

EDITORIAL

REVISTA ARGENTINA
DE SALUD PÚBLICA
Suplemento COVID-19

FECHA DE RECEPCIÓN: 30 de abril de 2020

FECHA DE ACEPTACIÓN: 05 de mayo de 2021

FECHA DE PUBLICACIÓN: 31 de mayo de 2021

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:

marianabsalmeron@gmail.com

SOBRESTIMACIÓN DE CASOS COVID-19 SOBRE LA BASE DE LOS RESULTADOS DE LA RRT-PCR PARA LA DETECCIÓN DE SARS-COV-2

Overestimation of COVID-19 cases based on results of the rRT-PCR for detection of SARS-CoV-2

* Mariana B. Salmerón¹. Bioquímica microbióloga.

¹ Departamento Bioquímico, Laboratorio de Salud Pública, San Miguel de Tucumán, Argentina.

RESUMEN. La detección de genoma viral mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (rRT-PCR) para detectar virus SARS CoV-2, se considera como referencia para la definición de caso de enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) confirmado por laboratorio. Sin embargo, no es lo mismo detectar genoma viral que diagnosticar una enfermedad, y la sensibilidad de detección de la técnica puede exceder la significancia clínica. En microbiología, la jerarquización de un resultado positivo depende de factores como el contexto clínico y epidemiológico, el sitio de toma de muestra y, en muchos casos, la cuantificación del patógeno. Un parámetro fundamental de la rRT-PCR es el ciclo umbral. De su interpretación depende la clasificación de una persona como caso confirmado. Por otro lado, los valores predictivos de una prueba varían según la prevalencia de la patología buscada. Dado que las pruebas positivas obtenidas en diferentes escenarios se consideran de manera equivalente como casos confirmados, con independencia de los signos y síntomas, puede haberse producido una sobrestimación de los casos reales de COVID-19, principalmente en función de testeos realizados en población general. Es fundamental el entrenamiento del personal y la realización de controles de calidad en los laboratorios de diagnóstico, así como definir niveles de corte de ciclo umbral predictivos de infectividad en centros de referencia para minimizar el impacto de resultados falsos en la sociedad.

PALABRAS CLAVE: SRAG-CoV-2, COVID-19, Reacción en Cadena en Tiempo Real de la Polimerasa, Reacciones Falso Positivas, Valor Predictivo de las Pruebas.

ABSTRACT. *The detection of the viral genome using the real-time reverse transcription polymerase chain reaction (rRT-PCR) technique to detect the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS CoV-2) is considered as a reference for the case definition of coronavirus disease 2019 (COVID-19), laboratory confirmed. However, detecting a viral genome is not the same as diagnosing a disease, and its detection sensitivity may exceed clinical significance. In Microbiology, the ranking of a positive result depends on factors such as clinical/epidemiological context, sample collection site and, in many cases, quantification of the pathogen. A fundamental parameter of rRT-PCR is the threshold cycle. The classification of a person as a confirmed case depends on its interpretation. On the other hand, the predictive values of a test vary according to the prevalence of the pathology sought. Given that the positive tests obtained in different scenarios are considered equivalently as confirmed cases, regardless of signs and symptoms, there may have been an overestimation of the real cases of COVID-19 disease, mainly based on tests carried out in the general population. It is essential to train personnel and carry out quality controls in diagnostic laboratories, as well as define threshold cycle cutoff levels that are predictive of infectivity in reference centers, to minimize the impact of false results on society.*

KEY WORDS: SARS-CoV-2, COVID-19, Real-time Polymerase Chain Reaction, False Positive Reactions, Predictive Value of Tests.

En su revisión, publicada en esta revista, el Dr. Pablo Goldschmidt describe las limitaciones de la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (rRT-PCR) para detectar el coronavirus asociado a síndrome respiratorio agudo grave 2 (SARS-CoV-2), cuando se la utiliza como única prueba de infección y evaluación del riesgo para la salud pública¹. En la práctica clínica, la técnica se considera como referencia para la detección de genoma viral en la fase aguda de la infección. Pero no es lo mismo detectar genoma viral que diagnosticar una enfermedad. La PCR puede ser excelente para detectar secuencias del virus, pero no para hacer diagnóstico de enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19). Evidencia de esto es la gran cantidad de resultados positivos obtenidos en personas sanas. Se estima que una tercera parte de las infecciones por SARS-CoV-2 son asintomáticas, y que casi tres cuartas partes de las personas que reciben un resultado positivo de PCR y no presentan síntomas en el momento del testeo, permanecerán asintomáticas². Por otro lado, en personas con síntomas respiratorios inespecíficos, considerar que el hallazgo de una secuencia viral establece causalidad tampoco es correcto, dado que no se realiza una búsqueda sistemática con la misma técnica de todos los otros posibles patógenos que pueden presentar el mismo cuadro clínico. Algunos agentes virales conocidos asociados a enfermedad respiratoria en seres humanos incluyen los virus sincitial respiratorio, parainfluenza, influenza A y B, adenovirus, coronavirus, rinovirus, metapneumovirus y bocavirus³. Además, se han detectado poliovirus en pacientes con cuadros respiratorios⁴. Por otro lado, afecciones como fiebre, diarrea y enfermedades respiratorias pueden ser causadas por virus desconocidos o no diagnosticados⁵. Algunos cuadros alérgicos también producen síntomas similares.

Es crucial interpretar de manera correcta un resultado positivo cuando la PCR se aplica al diagnóstico de enfermedades infecciosas, aun cuando en términos estrictamente técnicos, sea un verdadero positivo. El diagnóstico molecular para detectar microorganismos de importancia en la práctica clínica significó una gran revolución por sus ventajas en comparación con métodos tradicionales de cultivo microbiológico, principalmente en el acortamiento de los tiempos en el diagnóstico y en la practicidad. Sin embargo, desde su uso en este ámbito, también se reconocieron las principales limitaciones. Un punto crucial es que su sensibilidad de detección excede en muchos casos la significancia clínica. Los ensayos de PCR pueden detectar patógenos en concentraciones por debajo de los métodos considerados de referencia. Distinguir si un resultado representa un falso positivo y establecer su importancia clínica fue y sigue siendo un desafío. Para definir si tales hallazgos indican latencia, procesos de enfermedad o colonización subclínica se requieren pautas interpretativas basadas en la correlación de resultados con la clínica y con las normas existentes, antes de utilizarlos para decisiones de diagnóstico y tratamiento⁶.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) definió como caso confirmado de COVID-19 a toda persona con infección por el virus confirmada en laboratorio, con independencia de los signos y síntomas clínicos⁷. También estableció que la confirmación de la infección aguda por SARS-CoV-2 se basa en la detección de secuencias virales mediante pruebas de amplificación de ácidos nucleicos, y que para el testeo deben recolectarse principalmente muestras respiratorias⁸.

En microbiología, la jerarquización de un resultado positivo depende de factores como el contexto clínico y epidemiológico, el sitio de toma de muestra y, en muchos casos, la cuantificación del patógeno. La definición de un diagnóstico se complementa con estudios generales de laboratorio (como hemograma y marcadores de inflamación de fase aguda) y otros, como los estudios por imágenes.

La complejidad de la interpretación de un resultado positivo de PCR para agentes microbianos es mayor al tener en cuenta que la detección de secuencias genéticas en un sitio anatómico no estéril, como es el tracto respiratorio, no necesariamente implica la presencia de partículas virales completas, infectivas y capaces de transmitirse a otras personas. En la estrategia de testeos masivos aplicada para detección de SARS-CoV-2 por PCR, es aún más difícil jerarquizar los resultados, dado que se han obtenido en contextos clínicos y epidemiológicos variables, a diferencia de la vigilancia tradicional de virus respiratorios como el virus influenza, donde el análisis de una muestra por PCR u otra técnica solo se realiza ante la sospecha clínica en un paciente sintomático.

En la rRT-PCR, un parámetro fundamental que debe considerarse cuando una muestra presenta señal, es el valor de ciclo umbral (Ct, por su sigla en inglés). Este se define como el número de ciclos de amplificación necesarios para que la señal de fluorescencia del producto generado en la reacción cruce un valor umbral determinado⁹. El Ct proporciona una medida relativa de la concentración de la secuencia diana en una muestra y de su interpretación depende la clasificación de una persona como positiva o negativa y, por lo tanto, como caso confirmado o no, con todas las consecuencias epidemiológicas y socioeconómicas que ello implica, tanto en el nivel individual como comunitario.

En uno de sus documentos, la OMS informa que el Ct necesario para detectar virus es inversamente proporcional a la carga viral del paciente¹⁰. Es importante destacar que muchos factores influyen en el valor de Ct, además de la cantidad real de copias de secuencia diana presentes. La toma de muestra es crítica y de su correcta realización depende que el resultado refleje, en mayor o menor medida, la carga viral del paciente. A diferencia de muestras como, por ejemplo, el plasma, en las que se puede partir de un volumen definido, en las muestras respiratorias hay mayor variabilidad, y estandarizar el volumen de secreción obtenido con hisopo o por lavado

broncoalveolar es mucho más difícil y depende de múltiples factores técnicos. Otras variables que afectan el Ct incluyen la forma de establecer la línea umbral en cada corrida, los diferentes equipos de extracción de material genético, el tipo de PCR utilizada (sean de uso doméstico o kits comerciales que detectan diferentes regiones genéticas), y la combinación de estos dos últimos factores, que puede incluso cambiar en cada laboratorio en el tiempo, según su disponibilidad en el mercado. Todas estas variables dificultan la comparación inter e intralaboratorio para definir puntos de corte.

Si bien es difícil predecir en qué proporción influyen todos estos factores en los valores de Ct, es necesario evaluar la capacidad de la técnica para diferenciar entre personas infectadas e infecciosas de las que no lo son, con una certeza razonable, para evitar el aislamiento de aquellas que no representan una amenaza para la salud pública. Un cuerpo creciente de evidencia muestra que tal objetivo no puede lograrse con precisión mediante el abordaje binario de resultados de PCR positivos o negativos. Una revisión de la Universidad de Oxford evaluó estudios que comparan el cultivo del SARS CoV-2 en líneas celulares (considerado el mejor indicador de infección e infectividad) con los resultados de la rRT-PCR¹¹. En uno de ellos, donde se usó como diana el gen E, se observa que todas las muestras con valores de Ct de 13 a 17 tuvieron resultados positivos en el cultivo. La tasa de recuperación viral disminuyó en forma progresiva hasta 12% para un Ct de 33. No se obtuvo cultivo positivo a partir de muestras con Ct >34¹². En otro estudio se encontró infectividad de células Vero solo en muestras con Ct menor a 24¹³.

Sobre la base de estos datos, puede inferirse que, según el protocolo utilizado, una mayor o menor proporción de resultados informados como positivos en función del punto de corte del Ct considerado en cada laboratorio serían falsos positivos, dado que no corresponden a muestras infectivas. La interpretación de la rRT-PCR no validada contra el cultivo viral propicia falsos positivos que implican el aislamiento de muchas personas que no están enfermas ni son infecciosas¹¹.

Otro aspecto para considerar son los valores predictivos de una prueba diseñada para auxiliar en el diagnóstico de una patología. Al aplicar una prueba, necesitamos saber la probabilidad de que su resultado indique el diagnóstico correcto. La sensibilidad y la especificidad determinadas por el fabricante o diseñador no dan esa información. Los valores predictivos positivo y negativo (VPP y VPN, respectivamente) en la práctica clínica dependen críticamente de la prevalencia de la condición en la población testeada, que puede ser diferente a la de un estudio publicado que evalúe la utilidad de la prueba¹⁴.

Es de esperar que el desempeño y los valores predictivos de la PCR cambien en cada escenario donde se aplica: el manejo clínico de la COVID-19, las investigaciones de conglomerados de casos y la vigilancia de salud pública¹⁵. Por ejemplo, en pacientes internados, la técnica puede tener un menor VPN y ante una alta sospecha clínica con una prueba negativa, la conducta es repetir el análisis con otro método o tomar una nueva muestra. En cambio, en los testeos de personas ambulatorias sin síntomas o con cuadros clínicos inespecíficos atribuibles también a otros patógenos o causas no investigadas con la misma intensidad que SARS-CoV-2, se prevé un VPP menor. Dado que las pruebas positivas obtenidas en circunstancias tan variadas se consideran de manera equivalente como casos confirmados, puede haberse producido una sobrestimación de casos reales de enfermedad COVID-19, principalmente en función de la utilización de la técnica en la población general, fuera del circuito clínico tradicional de vigilancia de virus respiratorios.

Varias medidas pueden ayudar a minimizar los resultados falsos y las posibles consecuencias. En los laboratorios de diagnóstico, es fundamental el entrenamiento del personal y la realización de controles de calidad internos y externos. En centros de referencia con capacidad para realizar cultivo viral, se recomienda evaluar su correlación con los valores de Ct por PCR para definir niveles de corte predictivos de infectividad, como se aconseja en la revisión de Heneghan¹¹.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES: No hubo conflicto de intereses durante la realización del editorial.

Cómo citar este artículo: Salmerón MB. Sobrestimación de casos de COVID-19 sobre la base de los resultados de la rRT-PCR para la detección de SARS-CoV-2. *Rev Argent Salud Pública*. 2021;13 Supl COVID-19: e30. Publicación electrónica 31 May 2021.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

¹ Goldsmitdht P. Dificultades en la detección de genomas del nuevo coronavirus 2 (SARS CoV-2). *Rev Argent Salud Pública*. 2020;12 Supl COVID-19:e17. Publicación electrónica 30 Dic 2020. http://rasp.msal.gov.ar/rasp/articulos/vol12supl/REV_Goldschmidte17.pdf.

² Oran DP, Topol EJ. The proportion of SARS-CoV-2 infections that are asymptomatic: A systematic review. *Ann Intern Med* [Internet] 2021 [citado 20 Abr 2021];M20-6976. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.7326/M20-6976>.

³ da Silva RC, da Silva Mendes G, Rojas MA, Amorim AR, Couceiro JN, Lupi O, et al. Frequency of viral etiology in symptomatic adult upper respiratory tract infections. *Brazilian J Infect Dis* [Internet] 2015 [citado 20 Abr 2021];19(1):30-5. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2014.08.005>.

⁴ da Silva RC, da Silva Mendes G, Rojas MA, Amorim AR, Couceiro JN, Lupi O, et al. Frequency of viral etiology in symptomatic adult upper respiratory tract infections. *Brazilian J Infect Dis* [Internet] 2015 [citado 20 Abr 2021];19(1):30-5. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2014.08.005>.

⁴ Sloots TP, Whiley DM, Lambert SB, Nissen MD. Emerging respiratory agents: new viruses for old diseases? *J Clin Virol* [Internet] 2008 [citado 20 Abr 2021];42(3):233-43. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2008.03.002>.

⁵ Wylie KM, Weinstock GM, Storch GA. Emerging view of the human virome. *Transl Res*. 2012;160(4):283-90. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2012.03.006>.

⁶ Yang S, Rothman RE. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect Dis*. 2004;4(6):337-48. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)01044-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)01044-8).

⁷ Organización Mundial de la Salud. (2020). Vigilancia de salud pública en relación con la COVID-19: orientaciones provisionales, 7 de agosto de 2020. Ginebra: OMS; 2020. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/334000>.

⁸ Organización Mundial de la Salud. Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance, 19 March 2020. Ginebra: OMS; 2020. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331501>.

⁹ Public Health Ontario. An overview of cycle threshold values and their role in SARS-CoV-2 real-time PCR test interpretation. [Internet] 2020 [citado 20 Abr 2021];1-14. Disponible en: <https://www.publichealthontario.ca/-/media/documents/ncov/main/2020/09/cycle-threshold-values-sars-cov-2-pcr.pdf?la=en>.

¹⁰ Organización Mundial de la Salud. WHO Information Notice for IVD Users 2020/05. Nucleic acid testing (NAT) technologies that use polymerase chain reaction (PCR) for detection of SARS-CoV-2. Ginebra: OMS [Internet]; 2021 [citado 20 Abr 2021];5-6.

Ginebra: OMS; 2021. Disponible en: <https://www.who.int/news/item/20-01-2021-who-information-notice-for-ivd-users-2020-05>.

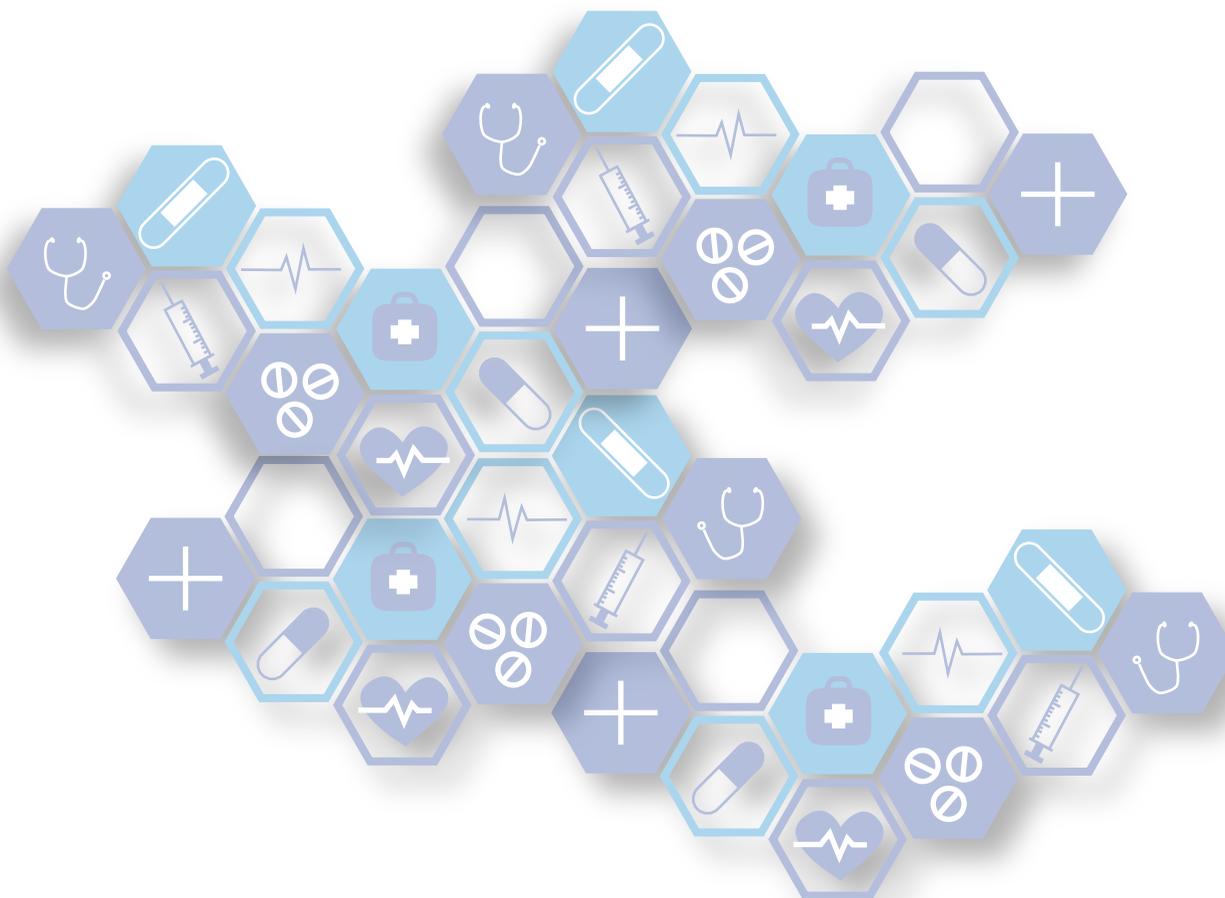
¹¹ Jefferson T, Spencer EA, Brassey J, Heneghan C. Viral cultures for COVID-19 infectivity assessment: a systematic review (Update 4). *bioRxiv* [Internet]. 2020 [citado 20 Abr 2021]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1101/2020.08.04.20167932>.

¹² La Scola B, Le Bideau M, Andreani J, Hoang VT, Grimaldier C, Colson P, et al. Viral RNA load as determined by cell culture as a management tool for discharge of SARS-CoV-2 patients from infectious disease wards. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet] 2020 [citado 20 Abr 2021];39(6):1059-61. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03913-9>.

¹³ Bullard J, Dust K, Funk D, Strong JE, Alexander D, Garnett L, et al. Predicting infectious severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 from diagnostic samples. *Clin Infect Dis* [Internet] 2020 [citado 20 Abr 2021];71(10):2663-6. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa638>.

¹⁴ Altman DG, Bland JM. Diagnostic tests 2: predictive values. *BMJ* [Internet] 1994 [citado 20 Abr 2021];309(6947):102. Disponible en: <https://doi.org/10.1136/bmj.309.6947.102>.

¹⁵ Organización Mundial de la Salud. (2020). Pruebas diagnósticas para el SARS-CoV-2: orientaciones provisionales, 11 de septiembre de 2020. Ginebra: OMS [Internet] 2020 [citado 20 Abr 2021]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/335830>.



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir Igual 4.0 Internacional. Reconocimiento – Permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra. A cambio se debe reconocer y citar al autor original. No comercial – esta obra no puede ser utilizada con finalidades comerciales, a menos que se obtenga el permiso.