

Cuestiones relativas al test RT-PCR del coronavirus

David Crowe
23 de abril de 2020
Versión 3

Este documento es un análisis de lo que se ha dado en llamar test del coronavirus, prueba de diagnóstico que se realiza con la tecnología RT-PCR. Para hacer el análisis me he basado en (1) un [artículo de 2017 sobre los problemas potenciales que pueden presentarse con la RT-PCR](#) publicado por el profesor Stephen Bustin, un experto mundial, (2) [un podcast que realicé recientemente con él](#) y (3) las [Pautas MIQE para la publicación de información sobre ensayos de RT-PCR](#).

El análisis no cuestiona si el ARN utilizado en el test es de origen viral o endógeno. Si no es de origen viral, es evidente que el test RT-PCR del coronavirus no tendría ningún sentido.

Este artículo no contiene referencias. Quien desee consultarlas, puede acceder a mi artículo [Crítica del pánico por el coronavirus, que está completamente referenciado](#).

El número de ciclos de la PCR

La PCR es una técnica que permite amplificar pequeñas cantidades de ADN en múltiples ciclos sucesivos. En cada ciclo la cantidad final de ADN es aproximadamente el doble de la inicial.

La RT-PCR es una variante de la PCR en la que realiza un paso previo que consiste en convertir el ARN de la muestra en ADN mediante la enzima transcriptasa inversa (RT).

El objetivo del test es detectar la presencia de un determinado material genético previamente conocido.

La cantidad de ADN producida al final de cada ciclo se mide de manera indirecta mediante fluorescencia. Esto se consigue gracias a unas moléculas fluorescentes (inicialmente inhibidas) que forman parte de unas sondas y que se liberan y emiten luz cuando la enzima polimerasa hace su reacción y duplica una hebra de ADN. La cantidad inicial del material buscado es un dato desconocido.

La cantidad de luz producida se duplica aproximadamente en cada ciclo y, cuando alcanza una cierta intensidad, el proceso se detiene y el resultado del test se considera positivo (lo cual se interpreta como que hay infección).

Pero, si después de un cierto número de ciclos todavía no hay suficiente ADN, se considera que el resultado es negativo (es decir, se entiende que no hay infección). Este número de ciclos (Ct), que se utiliza como frontera para separar los resultados positivos de los negativos, se establece de manera arbitraria y es diferente para cada organización que realiza test.

Por ejemplo, en uno de los artículos publicados sobre este tema, se usan los siguientes valores de Ct: 36 como límite para un resultado positivo, 37-39 como resultado indeterminado (se requiere repetir el test) y más de 39 como resultado negativo. En otro artículo se emplea el valor 37 como límite entre el resultado positivo y el negativo, y no contempla ninguna zona intermedia. En una lista de [kits de test aprobados por la FDA de los EUA](#), diferentes laboratorios fabricantes de test recomiendan los valores: 30, 31, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 43 y 45. El valor más recomendado es 40 ciclos, sugerido por 12 laboratorios.

Significado del valor del Ct

Al utilizar el Ct se asume implícitamente que la misma cantidad de ARN inicial (dentro de un múltiplo de dos) siempre producirá la misma fluorescencia final (la misma cantidad de ADN) con el mismo número de ciclos.

Pero, en realidad, en una reacción RT-PCR pueden ocurrir diferentes tipos de error. Pueden producirse ineficiencias en la extracción del ARN, ineficiencias aún mayores en la conversión del ARN en ADN complementario (Bustin señaló que la eficiencia de este paso rara vez supera el 50% y puede variar fácilmente en un factor de 10), e ineficiencias del propio proceso de la PCR. En el podcast, Bustin dice que el empleo de un número de Ct arbitrario es "completamente absurdo y no tiene ningún sentido". Efectivamente no se puede suponer que, en los test realizados en diferentes laboratorios, el mismo número de Ct obtenido indique que la cantidad inicial de ARN era la misma.

Límite de ciclos

El profesor Bustin sostiene que hacer más de 35 ciclos es imprudente, pero casi nadie establece el límite en este valor (las recomendaciones MIQE sugieren menos de 40). Hacer demasiados ciclos puede producir falsos positivos, pues la fluorescencia de fondo aumenta con cada ciclo.

El Ct y la cantidad de resultados positivos de los test

El número de ciclos Ct influye significativamente en la cantidad de resultados positivos de los test. Si el Ct se cambiara de 37 a 35, habría menos resultados positivos. Y si se aumentara a 39, habría más positivos. Incluso aunque el número de Ct se estandarizara, tendría un significado diferente dependiendo de las máquinas específicas (termocicladores), los productos químicos y los procedimientos utilizados en los diferentes laboratorios donde se hacen estas pruebas. Incluso podrían encontrarse cambios entre diferentes procesos de una misma muestra realizados en el mismo laboratorio.

Sin amplificar simultáneamente, a modo de control, una cantidad conocida de otro ARN "mezclado" con el original de la muestra, no se puede suponer que los valores de Ct se puedan utilizar para establecer el límite entre los resultados positivos y los negativos.

¿Es significativa la cantidad de virus?

Si el proceso es eficiente y se realizan muchos ciclos, pueden detectarse cantidades ínfimas de ARN. ¡Tan poco como tres moléculas!. Si alguien tuviera una cantidad tan pequeña de virus en su cuerpo, aunque no le causara problemas de salud, daría positivo al test.

¿Es funcional el virus?

Aunque en el cuerpo solo haya partes del virus o partículas virales incompletas y por tanto no infecciosas, si se hace el test, dará un resultado positivo. Los test no prueban la presencia del virus en su estado patogénico y con capacidad de replicación.

¿Puede la RT-PCR distinguir infectado de no infectado?

No.

¿Cómo funciona más detalladamente la RT-PCR?

Para detectar la presencia del ARN buscado, se realizan los pasos siguientes:

1. El ARN debe extraerse de una muestra. Esto debe hacerse con mucho cuidado, pues hay que asegurarse de que no quedan trazas de ADN ni productos químicos que puedan actuar como inhibidores en los pasos siguientes del proceso.
2. La enzima transcriptasa inversa convierte el ARN en ADN complementario (ADNc). Este proceso tiene una eficiencia baja (50%). La cantidad de ADN obtenida al final del proceso puede variar de manera

significativa (en un factor de 10, aunque en el pasado podía ser de 100) dependiendo de bastantes circunstancias.

3. La parte del proceso que corresponde a la PCR propiamente dicha, parte del ADNc obtenido en el paso previo y de los cebadores (*primers*) y la sonda (*probe*). Tal vez pueda haber también trazas (no deseadas) de ADN de la muestra que no se hayan conseguido eliminar. Los cebadores delimitan el inicio y el fin del fragmento de ADNc que se quiere duplicar. La sonda ayuda a asegurar que la duplicación del ARN solo se produce si los cebadores (que son muy cortos) y la sonda han encajado bien con la secuencia buscada. En cada ciclo de este proceso se duplica (de manera aproximada) la cantidad de ADN. La sonda tiene incorporado un marcador fluorescente que se libera cuando se produce la duplicación del ADN. La cantidad de fluorescencia producida permite hacer una estimación de la cantidad de ADN que se ha generado.
4. Opcionalmente, el ADN obtenido puede secuenciarse para determinar de manera exacta las bases (la 'secuencia de los cuatro diferentes nucleótidos').

En cada paso se pueden producir errores e ineficiencias. No se puede hacer una estimación de la cantidad de ADN obtenida al final del proceso a menos que, a modo de control, el ARN original se mezcle con una cantidad **conocida** de otro ARN que también se duplique. Esto permitiría correlacionar aproximadamente el número de ciclos de la PCR con la cantidad inicial de material.

¿Hay pruebas de que hay problemas o tan solo es una hipótesis?

Varios artículos científicos ponen de manifiesto unos resultados de test que solo pueden catalogarse de imposibles. Un artículo de **China** hace referencia a una serie de test RT-PCR consecutivos cuyos resultados tienen tres valores posibles: negativo (N), positivo (P) y Dudoso (D, supuestamente intermedio). De un total de 600 pacientes, 29 tuvieron las siguientes inexplicables secuencias de resultados: 1 DDPDD 2 NNPN 3 NNNPN 4 DNPN 5 NNDP 6 NDP 7 DNP 8 NDDPN 9 NNNDPN 10 NNPD 11 DNP 12 NNNP 13 PPNDPN 14 PNPPP 15 DPNPNN 16 PNNP 17 NPNN 18 PNP 19 NPNN 20 PNNP 21 PNP 22 PNP 23 PNP 24 PNDDP 25 PNNN 26 PNPP 27 PNP 28 PNNP 29 PNP.

Un estudio de **Singapur** hizo test a 18 pacientes casi diariamente y la mayoría pasaron de positivo a negativo y de nuevo a positivo, al menos una vez. En un paciente esto sucedió cuatro veces. En China, entre el 5% y el 14% de pacientes que se habían curado y habían dado negativo al test dos veces seguidas,

volvieron a dar positivo, en la mayoría de casos sin síntomas. En Corea del Sur, recientemente se han dado 91 casos de este mismo tipo. Un hombre chino de 68 años fue al hospital con síntomas y dio positivo. Después de la resolución de los síntomas y de dar negativo dos veces, fue dado de alta. Pero más tarde volvió a dar positivo y fue reingresado. Fue dado de alta nuevamente y al poco tiempo volvió a dar positivo. Fue reingresado por tercera vez y después dado de alta de manera definitiva.

Conclusiones

Los test RT-PCR para el coronavirus parecen estar diseñados para producir el mayor número posible de resultados positivos. El miedo a no detectar un verdadero positivo es tan grande que quienes diseñan la metodología de la prueba específica basada en la RT-PCR ignoran por completo el riesgo de obtener falsos positivos. Los falsos positivos hacen que la pandemia parezca más grande y justifican el cierre completo de la economía, encerrando a las personas en sus propios hogares y impidiéndoles hacer casi todo lo que les da alegría, como jugar con la pelota en el parque, ir a tomar un café con un amigo, ir al teatro o a un evento deportivo, nadar, ir a la feria, etc.

Traductor: Joan Solé, Junio de 2020

© Copyright April 30, 2020. [David Crowe](#)