

ARTICOLE DE SINTEZĂ

PROVOCĂRI ÎN DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIEI CU COVID-19: NEGATIV DAR POZITIV

Alina TOMA – asist. univ.,
Anatolie VIȘNEVSCHI – dr. hab. șt. med., prof. univ.

Catedra de medicină de laborator
IP USMF „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova

tel.: +373 686 64 500; e-mail: alina.toma@usmf.md

Rezumat

Începând cu decembrie 2019, în doar 5 luni, pandemia bolii coronavirusului de tip nou (COVID-19) s-a extins în 216 țări și a afectat peste patru milioane de persoane. Astfel, au apărut noi provocări în diagnosticul de laborator al infecției cu COVID-19, una dintre ele fiind cazurile fals negative. **Scopul lucrării este** analizarea cauzelor posibile ale apariției rezultatelor fals negative în procesul de diagnosticare a pacienților cu COVID-19 și managementul situațiilor respective. A fost efectuată o revizuire sistematică a literaturii utilizând bazele de date Medline, Pub Med, pentru identificarea articolelor relevante, cu referire la „COVID-19”, „diagnostic de laborator”, „fals negativ”. Testele prin reacția de polimerizare în lanț cu detecție în timp real (RT-PCR) sunt standardul diagnosticului etiologic al infecției cu COVID-19. Faptul că acestea pot fi inițial negative, nu este cu adevărat surprinzător, având în vedere cinetica infecției SARS-CoV-2. Testele efectuate în exteriorul ferestrei de diagnosticare, ARN viral insuficient, sensibilitatea kitului RT-PCR, inactivarea termică, sunt situații care pot duce la apariția rezultatelor fals negative. Pentru managementul acestor posibile erori este important să se utilizeze și alte metode ca testele bazate pe detectarea anticorpilor IgM/IgG, sau un rol relevant îi aparține tomografiei computerizate pulmonare. Un rezultat pozitiv confirmă detectarea virusului, dar un rezultat negativ nu întotdeauna semnifică absența infecției, de aceea o singură metodă nu este suficientă pentru diagnosticul final al pacientului, dar trebuie luate în considerare și caracteristicile epidemiologice, clinice, paraclinice.

Cuvinte-cheie: „COVID-19”, „diagnostic de laborator”, „fals negativ”.

Summary. Challenges in laboratory diagnosis of infection with COVID-19: negative but positive

As of December 2019, in just 5 months, the new disease (COVID-19) pandemic has expanded to 216 countries and affected more than four million people. This has led to numerous challenges in the laboratory diagnosis of infection COVID-19, one of which is the occurrence of false negative cases. **Objective of the study is** analysis of the possible causes of false negative results in the diagnosis of patients with COVID-19 and how such situations should be corrected. A systematic review of literature has been carried out using Medline databases, Pub Med, to identify the relevant items, referring to ‘COVID-19’, ‘Laboratory diagnosis’, ‘false negative’. The current gold standard for the etiological diagnosis of SARS-CoV-2 infection is (real-time) reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The fact that RT-PCR testing may be initially negative is not surprising considering the probable kinetics of SARS-CoV-2 infection. Tests performed outside the diagnostic window, insufficient viral RNA, the sensitivity of the kit-PCR, thermal inactivation, are situations which may lead to false negative results. To control these possible errors it is important to use other methods that tests based on IgM/IgG antibodies, or a relevant role, pertain to pulmonary computed tomography. A positive result confirms virus detection, but a negative result does not always mean the absence of infection, so a single method is not sufficient for final diagnosis, but should be used taking into account epidemiological, clinical, paraclinical characteristics.

Key-words: ‘COVID-19’, ‘laboratory diagnosis’, ‘false negative’.

Резюме. Провокации в лабораторной диагностике инфекции COVID-19: отрицательный, но положительный

Начиная с декабря 2019 года, всего за 5 месяцев, пандемия коронавирусной инфекции нового типа (COVID-19) распространилась на 216 стран и поразила более четырёх миллионов человек. Таким образом, возникли новые проблемы в лабораторной диагностике инфекции COVID-19, одной из которых является ложноотрицательный результат. Цель работы: проанализировать возможные причины появления ложноотрицательных результатов в процессе диагностики пациентов с COVID-19 и менеджмент этих ситуаций. Был проведен систематический обзор литературы с использованием баз данных Medline, Pub Med по теме «COVID-19», «лабораторная диагностика», «ложноотрицательный». Тесты с полимеразной цепной реакцией в реальном времени (ПЦР) являются стандартом для этиологической диагностики инфекции COVID-19. Тот факт, что они могут быть изначально отрицательными, на самом деле, неудивителен, учитывая кинетику инфекции SARS-CoV-2. Тесты, проведенные за пределами диагностического окна, недостаточная вирусная РНК, чувствительность набора для ПЦР, термическая

инактивация - это те ситуации, которые могут привести к ложноотрицательным результатам. Для менеджмента возможных ошибок необходимо использовать и другие методы, например, тесты основанные на определении антител Ig M/Ig G или особая роль принадлежит компьютерной томографии легких. Выводы: положительный результат подтверждает наличие вируса, но отрицательный результат не всегда означает отсутствие инфекции, поэтому одного метода недостаточно для окончательного диагноза пациента, и следует принимать во внимание эпидемиологические, клинические, параклинические характеристики.

Ключевые слова: «COVID-19», «лабораторная диагностика», «ложноотрицательный».

Introducere

Focarul prezent al unei boli respiratorii acute asociate coronavirusului numită boala coronavirusului de tip nou 19 (COVID-19) este a treia răspândire documentată în numai două decenii a unui coronavirus animal la oameni, care a dus la o epidemie majoră. Acest nou focar, definit de către Comitetul internațional pentru taxonomia virușilor drept boala coronavirusului nou 2019 (COVID-19), este determinat de coronavirusul sindromului respirator acut sever 2 (SARS-CoV-2) [1]. Conform Organizației Mondiale a Sănătății (OMS) începând cu decembrie 2019, în doar 5 luni, pandemia COVID-19 s-a extins în 216 țări și a afectat peste patru milioane de persoane [2].

Deși erorile de diagnostic pot apărea aproape întotdeauna și peste tot în asistența medicală, datorită creșterii exponențiale a cazurilor pozitive SARS-CoV-2 se evidențiază vulnerabilitatea serviciilor de medicină de laborator [14] care este accentuată din cauzele forțării personalului să se confrunte cu sarcini mari de muncă și sub presiune severă [3]. Astfel, odată cu dezvoltarea pandemiei au apărut noi provocări în diagnosticul de laborator al infecției cu COVID-19, una dintre ele fiind cazurile fals negative. Luând în considerare consecințele clinice și economice ale acestor erori de diagnostic care sunt întotdeauna semnificative mai ales atunci când acestea presupun relevanța bolii pandemice, cum ar fi COVID-19, repercusiunile sunt ample fără îndoială. Așadar, cunoașterea metodelor de laborator foarte sensibile și specifice sunt importante pentru controlul evoluției rapide a bolii coronavirusului asociat cu SARS-CoV-2.

Scopul acestui articol este analizarea posibilelor cauze ale apariției rezultatelor fals negative în procesul de diagnosticare a pacienților cu COVID-19 și managementul situațiilor respective

Materiale și metode. A fost efectuată o revizuire sistematică a literaturii utilizând bazele de date Medline, Pub Med, pentru identificarea articolelor relevante, cu referire la „COVID-19”, „diagnostic de laborator”, „fals negativ”.

Rezultate. Medicina de laborator joacă un rol esențial pentru diagnosticarea și managementul multor patologii umane, inclusiv bolile infecțioase și CO-

VID-19 [15], detectarea falsă de laborator ar putea duce la un diagnostic eronat al pacienților infecțioși, a pacienților externati chiar și apariția unor potențiale probleme de siguranță în transfuzia de sânge [4].

Până în prezent, au fost dezvoltate mai multe teste pentru diagnosticarea infecției cu SARS-CoV-2. Este necesar de a cunoaște o imagine de ansamblu asupra potențialelor vulnerabilități preanalitice și analitice ale testării RT-PCR pentru diagnosticarea infecției SARS-CoV-2 [18]. În stadiul preanalitic, colectarea adecvată a probelor din tractul respirator, la momentul potrivit, din locul anatomic corect este esențială pentru un diagnostic molecular prompt și precis al COVID-19 [5]. Prezența virusului a fost detectată în căile respiratorii superioare și inferioare, incluzând gâtul, nazofaringele sputa și lichidul bronho-alveolar [6]. SARS-CoV este de asemenea detectat în probe de scaun, urină și sânge, deși rezultatul este mai puțin fiabil decât din probele respiratorii [7]. Calitate slabă a probei, manipularea, transportul și/sau depozitarea incorectă precum și extracția eșantionului slab sau prezența inhibitorilor PCR în ARN-ul extras ar putea explica un rezultat negativ la o persoană infectată cu virus COVID-19, (pentru a controla acest lucru, calitativ poate fi efectuată detectarea unei gene umane housekeeping) [16]. Sunt necesare măsuri adecvate pentru a menține în siguranță personalul laboratorului, producând în același timp rezultate de testare fiabile. În stadiul analitic, testele RT-PCR în timp real rămân testul molecular ales pentru diagnosticul etiologic al infecției cu SARS-CoV-2, în timp ce tehnicile bazate pe anticorpi sunt introduse ca instrumente suplimentare [3]. Disponibilitatea unor rezultate corecte poate fi amenințată atunci când testarea este depășită, cum ar fi momentul în care cererea de reactivi de laborator depășește capacitate de aprovizionare, personalul laboratorului este epuizat și programul de lucru este prelungit, numărul de eșantioane primite depășește capacitatea de depozitare sigură, personalul se infectează sau este altfel incapabil să își îndeplinească obligațiunile (de ex. în carantină) sau utilajul de laborator nu mai pot fi deservit sau întreținut corespunzător [8].

Standardul de aur actual pentru diagnosticul etiologic al infecției cu SARS-CoV-2 este reacția de po-

limerizare în lanţ cu detecţie în timp real (RT-PCR) cu probe din tractul respirator [4]. În studiile clinice supuse procedurii de aprobare de către Administraţia Naţională a Produselor Medicale, toate trusele au prezentat o sensibilitate ridicată de peste 90% din cazurile confirmate. Cu toate acestea, în medii clinice reale, ratele de diagnostic pozitive ale pacienţilor suspecţi nu au fost la fel de mari decât au fost evaluate anterior. Mulţi pacienţi suspecţi au prezentat simptome clinice tipice sau semne imagistice în concordanţă cu pneumonia, dar nu s-au găsit pozitivi în testarea RT-PCR [9].

Faptul că testele pot fi iniţial negative, nu este cu adevărat surprinzător, având în vedere cinetica infecţiei SARS-CoV-2. În cazul în care proba a fost colectată într-un moment în care pacientul nu a prezentat cantităţi suficiente de virus, de exemplu foarte devreme sau foarte târziu în timpul infecţiei s-ar putea explica un rezultat negativ la o persoană infectată cu virus COVID-19. Luând în considerare că SARS-CoV-2 este un virus ARN monocatenar, izolarea genomului său necesită o manipulare prudentă a probelor în concordanţă cu bunele practici de laborator. Din cauza contagiozităţii SARS-CoV-2, multe laboratoare chineze au inactivat virusul la 56-60°C timp de 30-60 min înainte de extragerea ARN-ului [10]. De asemenea, a fost recomandată inactivarea termică la 56°C pentru a asigura securitatea personalului medical. Astfel un studiu pe douăzeci şi trei de pacienţi confirmaţi cu infecţie cu SARS-CoV-2 s-a efectuat la Beijing, s-au investigat efectele inactivării termice asupra rezultatelor cantitative ale RT-PCR ale SARS-CoV-2 şi s-au evaluat rezultatele fals negative datorate inactivării termice [9]. S-a constatat că inactivarea termică ar putea contribui la o scădere a cantităţii detectabile de acid nucleic viral şi a creşterii valorilor Ct (numărul ciclului la care fluorescenţa generată în cadrul unei reacţii depăşeşte pragul de fluorescenţă) în detectarea RT-PCR, însă inactivarea termică nu a demonstrat nicio influenţă semnificativă asupra rezultatelor calitative pentru probele cu sarcini virale mari [5]. Cu toate acestea, pentru eşantioanele slab pozitive (valoarea Ct variază între 33,37 şi 36,89), inactivarea termică ar putea fi una dintre cauzele posibile ale rezultatelor fals-negative în detectarea de laborator a SARS-CoV-2. Din studiul respectiv s-a constatat că aproape jumătate din probele slab pozitive (7 din 15 probe, 46,7%) au prezentat rezultate calitative fals-negative după inactivarea termică

Conform dovezilor recente, acurateţea diagnostică a multor teste RT-PCR disponibile în prezent pentru detectarea SARS-CoV-2 poate fi mai mică decât cea optimă (adică 100%). Xie şi colaboratorii săi pentru prima dată a descris cazul a cinci din 167 de

pacienţi (3,0%) cu semen de COVID-19 la tomografia computerizată, care iniţial au fost testaţi negativi pentru SARS-CoV-2 la RT-PCR [4].

Un alt studiu a fost efectuat pe un lot de 36 de pacienţi diagnosticaţi cu pneumonie COVID-19. Treizeci şi cinci de pacienţi au prezentat constatări anormale a CT, în timp ce un pacient a avut un CT normal. Utilizând RT-PCR, 30 de pacienţi au fost testaţi pozitiv, cu 6 cazuri ratate iniţial. Printre aceşti 6 pacienţi, 3 au devenit pozitivi la cea de-a doua analiză RT-PCR (după 2 zile, şi respectiv 3 zile), iar ceilalţi 3 au devenit pozitivi doar în a treia rundă de teste RT-PCR (după 5, 6 şi respectiv 8 zile). La prezentare, sensibilitatea CT a fost, prin urmare, de 97,2%, în timp ce sensibilitatea RT-PCR iniţială a fost de doar 83,3%. Acest studiu însă a avut unele limitări. În primul rând, din cauza focarului de pneumonie COVID-19 în această zonă, furnizarea de kituri de detectare a acidului nucleic a fost limitată, iar examenele RT-PCR au fost efectuate numai la pacienţii cu febră şi teste CT pozitive. În plus, dimensiunea eşantionului acestui studiu a fost mică, iar cazurile nu au fost monitorizate din cauza constrângerilor de timp. Prin urmare, sunt necesare dimensiuni mai mari de eşantion pentru verificări suplimentare. Se recomandă ca pacienţii cu rezultate pozitive de imagistică, dar rezultatele negative ale RT-PCR să fie izolaţi iar RT-PCR să fie repetată pentru a evita diagnosticarea greşită [11].

Dintr-o perspectivă clinică, caracteristicile CT ar putea fi utilizate ca prima şi imediată referinţă pentru medici pentru a analiza cazurile foarte suspecte şi pentru a lua măsuri necesare, în timp ce rRT-PCR serveşte ca instrument de confirmare ale cărui rezultate ar putea fi utilizate ulterior pentru a decide acţiunea ulterioară a continuării tratamentului izolat sau externării [12].

ARN viral insuficient la punctul de detectare poate duce la rezultate negative. Din această cauză, este important să se utilizeze şi analize bazate pe teste imunologice pentru a determina expunerea la SARS-CoV-2, precum şi pentru a contribui la supravegherea persoanelor cu expunere anterioară la SARS-CoV-2. Testele bazate pe detectarea anticorpilor IgM/IgG pot fi limitate datorită reactivităţii încrucişate cu alţi coronavirusi care sunt prezenţi în mod normal în comunitate şi care îngreunează interpretarea rezultatelor. Mai mult, dinamica anticorpilor, răspunsul şi producţia în diferitele etape ale infecţiei nu sunt încă stabilite în prezent, ceea ce limitează în continuare utilizarea acestor teste. Unele studii au arătat că în primele 6-7 zile de la debutul simptomelor, mai puţin de 40% dintre pacienţi au anticorpi detectabili. Astfel, testele serologice ar trebui să nu fie folosite pentru a exclude un caz în primele zile de boală. De asemenea, detecta-

rea anticorpilor după ziua a 7-a indică contactul anterior cu virusul, dar nu confirmă prezența și extinderea virusului.

În decurs de 4 luni, s-au făcut studii ample pentru a dezvolta sisteme serologice pentru a caracteriza profilurile de anticorpi, precum și pentru a identifica și genera anticorpi potențial de neutralizare în timpul infecției cu SARS-CoV-2. În figura 1 observăm anticorpii specifici SARS-CoV-2 (în albastru): IgM este detectabil încă de la a 3-a zi de la debutul bolii și vârfurile sunt între 2 și 3 săptămâni. Răspunsul IgM a fost încă detectabil după mai mult de o lună de la debutul bolii. Atât IgA cât și IgG sunt prezente la a 4-a zi de la debutul bolii, iar vârfurile apar după 2 săptămâni de la debutul bolii în probele de ser. În prezent, nu există rapoarte despre prezența acestor anticorpi specifici SARS-CoV-2 în faza ulterioară după debutul bolii, așa cum este indicat de liniile punctate. Aceasta descrie importanța studiilor serologice pentru identificarea indivizilor cu expunere curentă sau anterioară la SARS-CoV-2 care a fost nedetectată, prin testarea anticorpilor IgM, IgG sau IgA împotriva SARS-CoV-2. Ilustrația a fost creată folosind Bio-Rende, (Fig.1) [13].

Însă, ca în cazul oricărei analize de detecție moleculară, mutațiile virusului în regiunile vizate de teste ar putea afecta sensibilitatea detectării. Testele bazate pe detectarea anticorpilor IgM/IgG pot susține investigarea focarului și seroprevalența. Mai multe teste

(atât ELISA, cât și teste de diagnostic rapid) sunt disponibile pentru detectarea anticorpilor IgM/IgG și sunt comercializate pentru detectarea infecțiilor cu virus COVID-19. Cu toate acestea, până în prezent, aceste teste nu sunt recomandate pentru utilizare [17].

Deoarece testele RT-PCR servesc ca metoda standard de aur pentru a confirma infecția cu SARS-CoV-2, rezultatele fals-negative ar putea împiedica prevenirea și controlul epidemiei, în special că acest test joacă un rol de referință în decizia necesității externării sau continuării a izolării. Starea de evoluție a bolii (momentul și metodele de recoltare a eprubetelor) și coinfectia cu alte virusuri ar putea influența acuratețea testului RT-PCR, care ar trebui studiat în continuare [12]. Detecția precoce a infecției cu SARS-CoV-2 este una dintre intervențiile cruciale pentru controlul transmiterii virusului [13].

Concluzii. După cum demonstrează epidemiile anterioare, inclusiv SARS (sindromul respirator acut sever) și MERS (sindromul respirator din Orientul Mijlociu), diagnosticul de laborator extrem de sensibil și specific sunt esențiale pentru identificarea cazurilor, urmărirea contactelor, găsierea surselor și măsurilor de prevenție eficiente și raționale pentru a nu răspîndi infecția. Identificarea precisă a cazurilor este esențială pentru a izola persoanele vulnerabile. Testarea eficientă a persoanelor din contact cu pacienți cu risc ridicat, poate permite protecția subiecților cu multiple comorbidități. Decizia de testare ar trebui

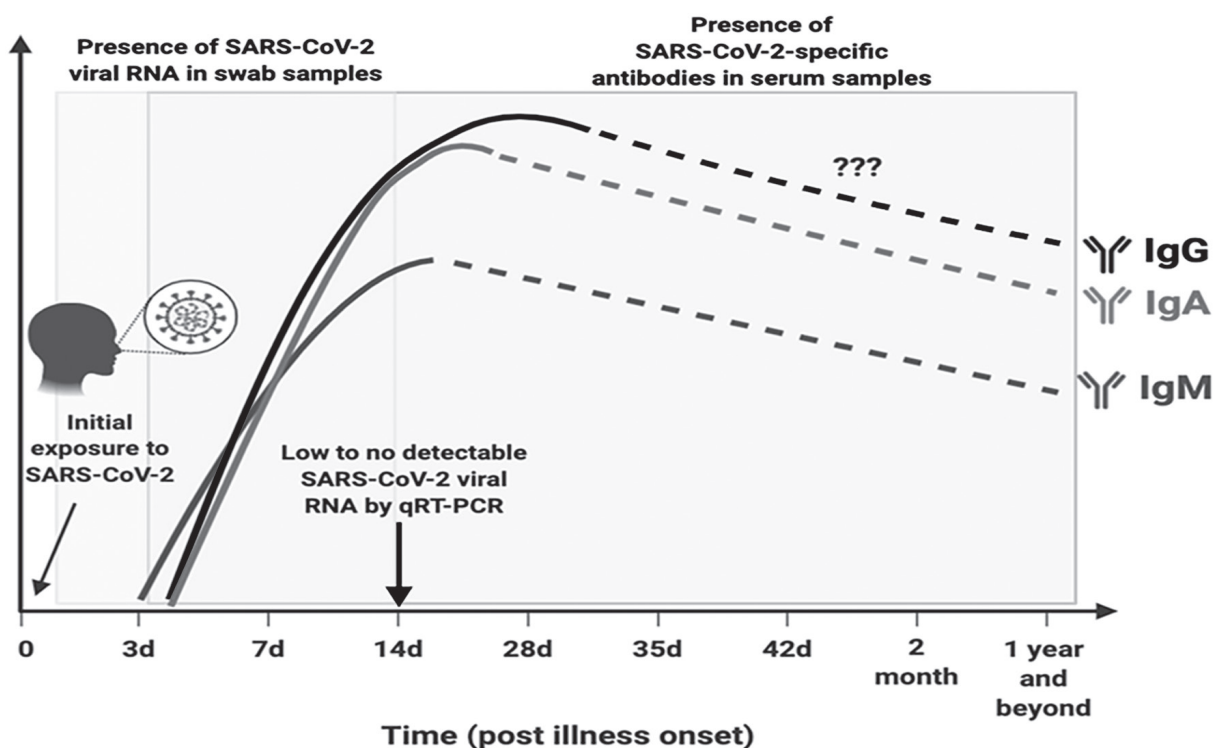


Fig.1. Ilustrație schematică a perioadei de detectare a ARN-ului viral sau a anticorpilor la persoanele infectate cu SARS-CoV-2

să se bazeze pe factori clinici și epidemiologici și să fie legată de o evaluare a probabilității de infecție, în special atunci când disponibilitatea testelor este limitată. Tomografia computerizată a plămânului poate fi utilizată ca test-cheie de diagnostic în COVID-19. Testele de detecție a anticorpilor și antigenului seric ar fi cele mai ușoare și mai rapide, dar nu au fost încă validate și poate exista reactivitate încrucișată cu alți coronavirusi, în plus anticorpii detectați pot rezulta dintr-o infecție anterioară și nu din infecția acută pentru care diagnosticul este necesar.

Un rezultat pozitiv confirmă detectarea virusului, dar un rezultat negativ nu întotdeauna semnifică absența infecției, de aceea o singură metodă nu este suficientă pentru diagnosticul final al pacientului, dar trebuie luate în considerare și caracteristicile epidemiologice, clinice, paraclinice.

Bibliografie

1. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* 2020. doi: 10.1038/s41564-020-0695-z
2. WHO, COVID19. Available from <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>
3. Laboratory Diagnosis of COVID-19: Current Issues and Challenges Yi-Wei Tang, Jonathan E. Schmitz, David H. Persing, Charles W. Stratton *Alexander J. McAdam, Editor* DOI: 10.1128/JCM.00512
4. Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19) <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-0285> Received March 9, 2020; accepted March 10, 2020
5. SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. *N Engl J Med* 382:1177–1179. doi:10.1056/NEJMc2001737
6. Gaunt ER, Hardie A, Claas EC, et al. Epidemiology and clinical presentations of the four human coronaviruses 229E, real-time PCR method. *J Clin Microbiol*. 2010;48(8):2940–2947. doi:2910.1128/JCM.0063600610.
7. Zhang Q, Zhao Q. Inactivating porcine coronavirus before nuclei acid isolation with the temperature higher than 56C damages its genome integrity seriously. Preprint at <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.02.20.958785v1> (2020).
8. Laboratory testing strategy recommendations for COVID-19, Interim guidance 21 March 2020
9. Potential False-Negative Nucleic Acid Testing Results for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 from Thermal Inactivation of Samples with Low Viral Load
10. Zhang Q, Zhao Q. Inactivating porcine coronavirus before nuclei acid isolation with the temperature higher than 56C damages its genome integrity seriously. Preprint at <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.02.20.958785v1> (2020).
11. Diagnosis of the Coronavirus disease (COVID-19): rRT-PCR or CT? *European Journal of Radiology* 126 (2020) 108961
12. False-Negative Results of Real-Time Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2: Role of Deep-Learning-Based CT Diagnosis and Insights from Two Cases *Korean J Radiol*. 2020 Apr; 21(4): 505–508. Published online 2020 Mar 5. doi: 10.3348/kjr.2020.0146.
13. Serological Approaches for COVID-19: Epidemiologic Perspective on Surveillance and Control *Front. Immunol.*, 24 April 2020 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00879>
14. Sheridan C. Coronavirus and the race to distribute reliable diagnostics. *Nat Biotechnol* 2020. Doi: 10.1038/d41587-020-00002-2.
15. Lippi G, Plebani M. Laboratory abnormalities in patients with COVID-2019 infection. *Clin Chem Lab Med* 2020. doi: 10.1515/cclm-2020-0198. [Epub ahead of print].
16. Jin YH, Cai L, Cheng ZS, Cheng H, Deng T, Fan YP, et al. A rapid advice guideline for the diagnosis and treatment of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infected pneumonia (standard version). *Mil Med Res* 2020;7:4.
17. Lippi G, Plebani M. The novel coronavirus (2019-nCoV) outbreak: think the unthinkable and be prepared to face the challenge. *Diagnosis (Berl)* 2020. doi: 10.1515/dx-2020-0015. [Epub ahead of print].
18. Lippi G, von Meyer A, Cadamuro J, Simundic AM. PREDICT: a checklist for preventing preanalytical diagnostic errors in clinical trials. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:518–26.