

ORIGINAL BREVE

# Evaluación del umbral de ciclo de la RT-PCR en tiempo real para SARS-CoV-2

Jhonatan M. Ipanaqué-Chozo <sup>1,a</sup> | Daniel Aguilar-Rivera <sup>1,b</sup> | Juan J. Torres-Oliva <sup>1,b</sup> | José W. Lozada-Castillo <sup>1,a</sup>

1. Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas, Lima, Perú.

a. Biólogo.

b. Médico.

**Correspondencia:**

Jhontan M. Ipanaqué-Chozo  
Correo electrónico:  
jhonatan.ipch@gmail.com

## Resumen

**Objetivo:** Evaluar el umbral de ciclo (Ct) de los marcadores E y N2 para detección de SARS-CoV-2 de la RT-PCR en tiempo real y relacionarlos con la edad y el servicio de procedencia de los pacientes. **Materiales y métodos:** Se realizó un ensayo RT-PCR en tiempo real, obteniendo el umbral de ciclo de 95 pacientes, procedentes de diferentes servicios. **Resultados:** El servicio ambulatorio fue el más alto (67,4 %); teniendo edades promedio entre 1 a 89 años. Respecto a los genes "N2" y "E", se determinó, que no existe diferencia significativa en relación con el grupo etario; sin embargo, al realizar análisis inferencial, para la variable tipo de proteína, se concluyó que, existía diferencia significativa. **Conclusiones:** El SARS CoV-2, es una etiología, presente en diferentes grupos etarios, siendo más susceptibles por encima de los 50 años, además que el valor umbral de los genes, no suele guardar relación; este valor puede variar dependiendo de la metodología que se use.

**Palabras clave:** Umbral de ciclo, RT-PCR en tiempo real, gen N2, gen E. (Fuente: DeCS BIREM)

## Evaluation of the real-time RT-PCR cycle threshold for SARS-CoV-2

### Abstract

**Objective:** To evaluate the cycle threshold (Ct) of the E and N2 markers for detection of SARS-CoV-2 in real-time RT-PCR and relate them to the age and service of origin of the patients. **Materials and methods:** A real-time RT-PCR assay was performed, obtaining the cycle threshold of 95 patients from different services. **Results:** The outpatient service was the highest (67.4 %); having average ages between 1 to 89 years. Regarding the "N2" and "E" genes, it was determined that there is no significant difference in relation to the age group, however, when performing inferential analysis, for the type of protein variable, it was concluded that there was a significant difference. **Conclusions:** SARS COV 2 is an etiology, present in different age groups, being more susceptible over 50 years of age, in addition to the threshold value of the genes, it is not usually related; this value may vary depending on the methodology used.

**Key words:** Cycle threshold, real-time RT-PCR, N2 gene, E gene. (Source: MeSH-NLM)

## INTRODUCCIÓN

Los coronavirus son una familia de virus causantes de enfermedades en humanos y animales <sup>(1)</sup>. En el 2019, en la ciudad de Wuhan, China, aparecieron los primeros reportes de una especie de coronavirus que más adelante se denominaría SARS-CoV-2 <sup>(2)</sup>. Este es un virus de ARN con polaridad positiva <sup>(3)</sup>, presenta numerosas proteínas, destacando la proteína S (del inglés spike), importante durante el proceso de infección <sup>(4)</sup>. La enfermedad por coronavirus (COVID-19) producida por el SARS-CoV-2 puede sospecharse clínicamente por la presencia de fiebre de inicio reciente o síntomas de tracto respiratorio como tos, pérdida del olfato y gusto. A pesar de que no hay características específicas que permitan diferenciar la COVID-19 de otras infecciones virales de tracto respiratorio, la presencia de disnea después de una semana del inicio de síntomas es sugerente de COVID-19 <sup>(5)</sup>.

Los métodos de diagnóstico para la detección de SARS-CoV-2 están basadas en la detección específica de anticuerpos, antígenos o ARN virales, siendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés polymerase chain reaction) para detección del ARN, el método más confiable <sup>(6)</sup>. La prueba Xpert Xpress SARS-CoV-2 <sup>(7)</sup> es una prueba de diagnóstico molecular in vitro para la detección del SARS-CoV-2 y se basa en la tecnología de amplificación por PCR de segmentos específicos del gen spike y el ácido nucleico viral, previa retro transcripción (RT) hacia ADN en un procedimiento denominado RT-PCR a tiempo real <sup>(8)</sup>.

La amplificación del material genético específico se revela cuando aparece una señal fluorescente detectable durante el ensayo, conocido como umbral de ciclo o cycle threshold (Ct) <sup>(9)</sup>. El Ct es el número de ciclos en el que la señal fluorescente cruza este umbral. Para valorar la presencia del virus en la muestra <sup>(10)</sup>, se determina el número de ciclos Ct de RT-PCR necesarios para que la prueba resulte positiva, es decir, indica el momento preciso de la amplificación en el que la prueba es capaz de identificar la presencia de la diana molecular investigada, sin indicar la cantidad presente <sup>(11)</sup>. El valor de Ct es semicuantitativo e inverso a la cantidad de ARN de la muestra, de tal manera que un número bajo de este se relaciona con una mayor carga viral <sup>(9)</sup>.

El presente trabajo busca evaluar el umbral de ciclo (Ct) de los marcadores E y N2 para detección de SARS-CoV-2 de la RT-PCR en tiempo real y relacionarlos con la edad y el servicio de procedencia de los pacientes.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio observacional, descriptivo y retrospectivo.

La población estuvo constituida por las 95 muestras de hisopado nasofaríngeo de pacientes que dieron positivos al SARS-CoV-2 procedentes de un establecimiento de salud en Lima, Perú.

Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Se tomaron hisopados nasofaríngeos, a pacientes con sintomatología respiratoria, luego se les realizó, la prueba de PCR en tiempo real, según las indicaciones señalizadas por cepheid xpert xpress SARS-CoV-2, en el cual se considera positivo toda muestra que se detecte material genético, procedente de los genes E y N2, siendo el último como confirmativa. Se obtuvo un valor Ct que fue registrado en el cuaderno de trabajo, para la posterior evaluación. Los datos referentes a procedencia, edad y sexo fueron obtenidos de las ordenes médicas.

Se calcularon las frecuencias absolutas y relativas de las variables categóricas, y medidas de tendencia central y dispersión de las numéricas. Se calculó la mediana y el rango Inter cuartil de variables cuantitativas; para dar información de una medida de tendencia central y dispersión del Ct, se estimó la asociación de valor de CT en relación con el grupo etario, mediante la prueba de coeficiente de correlación de Spearman. Por último, se realizó la prueba de Wilcoxon, para el análisis interferencial entre los genes evaluados.

Los investigadores declaran conocer y haber observado los principios bioéticos durante el desarrollo del estudio, el mismo que tuvo implicancias menores por tratarse de uno retrospectivo. Se solicitó autorización de la institución para la recolección de los datos. Se mantuvo la confidencialidad de la información recolectada, la misma que fue de acceso restringido a los investigadores, la misma que fue eliminada posterior a los análisis de los datos.

## RESULTADOS

Se analizaron 95 valores de Ct obtenidos de pacientes que dieron positivo para el SARS CoV-2, mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real utilizando el reactivo cepheid xpert xpress SARS-CoV-2. El mayor número de muestras fueron procedentes del servicio ambulatorio (67,4 %), la edad promedio estuvo entre 1 a 89 años, teniendo una mediana de 52 años. (Tabla 1).

**Tabla 1.** Características de los pacientes de los cuales procedieron las muestras de hisopado nasofaríngeo.

Marcador	N	%
<b>Edad*</b>	<b>52</b>	<b>38 - 65</b>
<b>Servicio</b>		
Emergencia	3	3,2
Ambulatorio	64	67,4
Hospitalizado	28	29,5

\* Mediana y cuartil 1 a cuartil 3

Al realizar la prueba de Wilcoxon para la variable marcador, se concluyó que, existía diferencia significativa, entre los umbrales de ciclo aplicado para los genes N2 y E, respectivamente. (Tabla 2)

**Tabla 2.** Medidas de centralización, posición y dispersión del umbral de ciclo (Ct) de la RT-PCR en tiempo real para en la detección de SARS-CoV-2, en el equipo automatizado Cepheid Xpert Xpress (N=95).

Marcador	Mediana	C1 - C3	Min-Max	Valor de p
<b>Gen N2</b>	26,5	20,6 - 36,1	14,0 - 39,5	<0,001
<b>Gen E</b>	24,8	18,1 - 34,4	11,4 - 39,4	

Q1 - Q3= cuartil 1 a cuartil 3, valor de p de prueba de Wilcoxon

Respecto al umbral de ciclo para los genes "N2" y "E", se determinó, que no existe diferencia significativa al compararlo con el grupo etario, de la misma manera al relacionarlo con la procedencia de la muestra (Tabla 3).

**Tabla 3.** Relación entre los umbrales de ciclo (Ct) de los marcadores del gen N2 y E de la RT-PCR en tiempo real para en la detección de SARS-CoV-2 mediante el equipo automatizado Cepheid Xpert Xpress, con la edad y tipo de servicio (N=95).

Marcador	Gen N2		Gen E	
	Mediana	Valor p	Mediana	Valor p
<b>Edad*</b>	0,002	0,880	0,020	0,982
<b>Servicio</b>				
Ambulatorio	26,5		24,9	
Emergencia	29,8	0,670	27,9	0,816
Hospitalizado	25,5		23,45	

\* Rho y valor de p de Spearman, valor de p de Kruskal-Wallis

## DISCUSIÓN

El presente estudio, encontró que la frecuencia más alta se dio en pacientes procedentes del servicio ambulatorio. Además, que existió variabilidad respecto al grupo etario; sin embargo, la media de edad estuvo por encima de los 50 años, considerándose como el grupo más afectado respecto a la incidencia de casos (Tabla 1) lo cual coincide a los reportados por Ade y Al Dossario <sup>(9,12)</sup>. En general, las infecciones respiratorias suelen ser más frecuentes en pacientes de edades muy avanzadas como consecuencia de múltiples factores, destacando en ocasiones el factor inmunitario que suele ser de mucha importancia al momento de combatir algún proceso infeccioso. El SARS CoV- 2, constituyó una enfermedad viral que, dentro del grupo con mayor incidencia de casos positivos a nivel mundial, se dieron en personas con enfermedades autoinmunes y en edades avanzadas <sup>(13)</sup>. Por otro lado, el grupo con menos incidencia en casos positivos se dieron en edades que oscilan por debajo de los 20 años, resultados similares a los encontrados por Ade *et al.* <sup>(9)</sup>, quienes establecen que la edad con menos incidencia en casos por infección por SARS CoV 2, se da en este rango de edad.

Respecto al umbral de ciclo, obtenidos para los genes N2 y E, se obtuvieron diferentes valores que, al compararlas, se determinó que existía diferencia significativa, entre ambos (Tabla 2). La prueba Xpert Xpress SARS-CoV-2 <sup>(7)</sup>, se basa en la detección de dos genes específicos, el gen E, que es indicativo de la familia de los coronavirus, mientras que el gen N2, hace referencia al SARS-CoV-2; sin embargo, hasta el momento no se encontraron referencias que puedan sustentar la variación del Ct en la detección de ambos genes.

En relación con la edad y el umbral de ciclo obtenidos de los genes, se pudo observar que no existía relación entre ambas variables (Tabla 3). El Ct es un valor indicativo, que se considera, para algunos autores, indicativo de carga viral y no depende del grupo etario, sino depende del grado de la enfermedad, debido a que se considera que es inversamente proporcional a la carga de un microorganismo, siendo este concepto un tema, aun de estudio <sup>(11)</sup>. Los valores umbrales obtenidos para ambos genes, en comparación con los servicios de procedencia del paciente, se encontraba por encima de 25 (Tabla 3).

El ciclo umbral para muchos sigue siendo un factor importante respecto al reporte del resultado debido a que puede ofrecer relación entre el valor obtenido y la carga viral que podría estar circulando en un paciente <sup>(11)</sup>, de tal manera que podría evitarse en un futuro, eventos adversos en la salud del paciente <sup>(10)</sup>. Sin embargo, este valor sigue siendo solo un número que aún no se encuentra estandarizado para poder predecir sucesos como: gravedad de la enfermedad, carga viral o índice de contagio del paciente <sup>(15)</sup>. Para muchos autores, valores de Ct por encima de 37, suele ser indicativo del término de la infección; por tal motivo, se considera a las personas que suelen tener estos valores de Ct, como personas sin riesgo de infección <sup>(11)</sup>; no obstante, para personas inmunodeprimidas, estos valores no

están muy esclarecidos debido a que constituyen un grupo con riesgo muy alto, para el cual la mínima exposición a algún agente patógeno pondría en riesgo su integridad.

Sin duda, el presente estudio presentó limitaciones que pudieron afectar las estimaciones realizadas. Por un lado, al considerarse un grupo limitado de muestra de estudio, pudo haberse sobreestimado la frecuencia del umbral de ciclo de igual manera que el grupo etario y por otro, el solo uso una metodología para la evaluación del SARS- CoV2.

En conclusión, COVID-19 es una etiología que se presenta en diferentes grupos etarios, siendo el grupo de 50 años a más el grupo con mayor frecuencia. En relación con los genes evaluados, no existe relación significativa entre el umbral de ciclo de ambos genes evaluados, por lo que no se puede inferir que alguno se exprese en mayor porcentaje, durante el proceso de la enfermedad. Además, el servicio con mayor frecuencia de casos se dio en muestras ambulatorias, debido que las solicitudes fueron en mayor número, que de los pacientes hospitalizados.

**Conflicto de intereses:** Los autores declaran no tener conflictos de interés.

**Financiamiento:** Autofinanciamiento.

## REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

- Bordoy AE, Saludes V, Panisello Yagüe D, Clarà G, Soler L, Paris de León A, et al. Monitoring SARS-CoV-2 variant transitions using differences in diagnostic cycle threshold values of target genes. *Sci Rep.* 2022;12(1). Doi: 10.1038/s41598-022-25719-9
- Safiabadi-Tali SH, LeBlanc JJ, Sadiq Z, Oyewunmi OD, Camargo C, Nikpour B, et al. Tools and techniques for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 detection. *Clin Microbiol Rev.* 2021;34(3):e00228-20. doi: 10.1128/CMR.00228-20.
- Sharma A, Ahmad Farouk I, Lal SK. Covid-19: A review on the novel coronavirus disease evolution, transmission, detection, control and prevention. *Viruses.* 2021;13(2):1–25. doi: 10.3390/v13020202.
- Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Vol. 19, Nat Rev Microbiol.* 2021; 19:141–54. 10.1038/s41579-020-00459-7
- McIntosh K. COVID-19: Clinical Features. En: Hirsch Martin S, Bogorodskaya M, editores. UpToDate. [Internet]. Waltham (MA): UpToDate Inc; 2023. [Actualizado 07 diciembre de 2022; citado 21 de marzo de 2023]. Disponible en: [https://www.uptodate.com/contents/covid-19-clinical-features?topicRef=126981&source=ee\\_link](https://www.uptodate.com/contents/covid-19-clinical-features?topicRef=126981&source=ee_link)
- Andriamandimby SF, Brook CE, Razanajatovo N, Randriambolamanantsoa TH, Rakotondramanga JM, Rasambainarivo F, et al. Cross-sectional cycle threshold values reflect epidemic dynamics of COVID-19 in Madagascar. *Epidemics.* 2022 Mar 1;38. Doi: 10.1016/j.epidem.2021.100533
- Wolters F, van de Bovenkamp J, van den Bosch B, van den Brink S, Broeders M, Chung NH, et al. Multi-center evaluation of cepheid xpert® xpress SARS-CoV-2 point-of-care test during the SARS-CoV-2 pandemic. *J Clin Virol.* 2020;128. DOI: 10.1016/j.jcv.2020.104426
- Cepheid. In Vitro Diagnostic Medical Device Xpert® Xpress SARS-CoV-2 XPRSARS-COV2-10 Instructions for Use For use with GeneXpert System with Touchscreen Running Cepheid OS. 2022. Disponible en: [www.cepheid.com/content/dam/www-cepheid-com/documents/package-insert-files/Xpert%20Xpress%20SARS-CoV-2%20CE-IVD%20GeneXpert%20System%20With%20Touchscreen%20302-8405-EN%20Rev%20B.pdf](http://www.cepheid.com/content/dam/www-cepheid-com/documents/package-insert-files/Xpert%20Xpress%20SARS-CoV-2%20CE-IVD%20GeneXpert%20System%20With%20Touchscreen%20302-8405-EN%20Rev%20B.pdf)
- Ade C, Pum J, Abele I, Raggub L, Bockmühl D, Zöllner B. Analysis of cycle threshold values in SARS-CoV-2-PCR in a long-term study. *Journal of Clinical Virology.* 2021 May 1;138. doi: 10.1016/j.jcv.2021.104791
- Al-Shareef AS, Shirah B, Dabroom M, Ahmed MM, Aljohani KA, Al Dabbagh MA, et al. Cycle Threshold Value as a Predictor of Severity and Intensive Care Unit Admission for Children Presenting to the Emergency Department With COVID-19: A Single-Center Experience From Saudi Arabia. *Cureus.* 2022; 14(7), e26614. DOI: doi.org/10.7759/cureus.26614
- Serrano-Cumplido A, Ruiz Garcia A, Segura-Fragoso A, Olmo-Quintana V, Micó Pérez RM, Barquilla-García A, et al. Application of the PCR number of cycle threshold value (Ct) in COVID-19. *Semerger.* 2021;47(5)337-341. Doi: 10.1016/j.semerg.2021.05.003.
- Al Dossary R, Alnimr A, Aljindan R, Alkharsah KR, Al-Qurayn AK, Eltreifi O, et al. Predictors of illness severity in COVID-19 cases in Saudi Arabia. *Infect Drug Resist.* 2021;14:4097–105. DOI: 10.2147/IDR.S333300
- Magleby R, Westblade LF, Trzebucki A, Simon MS, Rajan M, Park J, et al. Impact of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viral Load on Risk of Intubation and Mortality among Hospitalized Patients with Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis.* 2021;73(11):4197–205. Doi: 10.1093/cid/ciaa851.
- Aranha C, Patel V, Bhor V, Gogoi D. Cycle threshold values in RT-PCR to determine dynamics of SARS-CoV-2 viral load: An approach to reduce the isolation period for COVID-19 patients. *J Med Virol.* 2021 Dec 1;93(12):6794–7. Doi: 10.1002/jmv.27206