

RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico y seguimiento de la infección por el virus SARS-CoV-2

Real-time RT-PCR for diagnosis and monitoring of SARS-CoV-2 virus infection

Nadezhda González García,¹ *<https://orcid.org/0000-0002-2380-7953>

Arturo Chang Monteagudo ² <https://orcid.org/0000-0002-0843-372X>

¹ Hospital Clínico Quirúrgico “Hermanos Ameijeiras”. La Habana, Cuba

² Instituto de Hematología e Inmunología, La Habana, Cuba

* Autor para la correspondencia (nadezhdagonzalez@gmail.com)

RESUMEN

Introducción: Las pruebas diagnósticas para detectar el nuevo coronavirus SARS-CoV-2 aún están evolucionando y es importante comprender sus particularidades para la interpretación correcta de los resultados. La técnica de elección para su diagnóstico es la reacción en cadena de la polimerasa con reverso transcripción (RT-PCR, del inglés *reverse transcription - polymerase chain reaction*), en tiempo real.

Métodos: Se realizó una revisión bibliográfica en la Biblioteca nacional de medicina de los EEUU a través el motor de búsqueda PubMed de los artículos publicados durante el año 2020 que contuvieran los términos SARS-CoV-2, COVID-19 y RT-PCR.

Desarrollo: Las dianas que se emplean para la detección específica del genoma del SARS-CoV-2 por RT-PCR en tiempo real se encuentran en las regiones ORF1a, RdRp, N, S y E del ARN viral. Las muestras recomendadas para el diagnóstico del SARS-CoV-2 por RT-PCR son las del tracto respiratorio superior como el exudado nasofaríngeo. Estudios recientes han informado pacientes positivos por RT-PCR días o semanas después de la recuperación y de haber tenido resultados negativos.

No está claro si este fenómeno se trata de un error de la prueba, de una reinfección o de una reactivación.

Conclusiones: La estrategia más eficiente para confirmar la COVID-19 debe combinar los resultados de la RT-PCR en tiempo real con los datos clínicos y epidemiológicos. Por lo tanto, la aplicación del método clínico es el eslabón fundamental del diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 aún en los tiempos de la biología molecular.

Palabras clave: infecciones por coronavirus, COVID-19, SARS-CoV-2, reacción en cadena de la polimerasa

ABSTRACT

Introduction: Diagnostic tests to detect the new coronavirus SARS-CoV-2 are still evolving. It is important to understand the peculiarities of these methods for the correct interpretation of the results. The gold standard for diagnosis is the real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

Methods: A bibliographic review was carried out throughout the US National Library of Medicine with the PubMed search engine for articles published during the year 2020 that contained the terms SARS-CoV-2, COVID-19 and RT-PCR.

Development: The targets used for the detection of the SARS-CoV-2 genome by real-time RT-PCR are found in the regions of viral RNA: ORF1a, RdRp, N, S and E. The samples recommended for the diagnosis are those of the upper respiratory tract such as nasopharyngeal exudate. Recent studies have reported positive patients by RT-PCR days or weeks after recovery and having had previous negative results. It is not clear whether this phenomenon is a test error, reinfection, or reactivation.

Conclusions: The most efficient strategy to confirm COVID-19 should combine the results of real-time RT-PCR with clinical and epidemiological data. Therefore, the application of the clinical method is the cornerstone in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection even in the times of molecular biology.

Keywords: coronavirus infections, COVID-19, SARS-CoV-2, polymerase chain reaction

Recibido: 01/07/2020

Aceptado: 03/07/2020

INTRODUCCIÓN

En diciembre de 2019, se identificó en la provincia de Wuhan, China, a un grupo de pacientes infectados con una cepa de coronavirus nunca antes encontrada en humanos. Este virus se denominó SARS-CoV-2 por parte del Comité Internacional de Taxonomía de Virus y la enfermedad recibió el nombre de COVID-19.^(1, 2) Por haberse extendido a más de 180 países la Organización Mundial de la Salud declaró la situación epidemiológica como una pandemia.⁽³⁾

Los coronavirus son una gran familia de virus de ARN monocatenarios envueltos, de sentido positivo, causantes de enfermedades respiratorias, digestivas y del sistema nervioso en humanos y animales.⁽⁴⁾ En los últimos 20 años, los coronavirus ya habían causado dos epidemias mundiales de enfermedades respiratorias graves: el síndrome respiratorio agudo severo (SARS) y el síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS).⁽³⁾

Las pruebas diagnósticas para detectar el SARS-CoV-2 aún están evolucionando y es importante comprender sus particularidades para la interpretación correcta de los resultados. La técnica de referencia y de elección para su diagnóstico es la reacción en cadena de la polimerasa con reverso transcripción (RT-PCR, del inglés *reverse transcription - polymerase chain reaction*), en tiempo real. Es una técnica molecular de detección y amplificación de ácidos nucleicos, en este caso de ARN.^(2, 5)

MÉTODOS

Se realizó una revisión bibliográfica en la Biblioteca nacional de medicina de los EEUU a través el motor de búsqueda PubMed de los artículos publicados durante el año 2020 que contuvieran las palabras SARS-CoV-2 y RT-PCR.

DESARROLLO

Las dianas que se emplean para la detección específica del genoma del SARS-CoV-2 por RT-PCR en tiempo real se encuentran en las regiones ORF1a, RdRp, N, S y E del ARN viral. El gen E es el más utilizado para el cribado y para el diagnóstico de certeza, el RdRp o el ORF1a. En la reacción también se incluyen cebadores que amplifican el gen de alguna proteína humana, que sirva como control de la calidad de la toma de muestra y del proceso de aislamiento del material genético.⁽⁶⁾

Las muestras recomendadas para el diagnóstico del SARS-CoV-2 por RT-PCR son las del tracto respiratorio superior, como el exudado nasofaríngeo y orofaríngeo, aunque en los niños pequeños es preferible el frotis por lavado o aspirado nasofaríngeo. Si se recogen hisopados nasofaríngeos y orofaríngeos al mismo paciente se pueden introducir juntos en el mismo tubo de medio de transporte para maximizar la sensibilidad de la prueba.⁽⁷⁾

Las muestras del tracto respiratorio inferior como el esputo, aspirado endotraqueal, lavado broncoalveolar o broncoaspirado se reservan para pacientes con enfermedad respiratoria grave. También hay evidencias recientes de que la saliva puede ser fiable para detectar SARS-CoV-2.^(8, 9)

La sensibilidad de la RT-PCR para el diagnóstico del SARS-CoV-2 depende de la carga viral, del día de la infección en que se toma la muestra y de que esta sea de vías respiratorias altas o bajas. También influyen otros factores como el correcto hisopado, su conservación y transporte al laboratorio en condiciones adecuadas.^(8, 9)

Según un metanálisis en países con prevalencia de COVID-19 de menos del 10 %, la sensibilidad agrupada de la prueba es del 89 %, ⁽¹⁰⁾ el valor predictivo positivo oscila entre el 47,3 y el 96,4 %; mientras el valor predictivo negativo se encuentra entre el 96,8 y el 99,9 %. La especificidad es del 100 %, porque el diseño de los cebadores es específico de la secuencia del genoma del SARS-CoV-2, aunque pueden ocurrir falsos positivos debido a errores técnicos y contaminación de reactivos. Hay pocos datos disponibles sobre las tasas de resultados falsos positivos y falsos negativos para las diversas pruebas de RT-PCR disponibles.⁽¹¹⁾

A toda persona con sospecha de infección por el SARS-CoV-2 se le debe realizar una RT-PCR en las primeras 24 horas. Si la prueba resultara negativa y

hubiera alta sospecha clínica de COVID-19 se repetiría a las 48 horas con una nueva muestra del tracto respiratorio, con lo que se consigue un aumento de la sensibilidad diagnóstica ⁽¹⁶⁾ de hasta el 29 %.⁽¹²⁾

El ARN viral en el hisopado nasofaríngeo se vuelve detectable por RT-PCR desde el primer día de los síntomas y alcanza su punto máximo dentro de la primera semana. No obstante, la línea de tiempo de la positividad no es igual en las diferentes muestras nasofaríngeas. La positividad disminuye más lentamente en el esputo y aún puede persistir después de que los hisopados nasofaríngeos son negativos. ^(2, 6) La positividad en pacientes graves puede mantenerse más de 3 semanas después del inicio de la enfermedad, momento en el cual la mayoría de los casos leves arrojan un resultado negativo.⁽⁷⁾

En una RT-PCR en tiempo real la amplificación del material genético se detecta en el mismo momento en que esta va ocurriendo gracias a la cuantificación de la fluorescencia que se emite en cada ciclo. El ciclo umbral (Ct, del inglés *thres hold cycle*) es el número de ciclos de replicación necesarios para producir una señal fluorescente y usualmente un valor de Ct inferior a 40 se informa como positivo.^(6, 13) Los valores de Ct más bajos representan mayores cargas de ARN viral, por lo que los valores de Ct que se obtienen en pacientes gravemente enfermos suelen ser inferiores a los valores de los casos leves.⁽¹³⁾

Aunque la RT-PCR en tiempo real juega un peso fundamental en el algoritmo diagnóstico de la COVID-19, no puede excluirse que la calidad de las pruebas moleculares para detectar el SARS-CoV-2 pueda verse comprometida por una serie de factores preanalíticos y analíticos. Algunos de estos son comunes a otras áreas de diagnóstico, como los errores de identificación de la muestra, las dificultades en su recolección, manejo y almacenamiento, el rendimiento del ensayo o del equipo, la experticia de quien interpreta los resultados; mientras que otros problemas son muy específicos y, por lo tanto, deben buscarse de manera más distintiva, como la ventana de diagnóstico específica, la contaminación de la muestra, entre otros.⁽¹⁾

Tras la confirmación del caso por biología molecular también es recomendable la extracción de dos muestras de suero, debido a que la detección de anticuerpos IgG-IgM frente a coronavirus por un análisis de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA, del inglés *enzyme-linked*

immunosorbent assay), es útil para la valoración de la respuesta inmunitaria humoral. La primera muestra debe recogerse a partir del séptimo día de inicio del cuadro clínico y la segunda, de 14 a 30 días después. El estudio de anticuerpos pudiera hacerse de inmediato en caso de necesidad clínica urgente como un preoperatorio o un receptor para trasplante.⁽¹⁴⁾

Debe tenerse en cuenta que el curso temporal de la positividad de la RT-PCR y la seroconversión puede variar en niños y otros grupos como los pacientes inmunocomprometidos, incluida la gran población de individuos asintomáticos. Todavía quedan muchos temas por dilucidar, particularmente cuánto tiempo dura la inmunidad potencial en los individuos infectados con SARS-CoV-2.⁽¹⁴⁾

Estudios recientes han informado pacientes positivos por RT-PCR días o semanas después de la recuperación y de haber tenido resultados negativos.^(12, 15) No está claro si este fenómeno se trata de un error de la prueba, de una reinfección o de una reactivación. La detección del ARN del SARS-CoV-2 en cualquier muestra, no implica con certeza la viabilidad del virus, ni una infección activa, porque la infectividad depende de la presencia de todo el virus, no solo de su ARN. Entonces, el "desprendimiento" prolongado del ARN del SARS-CoV-2 puede reflejar simplemente la falta de eliminación del ácido nucleico de los tejidos.⁽²⁾

Wölfel et al., demostraron que el éxito del aislamiento del virus depende de la carga viral y del día de la toma muestra después del inicio de los síntomas. A pesar de la positividad de la RT-PCR, el virus no se aisló después del octavo día posterior al inicio de los síntomas. En muchas otras enfermedades virales bien caracterizadas, como el Zika, está demostrado que el ARN puede detectarse mucho después de la eliminación de la infección activa, porque la RT-PCR no puede diferenciar el ARN de un virus infeccioso del que no lo es.⁽¹⁶⁾

En los casos que una RT-PCR nuevamente vuelva a ser positiva, es importante la evaluación de la carga viral, la respuesta de anticuerpos y el análisis de los resultados de laboratorio en un contexto clínico detallado. Los centros con condiciones para ello, deberían demostrar la infectividad por la inoculación en líneas celulares Vero / hSLAM o Vero / E6, a partir del material de hisopado nasofaríngeo de los pacientes.⁽¹⁷⁾

Aun así, el éxito del aislamiento del SARS-CoV-2 también depende de la carga viral, que no se logra cuando existen menos de 10^6 copias/mL. Entonces, para dilucidar si es o no posible una reinfección, será necesario también el uso de la microscopía electrónica, la secuenciación del genoma completo y el análisis filogenético.^(18, 19)

La estrategia más eficiente para confirmar la COVID-19 en pacientes sospechosos debe combinar los resultados de la RT-PCR en tiempo real con los datos clínicos y epidemiológicos, que incluyan la probabilidad de exposición, los síntomas y signos, y los hallazgos de laboratorio. Por lo tanto, la aplicación del método clínico es el eslabón fundamental del diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 aún en los tiempos de la biología molecular.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 2020;25(14):20200409c.
2. Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *JAMA.* 2020;323(22):2249-51.
3. Davenne E, Giot JB, Huynen P. Coronavirus and COVID-19: focus on a galloping pandemic. *Revue medicale de Liege.* 2020;75(4):218-25.
4. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of V. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature microbiol.* 2020;5(4):536-44.
5. Sharfstein JM, Becker SJ, Mello MM. Diagnostic Testing for the Novel Coronavirus. *JAMA.* 2020; 32(315):1437-38.
6. Yip CC, Sridhar S, Cheng AK, Leung KH, Choi GK, Chen JH, et al. Evaluation of the commercially available LightMix® Modular E-gene kit using clinical and proficiency testing specimens for SARS-CoV-2 detection. *J Clin Virol.* 2020; 129:104476.
7. Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, et al. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA.* 2020; 323(18): 1749-1862.

8. Iwasaki S, Fujisawa S, Nakakubo S, Kamada K, Yamashita Y, Fukumoto T, et al. Comparison of SARS-CoV-2 detection in nasopharyngeal swab and saliva. *J Infect.* 2020;3.doi: 10.1016/j.jinf.2020.05.071
9. Ceron JJ, Lamy E, Martinez-Subiela S, Lopez-Jornet P, Capela ESF, Eckersall PD, et al. Use of Saliva for Diagnosis and Monitoring the SARS-CoV-2: A General Perspective. *J Clin Med.* 2020;9(5): 1491
10. Hu Y, Sun J, Dai Z, Deng H, Li X, Huang Q, et al. Prevalence and severity of corona virus disease 2019 (COVID-19): A systematic review and meta-analysis. *J Clin Virol.* 2020; 127:104371.
11. Wang YXJ. CT suggests discharged Covid-19 patients who were retested RT-PCR positive again for SARS-CoV-2 more likely had false negative RT-PCR tests before discharging. *Quant Imaging Med Surg.* 2020;10(6):1396-400.
12. Carvalho A, Cezarotti Filho ML, Azevedo PCP, Silveira Filho RN, Barbosa FT, Rocha TJM, et al. Epidemiology, diagnosis, treatment, and future perspectives concerning SARS-COV-2: a review article. *Rev Assoc Med Bras.* 2020;66(3):370-4.
13. Xiao AT, Tong YX, Gao C, Zhu L, Zhang YJ, Zhang S. Dynamic profile of RT-PCR findings from 301 COVID-19 patients in Wuhan, China: A descriptive study. *J Clin Virol.* 2020;127:104346.
14. Li Z, Yi Y, Luo X, Xiong N, Liu Y, Li S, et al. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *J Med Virol.* 2020;1-7.
15. Abduljalil JM, Abduljalil BM. Epidemiology, genome, and clinical features of the pandemic SARS-CoV-2: a recent view. *New Microbes New Infect.* 2020; 35:100672.
16. Wolfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Muller MA, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature.* 2020;581(7809):465-9.
17. Park WB, Kwon NJ, Choi SJ, Kang CK, Choe PG, Kim JY, et al. Virus Isolation from the First Patient with SARS-CoV-2 in Korea. *J Korean Med Sci.* 2020;35(7): e84.

18. Zhou Y, Zhang S, Chen J, Wan C, Zhao W, Zhang B. Analysis of variation and evolution of SARS-CoV-2 genome. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2020;40(2):152-8.
19. Saha S, Malaker R, Sajib MSI, Hasanuzzaman M, Rahman H, Ahmed ZB, et al. Complete Genome Sequence of a Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) Isolate from Bangladesh. *Microbiol Resour Announc.* 2020;9(24):e00568-20.

Conflicto de intereses:

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Contribución de autoría

Nadezhda González García: concepción teórica, búsqueda de información, organización, redacción, revisión crítica del manuscrito y aprobación de la versión final.

Arturo Chang Monteagudo: concepción teórica, búsqueda de información, revisión crítica del manuscrito y aprobación de la versión final.