fueron manejadas por un número de referencia asignado por el laboratorio por lo que los resultados de los mismos siempre fueron anonimizados y los

investigadores no tuvieron acceso a la identidad de los pacientes.

### AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos especiales a la Sección de Virología del Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de El Salvador. De manera especial el apoyo de la Unidad de Investigaciones Científicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de El Salvador (UNICA).

### REFERENCIAS

- Abraham, J. P., Plourde, B. D., & Cheng, L. (2020). Using heat to kill SARS-CoV-2. *Reviews in Medical Virology*, 30(5), 8–10. <https://doi.org/10.1002/rmv.2115>
- Al Bayat, S., Mundodan, J., Hasnain, S., Sallam, M., Khogali, H., Ali, D., Alateeg, S., Osama, M., Elberdiny, A., Al-Romaihi, H., & Al-Thani, M. H. J. (2021). Can the cycle threshold (Ct) value of RT-PCR test for SARS CoV2 predict infectivity among close contacts? *Journal of Infection and Public Health*, 14(9), 1201–1205. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.08.013>
- Aykac, K., Cura Yayla, B. C., Ozsurekci, Y., Evren, K., Oygur, P. D., Gurlevik, S. L., Coskun, T., Tasci, O., Demirel Kaya, F., Fidanci, I., Tasar, M. A., Alp, A., Cengiz, A. B., Karahan, S., & Ceyhan, M. (2021). The association of viral load and disease severity in children with COVID-19. *Journal of Medical Virology*, 93(5), 3077–3083. <https://doi.org/10.1002/jmv.26853>
- Chen, Y., Liu, Q., & Guo, D. (2020). Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of Medical Virology*, 92(4), 418–423. <https://doi.org/10.1002/jmv.25681>
- Chimoy-effio, P. J. (2022). Ct Relacion Clasif Clinica. 39(1), 35–44.
- Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K. W., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Luisa Schmidt, M., GJC Mulders, D., Haagmans, B. L., van der Veer,

- B., van den Brink, S., Wijsman, L., Goderski, G., Romette, J.-L., Ellis, J., Zambon, M., ... Chantal, R. (2020a). Detection of 2019 -nCoV by RT-PCR. *Euro Surveill*, 25(3), 1–8.
- Corman, V., Bleicker, T., Brünink, S., Drosten, C., Landt, O., Koopmans, M., & Zambon, M. (2020b). Diagnostic detection of Wuhan coronavirus 2019 by real-time RT-PCR Corman V, Bleicker T, Brünink S, Drosten C, Zambon M, World Health Organization: Diagnostic detection of Wuhan coronavirus 2019 by real-time RT-PCR. Geneva: World Health Organization.
- Covax. Colaboración para un acceso equitativo mundial a las vacunas contra la COVID-19. (2024). <https://www.who.int/es/initiatives/act-accelerator/covax>.
- Cumplido Serrano, A., Ruiz Garcia, A., Segura-Fragoso, A., Olmo-Quintana, V., Micó Pérez, R. M., Barquilla-García, A., & Morán-Bayón, A. (2021). Application of the PCR number of cycle threshold value (Ct) in COVID-19. *Semergen*, 47(5), 337–341. <https://doi.org/10.1016/j.semerng.2021.05.003>
- Dong, E., Du, H., & Gardner, L. (2020). An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(5), 533–534. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30120-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30120-1)
- ElBagoury, M., Tolba, M. M., Nasser, H. A., Jabbar, A., & Hutchinson, A. (2020). The find of COVID-19 vaccine: Challenges and opportunities. *Journal of Infection and Public Health*, 14(3), 389–416. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.12.025>
- Fakheran, O., Dehghannejad, M., & Khademi, A. (2020). Saliva as a diagnostic specimen for detection of SARS-CoV-2 in suspected patients: A scoping review. *Infectious Diseases of Poverty*, 9(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s40249-020-00728-w>
- Herzog, L. M., Norheim, O. F., Emanuel, E. J., & McCoy, M. S. (2021). Covax must go beyond proportional allocation of covid vaccines to ensure fair and equitable access. *The BMJ*, 372, 2–4. <https://doi.org/10.1136/bmj.m4853>
- Kampf, G., Voss, A., & Scheithauer, S. (2020). Inactivation of coronaviruses by heat. *Journal of Hospital Infection*, 105(2), 348–349. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.03.025>
- Magleby, R., Westblade, L. F., Trzebucki, A., Simon, M. S., Rajan, M., Park, J., Goyal, P., Safford, M. M., & Satlin, M. J. (2021). Impact of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viral Load on Risk of Intubation and Mortality among Hospitalized Patients with Coronavirus Disease 2019. *Clinical Infectious Diseases*, 73(11), E4197–E4205. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa851>
- man Leung, E. C., ying Chow, V. C., ping Lee, M. K., & man Lai, R. W. (2021). Deep throat saliva as an alternative diagnostic specimen type for the detection of SARS-CoV-2. *Journal of Medical Virology*, 93(1), 533–536. <https://doi.org/10.1002/jmv.26258>
- Martínez, M. J., Basile, L., Sisó-Almirall, A., Cristino, V., Cuesta, G., Hurtado, J. C., Fernandez-Pittol, M., Mosquera, M. M., Soriano, A., Martínez, A., Marcos, M. aA, Vila, J., & Casals-Pascual, C. (2022). Lack of Prognostic Value of SARS-CoV2 RT-PCR Cycle Threshold in the Community. *Infectious Diseases and Therapy*, 11(1), 587–593. <https://doi.org/10.1007/s40121-021-00561-0>
- Oba, J., Taniguchi, H., Sato, M., Takamatsu, R., Morikawa, S., Nakagawa, T., Takaishi, H., Saya, H., Matsuo, K., & Nishihara, H. (2021). RT-PCR screening tests for SARS-CoV-2 with saliva samples in asymptomatic people: Strategy to maintain social and economic activities while reducing the risk of spreading the virus. *Keio Journal of Medicine*, 70(2), 35–43. <https://doi.org/10.2302/kjm.2021-0003-OA>
- Perlman, S., & Netland, J. (2009). Coronaviruses post-SARS: Update on replication and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*,

- 7(6), 439–450. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2147>
- Pinilla, G., Cruz, C. A., & Navarrete, J. (2020). Diagnóstico molecular de SARS-CoV-2 Molecular diagnosis of SARS-CoV-2. *Nova*, 18, 35–41.
- Rabenau, H. F., Cinatl, J., Morgenstern, B., Bauer, G., Preiser, W., & Doerr, H. W. (2005). Stability and inactivation of SARS coronavirus. *Medical Microbiology and Immunology*, 194(1–2), 1–6. <https://doi.org/10.1007/s00430-004-0219-0>
- Randolph, H. E., & Barreiro, L. B. (2020). Herd Immunity: Understanding COVID-19. *Immunity*, 52(5), 737–741. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.012>
- Reina, J., & Suarez, L. (2020). Evaluación de diferentes genes en la detección por rt-pcr del sars-cov-2 en muestras respiratorias y su evolución en la infección. *Revista Espanola de Quimioterapia*, 33(4), 292–293. <https://doi.org/10.37201/req/045.2020>
- Sethuraman, N., Jeremiah, S. S., & Ryo, A. (2020). Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 323(22), 2249–2251. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.8259>
- Shah, V. P., Farah, W. H., Hill, J. C., Hassett, L. C., Binnicker, M. J., Yao, J. D., & Hassan Murad, M. (2021). Association between SARS-CoV-2 Cycle Threshold Values and Clinical Outcomes in Patients with COVID-19: A Systematic Review and Meta-analysis. *Open Forum Infectious Diseases*, 8(9), 1–12. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofab453>
- Shoaib, N., Noureen, N., Faisal, A., Zaheer, M., Imran, M., Ahsan, A., Munir, R., & Zaidi, N. (2022). Factors associated with cycle threshold values (Ct-values) of SARS-CoV2-rRT-PCR. *Molecular Biology Reports*, 49(5), 4101–4106. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07360-x>
- Stegeman I, Ochodo EA, Guleid F, Holtman GA, Yang B, Davenport C, Deeks JJ, Dinnes J, D., S, Emperador D, Hoo) L, Spijker R, Takwoingi Y, Van den Bruel A, Wang J, L. M., & Verbakel JY, Leeflang MMG, C. C.-19 D. T. A. G. (2020). Routine laboratory testing to determine if a patient has COVID-19 (Review), 10.1002/14651858.CD013787. [www.cochranelibrary.com](http://www.cochranelibrary.com). *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013787>. [www.cochranelibrary.com](http://www.cochranelibrary.com)
- Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A. C. K., Zhou, J., Liu, W., Bi, Y., & Gao, G. F. (2016). Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends in Microbiology*, 24(6), 490–502. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.003>
- Takeuchi, Y., Furuchi, M., Kamimoto, A., Honda, K., Matsumura, H., & Kobayashi, R. (2020). Saliva-based pcr tests for sars-cov-2 detection. *Journal of Oral Science*, 62(3), 350–351. <https://doi.org/10.2334/josnusd.20-0267>
- Trunfio, M., Venuti, F., Alladio, F., Longo, B. M., Burdino, E., Cerutti, F., Ghisetti, V., Bertucci, R., Picco, C., Bonora, S., Perri, G. Di, & Calcagno, A. (2021). COVID-19 Symptomatic Patients. *Viruses*, 13(281), 1–14.
- Wölfel, R., Corman, V. M., Guggemos, W., Seilmaier, M., Zange, S., Müller, M. A., Niemeyer, D., Jones, T. C., Vollmar, P., Rothe, C., Hoelscher, M., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Ehmann, R., Zwirgmaier, K., Drosten, C., & Wendtner, C. (2020). Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*, 581(7809), 465–469. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Lam, C. S. F., Lau, C. C. Y., Tsang, A. K. L., Lau, J. H. N., Bai, R., Teng, J. L. L., Tsang, C. C. C., Wang, M., Zheng, B.-J., Chan, K.-H., & Yuen, K.-Y. (2012). Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavi.

Journal of Virology, 86(7), 3995–4008. <https://doi.org/10.1128/jvi.06540-11>

World Health Organization (WHO). (2020a). Pruebas diagnósticas para el SARS-CoV-2. Orientaciones provisionales. 11 de septiembre de 2020. World Health Organization.

World Health Organization (WHO). (2020b). Draft landscape and tracker of COVID-19 candidate vaccines. Who, June, 3. [https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines%0Ahttps://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate](https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines%0Ahttps://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines%0Ahttps://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate)

Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y. M., Wang, W., Song, Z. G., Hu, Y., Tao, Z. W., Tian, J. H., Pei, Y. Y., Yuan, M. L., Zhang, Y. L., Dai, F. H., Liu, Y., Wang, Q. M., Zheng, J. J., Xu, L., Holmes, E. C., & Zhang, Y. Z. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 579 (7798), 265–269. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>