

REVISIONES

REVISTA ARGENTINA
DE SALUD PÚBLICA
Suplemento COVID-19

FECHA DE RECEPCIÓN: 24 de noviembre
de 2020

FECHA DE ACEPTACIÓN: 10 de diciembre
de 2020

FECHA DE PUBLICACIÓN: 30 de diciembre
de 2020

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:

pablogol@aol.com

DIFICULTADES EN LA DETECCIÓN DE GENOMAS DEL NUEVO CORONAVIRUS 2 (SARS COV-2)

SARS Coronavirus 2 (SARS CoV 2) genome detection pitfalls

* Pablo Goldschmidt¹. Farmacéutico, Bioquímico, Biólogo Médico especialista en Virología.

¹ Ret. Laboratoire du Centre Hospitalier National des Quinze-Vingts, París, Francia.

RESUMEN. El manejo de las infecciones virales respiratorias, tanto a nivel nacional como a nivel mundial, requiere resultados científicos de calidad. La reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (rRT-PCR, por su sigla en inglés) es considerada el "patrón de oro" para detectar el genoma del nuevo coronavirus 2 (SARS-CoV-2), agente causal de la enfermedad por el nuevo coronavirus (COVID-19) sobre todo en la fase aguda de la infección. Su uso es controvertido fuera de un contexto de exposición viral.

El objetivo del presente trabajo es analizar escollos encontrados durante la detección del genoma del SARS-CoV-2 que pueden producir resultados falsos.

Los falsos negativos de rRT-PCR pueden deberse al momento y la eficacia de la toma de la muestra, la congelación, el almacenamiento y la descongelación, y a la inactivación térmica de la virulencia. Además, las señales retardadas de los controles internos invalidan la negatividad. Por otra parte, las muestras con escaso material biológico llevan a conclusiones negativas falsas, por lo que determinar un umbral (número mínimo de células epiteliales) contribuirá a reducirlas. Sin embargo, la mayoría de los kits detectan ADN humano, pero no fueron calibrados para cuantificar carga celular. Los ácidos ribonucleicos nucleares (ARN) virales adheridos a guantes, tubos y gorros, -entre otros elementos-, son fuente de falsos positivos.

Las farmacopeas sugieren que la contaminación externa se controle en series de 100 muestras con al menos una representatividad del 10%. Si se extrapola esta aproximación al laboratorio de análisis clínicos, en lugar de uno se deberían procesar al menos 10 controles negativos contiguos a 10 positivos cada 100 pruebas.

Mejorar la detección por rRT-PCR implica un aumento de al menos 20% en el costo de los reactivos, por lo que se necesitan recursos adicionales.

PALABRAS CLAVE: ESRAG-CoV-2; COVID-19; Reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa; Resultados falsos negativos; Resultados falsos positivos.

ABSTRACT. *Emerging respiratory viral infections like the severe coronavirus disease (COVID 19) caused by novel coronavirus 2 (SARS-CoV-2) require quality results for science-based responses. The reverse transcriptase polymerase chain reaction (rRT-PCR) is considered the gold standard for detecting SARS-CoV-2 (particularly in the acute phase of infection).*

The aim of the present work was to analyze pitfalls during the search of viral genomes.

False negative conclusions are result of sampling timing, performances of swabbing, storage, and thawing and heat-infectivity inactivation. Samples with low biologic material also lead to false negatives. Qualitative controls to detect the presence of human DNA are available in several kits but they were not calibrated for quantification of human cell loads. Moreover, negativity cannot be reported for samples with delayed signals for the internal control (due to deficiency in extraction and/or retro transcription and/or or to the presence of rRT-PCR inhibitors).

The viral RNA that may have stick on gloves, on tubes, caps, etc. may produce false positives. The International Pharmacopoeias recommend for external contamination to test at least 10% of the samples. Couples of 10 negative contiguous to 10 positive controls randomly distributed should be therefore included in each series of 100 rRT-PCR tests. These improvements increase the cost of each determination (at least by 20% only for the reactants) and require additional resources.

KEY WORDS: SARS-CoV-2; COVID-19; Reverse Transcriptase PCR; False Negative reactions; False Positive reactions.

REVISIONES - Goldschmidt P. Dificultades en la detección de genomas del nuevo coronavirus 2 (SARS CoV-2). *Rev Argent Salud Publica.* 2020;12 Supl COVID-19:e17.

INTRODUCCIÓN

En el contexto de una pandemia como la de COVID-19, causada por el nuevo coronavirus 2 (SARS-CoV-2), es necesario contar con datos sólidos para sustentar políticas y medidas para proteger a la población¹.

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT, por su sigla en inglés), en particular las reacciones de transcripción inversa seguidas de reacciones en cadena de la polimerasa (rRT-PCR) son herramientas valiosas para detectar agentes infecciosos². Sin embargo, los investigadores y los tomadores de decisiones de políticas sanitarias carecen de argumentos que justifiquen, por ejemplo, el número elevado de pruebas de rRT-PCR positivas en personas paucisintomáticas (las que tienen síntomas leves) o asintomáticas que no desencadenan respuestas inmunitarias específicas^{3,4}. Por otra parte, las dificultades técnicas frente a presentaciones clínicas con resultados negativos de rRT-PCR requieren un análisis específico.

Este trabajo tiene por objeto analizar ciertas dificultades detectadas durante el estudio de genomas virales y proponer soluciones para minimizar el error a la hora de sacar conclusiones.

PRUEBAS PARA LA DETECCIÓN DEL SARS-CoV-2

Las NAAT que se utilizan para la confirmación y vigilancia de la propagación del SARS-CoV-2 fueron desarrolladas principalmente por investigadores de Alemania, China, Estados Unidos de América y Japón⁵⁻⁸.

En la práctica clínica, sobre todo en la fase aguda de la infección, las rRT-PCR (transcripción inversa del ARN seguida de PCR en tiempo real) se consideran el "patrón oro" para la detección del genoma del SARS-CoV-2, pero su utilización en casos en los que no hay exposición viral confirmada es aún controvertida. De hecho, las pruebas de rRT-PCR actuales se validaron con paneles de material en una situación idealizada y con muestras de pacientes que contenían cargas virales a niveles diferentes de los encontrados en tamizados poblacionales^{9, 10}.

AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA LAMP

La amplificación de isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP, por su sigla en inglés) es una reacción que permite amplificar secuencias de ácidos nucleicos con cuatro a seis cebadores en condiciones isotérmicas (63 °C-65 °C) y produce resultados que pueden determinarse de forma visual. Para varios virus respiratorios, esta técnica ha demostrado límites de detección similares a los de la rRT-PCR (1.000 copias/ml)^{11, 12}.

RIESGOS DE RESULTADOS FALSOS DURANTE LOS PROCEDIMIENTOS PREANALÍTICOS

A pesar de las mejoras continuas en la automatización, es frecuente ver resultados falsos en la fase preanalítica¹³.

La detección de virus se ve afectada por el momento de la toma de la muestra (antes o después de la aparición de los síntomas), la calidad de los procedimientos de

toma de muestras (hisopos nasofaríngeos y orofaríngeos) y las soluciones para el transporte y la conservación viral¹⁴.

Después de la toma de muestras, los tubos que contienen virus ARN requieren un cuidado especial, debido a la degradación del ARN. La inactivación de la infecciosidad que se realiza en varios laboratorios a 56°C altera la integridad del ARN viral y afecta la calidad de los resultados, sobre todo en muestras con carga viral baja¹⁵.

La Organización Mundial de la Salud y las autoridades sanitarias locales recomiendan que todos los procedimientos operativos garanticen que el personal esté capacitado y subrayan el riesgo potencial de infección. Para ello, las normas de bioseguridad establecen el distanciamiento físico, con equipo de protección adecuado para cada uno de los trabajadores de la salud. Se debe disponer de máscaras, protectores oculares, delantales, gorras, guantes y los elementos necesarios en entornos clínicos y en laboratorios. Sin embargo, las barreras mecánicas no protegen las muestras de la contaminación cruzada (por ejemplo, del ARN viral que puede adherirse a los guantes). Los hisopos con secreciones mucosas, células potencialmente infectadas y partículas virales libres se deben introducir en tubos y cerrarlos con firmeza (en general, esto sucede con guantes contaminados con microgotas virales). Numerosos centros de muestreo desinfectan los guantes, pero las sustancias utilizadas a tal fin no eliminan ácidos nucleicos adheridos.

Se obtuvieron pruebas de PCR positivas con el enjuague de guantes utilizados durante campañas de detección de infecciones oculares¹⁶, por lo que es preciso subrayar el riesgo de resultados falsos positivos si se desprenden genomas virales en una etapa posterior.

El cambio de guantes después de la toma de muestras de cada persona es poco factible con presupuestos sanitarios restringidos, y el costo de productos que destruyen ácidos nucleicos es muy alto. Una opción es disponer de una solución estándar de ácido clorhídrico (ácido clorhídrico 1 normal, útil para destruir ácidos nucleicos) preparada a diario. Se impregnan trozos de gasa estéril con la solución y se las pasa en superficies potencialmente contaminadas después de desinfectarlas con agentes biocidas. Este procedimiento es viable desde el punto de vista de los costos, aunque puede complicar la rutina del sector.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA LA RRT-PCR

Se debe evitar que los genomas de los coronavirus (ARN de una sola cadena) se expongan a las ARNasas, enzimas abundantes en el medio ambiente y en las manos que degradan las moléculas de ARN. Por este motivo, los procedimientos de aislamiento y purificación de los ARN requieren técnicas asépticas con soluciones y materiales libres de ARNasas.

La preparación de la muestra tiene por objeto extraer los ácidos nucleicos para hacerlos accesibles a la retrotranscripción y a la amplificación, con la eliminación de posibles inhibidores de esas reacciones.

Al inicio de la preparación en el laboratorio, se abren las tapas de los tubos para retirar los hisopos del medio de transporte, y se introducen secuencias de ARN en volúmenes especificados, que servirán como control interno (CI). Esas secuencias no deben estar relacionadas con los coronavirus. Para todas las PCR asociadas a contextos clínicos, los CI se extraerán, retrotranscribirán y amplificarán de manera simultánea y en el mismo tubo con la muestra para validar que todos los procedimientos y reacciones se han llevado a cabo de forma correcta¹⁷.

Para la extracción de los ácidos nucleicos virales se pueden utilizar, por ejemplo, microesferas magnéticas recubiertas de silicio (sistemas automáticos o manuales), que permiten extraer el elemento a amplificar en presencia de concentraciones de proteínas y lípidos, entre otros componentes. Las partículas de silicio activado tienen la capacidad de capturar ácidos nucleicos que, una vez lavadas para eliminar el material no fijado, disocian los ácidos nucleicos con soluciones especiales que se transfieren a una placa para proseguir con las reacciones de amplificación. La extracción manual de ARN es menos eficiente que la que se realiza con sistemas automáticos robotizados¹⁸.

TRANSCRIPCIÓN INVERSA

La PCR amplifica ácido desoxirribonucleico (ADN), por lo que los ARN extraídos y purificados deben transformarse en ADN complementario (ADNc) gracias a la acción de la transcriptasa inversa dotada de actividad de la enzima rTth, derivada de la bacteria *Thermus thermophilus*. La enzima rTth es una ADN polimerasa termoestable que puede a su vez ejercer la actividad de transcriptasa inversa.

Para este proceso se mezclan los ácidos nucleicos purificados con cebadores inversos del SARS-CoV-2 y del control interno (CI), que se fijan en sus respectivos blancos moleculares y se extienden. La doble cadena neoformada se abre por acción del calor y más cebadores se fijan en los ADNc (del CI y del blanco molecular) y se extienden. Los procedimientos de extracción y transcripción inversa requieren de pipeteados en serie de soluciones que se introducen en los tubos de reacción. Estos procedimientos acarrearán riesgos de contaminación cruzada por salpicado de microgotas imperceptibles.

LA NECESIDAD DE CONTROLES ENDÓGENOS

Las células epiteliales que recubren las fosas nasales y el epitelio respiratorio orofaríngeo expresan los receptores del SARS-CoV-2, y deben estar presentes en las muestras que se vayan a analizar.

Con muestras obtenidas por raspados de la conjuntiva de niños con signos clínicos de tracoma activo, se determinó que las muestras que contenían menos de 50 células/ μ l del líquido de transporte del hisopo arrojaban resultados negativos falsos. Esta situación se reprodujo para otros agentes infecciosos de tejidos mucosos o epiteliales¹⁹.

Las rRT-PCR para SARS-CoV-2 utilizan señales producidas por el gen de la β -actina o el gen de la subunidad p30 de

la ribonucleasa celular (*RPP30*). Estos marcadores no fueron calibrados con células epiteliales diluidas en serie para determinar en cada muestra la carga celular de forma directa. Sin embargo, la mera apreciación cualitativa mostró una fuerte asociación entre los resultados positivos de la rRT-PCR para el SARS-CoV-2 y los niveles elevados de *RPP30*²⁰.

Por otra parte, cuantificar el número de células en una muestra permite uniformizar un denominador para la carga viral (copias de ARN viral/número de células presentes en una muestra). Se identificaron resultados falsos negativos de manera fiable en muestras con expresión baja del gen *RPP30*, así como en la mayoría de los resultados contradictorios de rRT-PCR²¹. Por ende, la negatividad para el SARS-CoV-2 no puede validarse en muestras que contienen cargas celulares (determinadas con controles endógenos) inferiores al umbral a determinar.

AMPLIFICACIÓN DE GENES

El genoma del SARS-CoV-2 se estructura con una cadena de ARN positivo. El extremo terminal 3' del genoma codifica cuatro proteínas estructurales: la glicoproteína de la espícula (S), la proteína de envoltura (E), la glicoproteína de membrana (M) y la fosfoproteína de la nucleocápside (N) con proteínas accesorias. Las sondas utilizadas para la detección de las secuencias amplificadas se diseñan y sintetizan con oligonucleótidos de ADN de una sola cadena marcados con fluoróforos en el extremo 5' y bloqueadores de la fluorescencia (*quenchers*) en el extremo 3'. Cada sonda viene marcada con un fluoróforo diferente para detectar los diferentes productos amplificados en el mismo microtubo de manera simultánea. En ausencia de la diana molecular reconocida por la sonda, la fluorescencia permanece apagada, pero si es reconocida, las secuencias complementarias se hibridan, y el fluoróforo se separa del componente que oculta su señal. A medida que se copian cadenas nuevas de ADN, el programa de la computadora rastrea la fluorescencia producida. La rRT-PCR (transcripción inversa del ARN seguida de la reacción de amplificación encadena) requiere de 40 ciclos de amplificación del blanco molecular buscado (2 elevado a la potencia 40). Las señales que superan un umbral (región de amplificación exponencial) definen el ciclo de umbral o C_t ²².

Los kits de rRT-PCR comercializados en la actualidad no mostraron reacciones cruzadas con el panel de otros virus respiratorios, excepto para el gen E del SARS-CoV-1^{16, 23}. Por eso, la detección de una sola señal no es suficiente para considerar positiva la rRT-PCR. Se consideran positivas las muestras que detectan un mínimo de dos o tres señales del genoma del virus: S, M, E y N. Los resultados discordantes en pacientes sintomáticos requieren el procesamiento de una muestra nueva.

RESULTADOS NEGATIVOS Y FALSOS NEGATIVOS

Las señales producidas en cada muestra por el CI deben ser las mismas que las obtenidas con los controles negativos y blancos. Los retrasos de las señales de los CI en una muestra revelan deficiencias en la

extracción o en la retrotranscripción, o la presencia de inhibidores de alguna de las etapas de la rRT-PCR. En estas circunstancias, un resultado negativo no se puede informar y se requiere una nueva muestra.

Para este tipo de técnicas de laboratorio se pipetea volúmenes extremadamente reducidos (5 o 10 µl), por lo que se requieren precauciones para evitar el ingreso de microburbujas de aire a las puntas de las pipetas (difíciles de detectar por el ojo humano) ya que poco material disponible para la amplificación puede originar falsas conclusiones.

Se han descrito rRT-PCR positivas para casos asintomáticos en niveles del 30,8% en Japón²², del 50% en el crucero *Diamond Princess* y del 56,5% en los Estados Unidos^{23, 24}.

Siete estudios presentaron resultados de la rRT-PCR desde el inicio de aparición de los síntomas o de posibles contactos desde el día desde que se estimó la infección con SARS-CoV-2 (personas expuestas y trabajadores de la salud). Estos estudios demostraron que durante los cuatro primeros días de la infección y antes del momento de aparición de los síntomas (día 5), la probabilidad de un resultado falso negativo en una persona infectada es alta. En el día de la aparición de los síntomas, la tasa media de falsos negativos fue del 38% y disminuyó al 20% (12%-30%) el día 8 (tres días después de la aparición de los síntomas) y luego comenzó a aumentar de nuevo, de 21% (13%-31%) el día 9 hasta el 66% (54%-77%) el día 21. De lo anterior se deduce que las rRT-PCR añadieron poca información diagnóstica en los días inmediatamente posteriores a la exposición al virus. Para reducir las conclusiones erróneas se sugirió entonces tomar muestras uno a tres días después de la aparición de los síntomas. Sin embargo, en caso de sospecha clínica elevada y en contextos de transmisión viral, no debe descartarse la presencia del virus únicamente sobre la base de resultados negativos de la rRT-PCR²⁵.

Por otra parte, informes procedentes de China mostraron resultados falsos negativos durante un período de hasta dos semanas post exposición. En análisis realizados sobre muestras repetidas se informaron resultados falsos negativos entre el 2% y el 33% de las muestras analizadas²⁶.

Con base en lo antedicho, en los primeros días de la infección viral por SARS-CoV-2 o de cualquier otro virus respiratorio, los resultados negativos de las pruebas de rRT-PCR deberían ser considerados marcadores necesarios, pero no suficientes, para eliminar las precauciones destinadas a evitar la transmisión de la infección. En caso de duda, la tomografía computarizada (TC) torácica ofrece imágenes patognomónicas que ayudan en ciertas circunstancias, a aclarar el diagnóstico (sin embargo, se informaron TC torácicas normales en personas con rRT-PCR positivas)²⁷.

RESULTADOS POSITIVOS Y FALSOS POSITIVOS

Los resultados positivos de la rRT-PCR revelan la presencia de ARN viral, pero no predicen la virulencia ni la transmisibilidad, ni tampoco descartan infecciones bacterianas o coinfecciones con otros virus. Esta confusión pudo haber

llevado a considerar la existencia de "numerosísimos casos infectados" cuando en realidad se trataba del número de pruebas con resultados positivos.

En la ciudad de Nueva York, los estudios en los que la rRT-PCR para detectar la presencia del genoma viral fue seguida por la detección de anticuerpos anti-SARS-CoV-2, demostraron que de los 624 participantes con síntomas de COVID-19 confirmados, todos menos tres produjeron anticuerpos específicos contra la proteína de la espícula del SARS-CoV-2, mientras que la seroconversión pudo verificarse solo en el 37% de personas rRT-PCR positivos con sospecha de infección. Estos resultados sugieren que en esos casos, las conclusiones referidas a la presencia del virus fueron erróneas²⁸.

Las rRT-PCR realizadas en trabajadores expuestos del área de la salud de la región del Véneto (Italia) también detectaron anticuerpos específicos en el 100% de los casos clínicos graves de COVID-19 pero solo en el 83% de los que presentaban síntomas moderados. Los sujetos asintomáticos con rRT-PCR positiva mostraron una tasa de seroconversión significativamente menor (58%)²⁹.

Las rRT-PCR positivas realizadas con muestras de personas en estrecho contacto con pacientes con COVID-19 en Jiangsu (China) se correlacionaron con imágenes torácicas patognomónicas en el 50% de los sujetos asintomáticos, y ninguno de los pacientes asintomáticos desarrolló neumonía grave o murió. Por otra parte, en los sujetos asintomáticos con rRT-PCR positiva, los resultados de laboratorio fueron normales en 55% de los casos y la disminución de los linfocitos circulantes (uno de los marcadores de infección viral) se observó solo en el 16%. Los niveles de la proteína C reactiva (marcador biológico de inflamación) estaban ligeramente por encima del rango normal y solo en el 14% de los casos. Los resultados de estos estudios sugieren que un número importante de rRT-PCR positivas en personas asintomáticas no fueron indicadoras de la infección por el SARS-CoV-2. Sobre este punto, cabe destacar que, desde el inicio de 2020, el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos y otros entes sanitarios internacionales retiraron del comercio varios kits por la tasa elevada de resultados falsos³⁰ sin haber adicionado aun los riesgos del muestreo ni del procesamiento de las muestras.

De lo mencionado se infiere que, para los individuos asintomáticos en los que no se detecten anticuerpos dirigidos contra el SARS-CoV-2, la interpretación de los resultados positivos de las pruebas de rRT-PCR requiere extrema cautela.

CONCLUSIONES

Por regla general, la preparación de ácidos nucleicos (sobre todo por técnicas manuales) y la mezcla de reactivos para la rRT-PCR se efectúa bajo una campana de flujo laminar vertical o a cielo abierto. En estos procedimientos existe un riesgo potencial de contaminación entre las muestras por salpicaduras imperceptibles.

Los equipos disponibles en el mercado indican el uso de controles en cada serie de determinaciones sin mencionar el número de pruebas negativas que se han de tomar en cuenta (la mayoría explícita un control positivo y un control negativo)³¹. Un control negativo y un positivo tendrían aval científico únicamente si los sistemas procesan una sola muestra a la vez. Sin embargo, y en otro contexto, la farmacopea establece que se deben controlar al menos el 10% de muestras representativas de cada lote de 100 elementos para evaluar la contaminación externa³². Si se extrapola esta aproximación a los procedimientos para la detección de genomas virales, se deberían procesar un mínimo de 10% de muestras (pares de 10 controles negativos contiguos a 10 controles positivos) distribuidos en cada serie de 100 pruebas.

Por otra parte, la ubicación de las muestras en el plan experimental de detección puede contribuir a determinar riesgos posibles de contaminaciones cruzadas. Si, por ejemplo, para dos muestras adyacentes se obtienen resultados positivos, y si para una de ellas el Ct es mayor que 30 o menor que 25, se deben verificar los signos clínicos y el contexto de transmisión viral para ambas. En caso de que para una muestra vecina a una fuertemente positiva se detecten tres señales positivas con Ct superiores a 32, se debe repetir la prueba.

Además, los sujetos infectados con virus respiratorios desarrollan respuestas inmunitarias específicas, por lo que la detección de anticuerpos (un mes o más después de los signos clínicos) confirma la veracidad de los resultados positivos de la rRT-PCR. Por lo tanto, la ausencia de anticuerpos en personas inmunocompetentes invalidaría en numerosos casos, los resultados positivos de la rRT-PCR³³.

³⁴ (ver Tabla 1).

Para tomar en cuenta estas intervenciones se requiere de recursos adicionales, ya que el costo de cada determinación se incrementa por lo menos en un 20% solamente para los reactivos.

En conclusión, la detección de infecciones de transmisión aérea requiere pruebas precisas y medidas de protección adecuadas. Sin embargo, los resultados obtenidos por métodos espurios crean confusión.

Sabiendo que las técnicas utilizadas pueden amplificar más de 10 000 millones de veces la señal de un elemento buscado, cada paso del diagnóstico requiere conocer y minimizar los riesgos de resultados falsos.

Las rRT-PCR son instrumentos de referencia y no son por sí mismos la prueba exclusiva de infección ni de riesgo para la salud pública (especialmente los resultados positivos en personas no expuestas asintomáticas o negativos repetidos en personas expuestas)^{35, 36}.

Los falsos positivos pueden alterar la eficacia de las estrategias de salud pública y las medidas preventivas. Además, el miedo a una enfermedad falsamente detectada puede dar lugar a tratamientos innecesarios y a un aumento de la ansiedad social.

Los resultados obtenidos por rRT-PCR para el SARS-CoV-2 han puesto al personal de salud frente a dilemas en la toma de decisiones. Por este motivo, es prioritario identificar y resolver las dificultades técnicas ya que se infiere que pueden haberse atribuido de manera errónea, complicaciones graves y muertes al SARS-COV-2, cuando en realidad se trataba de otras afecciones.

Tabla 1. Conclusiones de la confrontación de resultados positivos de la rRT-PCR para SARS-CoV-2 con parámetros de laboratorio y clínicos.

| Marcador biológico o clínico | Reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (rRT-PCR) positiva* para SARS-CoV-2 | | |
|--|--|--|---|
| | (+)**o (-) | +** o (-) | (-) |
| Anti-SARS-CoV-2 IgM | (+) | (-) | (-) |
| Anti-SARS-CoV-2 IgG (4 a 8 semanas después del inicio de síntomas en un contexto de transmisión viral) | (+) | (-) | (-) |
| | | (repetir la prueba 1 mes después) | (repetir la prueba 1 mes después) |
| Disminución del número de linfocitos circulantes | Sí | No | Sí/No |
| Proteína C reactiva | ↑ | Normal o ↑ | Normal o ↑ |
| D-dímeros | ↑ | Normal | Normal o ↑ |
| Índice de SatO ₂ ↓ y/o PaO ₂ ↓ | Sí | No | Sí/No |
| Síndrome gripal, tos, falta de aire o fatiga y dificultad para respirar | Sí | No | Sí/No |
| Fiebre (>38,5 °C durante >48 h) | Sí | No | Sí/No |
| Contacto cercano con individuos infectados | Sí/No | No | Sí/No |
| Imágenes patognomónicas de tórax+ | Sí | No | No |
| Sensación de pérdida del gusto o del sentido del olor | Sí/No | No | Sí/No |
| Conclusión | Infección confirmada por SARS-CoV-2 | Resultado falso positivo de RT-PCR para SARS-CoV-2 | Resultado falso positivo de RT-PCR para SARS-CoV-2. Sospechar otras patologías |

*Ct >32 y <41: repetir la prueba con una nueva muestra y si es posible, volver a extraer el ARN de la primera muestra. Ct: número de ciclos necesarios para que la señal fluorescente supere el ruido de fondo.

**IgM+ con IgG-: confirmar la ausencia del factor reumatoideo, de anticuerpos antihepatitis C, de crioglobulinas y de autoanticuerpos²¹.

***Validar la ausencia del factor reumatoideo, de anticuerpos antihepatitis C y de crioglobulinas.

+Opacidades (en forma de vidrio molido y/o en parches consolidados, exudados alveolares y/o afectación interlobular)^{5,35}.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES: No hubo conflicto de intereses durante la realización de este trabajo.

NOTA DEL EDITOR: Los autores son los únicos responsables de las opiniones que se expresan en sus artículos, que no necesariamente reflejan la opinión de la institución editora de la RASP

Cómo citar este artículo: Goldsmichdt P. Dificultades en la detección de genomas del nuevo coronavirus 2 (SARS CoV-2). *Rev Argent Salud Publica.* 2020;12 Supl COVID-19:e17. Publicación electrónica 30 Dic 2020.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Yang CL, Qiu X, Zeng YK et al. Coronavirus disease 2019: a clinical review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020;24(8):4585-4596.
- ² Dobrow MJ, Hagens V, Chafe R et al. Consolidated principles for screening based on a systematic review and consensus process. *CMAJ.* 2018;190(14):E422-E429.
- ³ Gao Z, Xu Y, Guo Y et al. A systematic review of re-detectable positive virus nucleic acid among COVID-19 patients in recovery phase. *Infect Genet Evol.* 2020;85:104494.
- ⁴ Surkova E, Nikolayevsky V and Drobnivski L. False positive COVI-19 results: hidden problems and costs. *The Lancet Respiratory Medicine.* 2020.
- ⁵ Wu D, Wu T, Liu Q, Yang Z. The SARS-CoV-2 outbreak: What we know. *Int J Infect Dis.* 2020 May;94:44-48.
- ⁶ Pfefferle S, Reucher S, Nörz D et al. Evaluation of a quantitative RT-PCR assay for the detection of the emerging coronavirus SARS-CoV-2 using a high throughput system. *Euro Surveill.* 2020;25(9):2000152.
- ⁷ Mizumoto K, Kagaya K, Zarebski A et al. Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the Diamond Princess cruise ship, Yokohama, Japan, 2020. *Euro Surveill.* 2020;25(10):2000180.
- ⁸ Ortiz-Prado E, Simbaña-Rivera K, Gómez-Barreno L et al. Clinical, molecular, and epidemiological characterization of the SARS-CoV-2 virus and the coronavirus disease 2019 (COVID-19), a comprehensive literature review. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2020;98(1):115094.
- ⁹ Administración de Medicamentos y Alimentos. SARS-CoV-2 real-time RT-PCR diagnostic panel. Rockville, MD: FDA; 2020.
- ¹⁰ Centros de Prevención y Control de Enfermedades. Interim guidelines for collecting, handling, and testing clinical specimens from persons for coronavirus disease 2019 (COVID-19). [Internet]. Atlanta, GA: CDC; 2020. Disponible en: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/lab-biosafety-guidelines.html>.
- ¹¹ Yu L, Wu S, Hao X et al. Rapid colorimetric detection of COVID-19 coronavirus using a reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic platform: iLACO. [Internet]. medRxiv. 2020. Doi: [10.1101/2020.02.20.20025874](https://doi.org/10.1101/2020.02.20.20025874)
- ¹² Zhang Y, Odiwuor N, Xiong J et al. Rapid molecular detection of SARS-CoV-2 (COVID-19) virus RNA using colorimetric LAMP. [Internet]. medRxiv. 2020. Disponible en: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.02.26.20028373v1>.
- ¹³ Lippi G, Simundic AM, Plebani M et al. Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Clin Chem Lab Med.* 2020;58(7):1070-1076.
- ¹⁴ Zou L, Ruan F, Huang M, et al. SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. *NEJM.* 2020;382(12):1177-1179.
- ¹⁵ Pan Y, Long L, Zhang D et al. Negative nucleic acid testing results for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 from thermal inactivation of samples with low viral loads. *Clin Chem.* 2020;66(6):794-801.
- ¹⁶ Goldschmidt P, Rostane, H, Sow M et al. Detection by broad-range real-time PCR assay of Chlamydia species infecting human and animals. *Brit J Ophthalmol.* 2006;90(11):1425-1429.
- ¹⁷ Goldschmidt P, Degorge S, Benallaoua D, et al. Rapid detection and simultaneous molecular profile characterization of Acanthamoeba infections. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;74(2):137-41.
- ¹⁸ Häntzsch M, Tolios A, Beutner F, et al. Comparison of whole blood RNA preservation tubes and novel generation RNA extraction kits for analysis of mRNA and miRNA profiles. *PLoS ONE.* 2014;9:e113298.
- ¹⁹ de Barbeyrac B, Goldschmidt P, Malembic S, et al. Quality assessment of conjunctival specimens for detection of Chlamydia trachomatis by PCR in children with active trachoma. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(7):689-94.
- ²⁰ Lin C, Ye R, Xia YL. A meta-analysis to evaluate the effectiveness of real-time PCR for diagnosing novel coronavirus infections. *Genet Mol Res.* 2015;14(4):15634-41.
- ²¹ Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, et al. Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. *JAMA.* 2020: 323:1843-1844.
- ²² Nishiura H, Kobayashi T, Miyama T, et al. Estimation of the asymptomatic ratio of novel coronavirus infections (COVID-19). *Int J Infect Dis.* 2020;94:154-155.
- ²³ Younes N, Al-Sadeq DW, Al-Jighefee H, et al. Challenges in laboratory diagnosis of the novel coronavirus SARS-CoV-2. *Viruses.* 2020;12(6):582.
- ²⁴ Kimball A et al. CDC COVID-19 Investigation Team. Asymptomatic and presymptomatic SARS-CoV-2 infections in residents of a long-term care skilled nursing facility - King County, Washington, March 2020. *MMWR.* 2020;69(13):377-381.
- ²⁵ Gandhi M, Yokoe DS, Havlir DV. Asymptomatic transmission, the Achilles' heel of current strategies to control Covid-19. *NEJM.* [Internet]. 2020. Doi: [10.1056/NEJMe2009758](https://doi.org/10.1056/NEJMe2009758).
- ²⁶ Zhou F, Li J, Lu M et al. Tracing asymptomatic SARS-CoV-2 carriers among 3674 hospital staff: a cross-sectional survey. *Clinical Medicine.* 2020;26:100510.
- ²⁷ Wikramaratna P, Paton RS, Ghafari M, et al. Estimating false-negative detection rate of SARS-CoV-2 by RT-PCR. *MedRxiv.* [Internet]. 2020. Doi: [10.1101/2020.04.05.20053355](https://doi.org/10.1101/2020.04.05.20053355).
- ²⁸ Wajnberg A, Mansour M, LevenE, et al. Humoral response and PCR positivity in patients with COVID-19 in the New York City region, USA: an observational study. [Internet]. *Lancet Microbe.* 2020;1(7):e283-e289. [https://www.thelancet.com/journals/lanmic/article/PIIS2666-5247\(20\)30120-8/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanmic/article/PIIS2666-5247(20)30120-8/fulltext).
- ²⁹ Plebani M, Padoan A, Fedeli U, et al. SARS-CoV-2 serosurvey in health care workers of the Veneto Region. [Internet]. *Clin Chem Lab Med.* 2020;58(12). <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-1236>.
- ³⁰ Willman D. Contamination at CDC lab delayed rollout of coronavirus tests. *The Washington Post.* [Internet]. April 18, 2020. <https://www.washingtonpost.com/investigations/contamination-at-cdc-lab-delayed-rollout-of-coronavirus->

[tests/2020/04/18/fd7d3824-7139-11ea-aa80-c2470c6b2034_story.html](https://doi.org/10.1136/bmj.m1808)

³¹ Kuucirka LM, Lauer SA, Laeyendecker O, et al. Variation in false-negative rate of reverse transcriptase polymerase chain reaction-based SARS-CoV-2 tests by time since exposure. *Ann Intern Med.* 2020;173(4):262-267.

³² Ministerio de Salud de la Nación Argentina. *Farmacopea Argentina 7a Ed.* [Internet]. Disponible en <https://www.argentina.gob.ar/anmat/farmacopea-argentina/libro>

³³ Watson J, Whiting PF, Brush JE. Interpreting a Covid-19 test result. *BMJ.* [Internet]. 2020;369:m1808. Doi: [10.1136/bmj.m1808](https://doi.org/10.1136/bmj.m1808).

³⁴ Ki M. Task force for 2019-nCoV. Epidemiologic characteristics of early cases with 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) disease in Korea. *Epidemiol Health.* 2020;42:e2020007.

³⁵ Fang Y, Zhang H, Xie J, et al. Sensitivity of chest CT for COVID-19: comparison to rRT-PCR. *Radiology.* 2020;296(2):e115-e117.

³⁶ Luo L, Liu D, Liao X, et al. Contact settings and risk for transmission in 3410 close contacts of patients with COVID-19 in Guangzhou, China: a prospective cohort study. *Ann Intern Med.* 2020. Doi: [10.7326/M20-2671](https://doi.org/10.7326/M20-2671).



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.