

## ARTÍCULO ORIGINAL

# Estudio comparativo de nuevos métodos para el diagnóstico de SARS-CoV-2: *boiling* sin extracción de ácidos nucleicos y testeo en pools

*Strategies to optimize diagnostic resources in times of pandemic.*

Martelli, Antonella<sup>1</sup>; Baffico, María Luz<sup>1</sup>; Cesano Riso, Griselda Raquel<sup>1</sup>; Torres, Magalí<sup>1</sup>; Amaya, Lucas Joel<sup>1</sup>; Echegoyen, Natalia Andrea<sup>1</sup>; Lucero, Alicia María<sup>1</sup>; Videla, Cristina<sup>1</sup>; Martínez, Alfredo Pedro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Análisis Clínicos, Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas (CEMIC). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

\*Contacto: Martelli, Antonella. Departamento de Análisis Clínicos, CEMIC, CP 1431. Correo electrónico: amartelli@cemic.edu.ar

## Resumen

**Introducción:** La OMS declara la pandemia por SARS-CoV-2 en marzo de 2020. A partir de ese momento, se transforma en el *gold standard* para su diagnóstico la PCR en tiempo real (rt PCR). Ante la demanda excesiva de reactivos y la falta de los mismos, se ensayan alternativas para optimizarlos. **Objetivo:** Comparar métodos de extracción de ácidos nucleicos: el método tradicional versus la inactivación con calor (*boiling*) y el procesamiento individual versus la realización de mezclas de muestras (*pooling*) en el diagnóstico de SARS-CoV-2. **Materiales y métodos:** Se usaron hisopados nasofaríngeos en medio de transporte para virus o en agua libre de RNasas. Se llevaron a cabo extracción y purificación de ácidos nucleicos por columnas, inactivación de muestras por calentamiento (*boiling*) y realización de mezclas de muestras de acuerdo con la estrategia de *pool* en matriz. **Resultados:** no se evidenciaron diferencias significativas de Ct tanto en las muestras inactivadas por *boiling* como en los *pools* de muestras con respecto a los resultados obtenidos por el procedimiento habitual. **Discusión:** La adopción de estas estrategias permitió optimizar recursos de extracción y tiempo en el diagnóstico de SARS-CoV-2. La realización de *pools* en formato de matriz se podría aplicar en poblaciones con baja prevalencia de la infección y, por el contrario, la inactivación por *boiling* se podría utilizar en épocas de alta prevalencia.

**Palabras clave:** pandemia, *pools*, rt PCR, *boiling*, optimización.

## Abstract

**Introduction:** In March 2020, the WHO declared the SARS-CoV-2 pandemic, with real-time PCR (rt-PCR) being the gold standard for its diagnosis. Given the excessive demand for reagents and their lack, alternatives were tested to optimize them. **Objective:** To compare methods that allow optimizing resources in the diagnosis of SARS-CoV-2: nucleic acid extraction by the traditional method versus heat inactivation (*boiling*) and individual processing versus performing sample mixtures (*pooling*). **Materials and methods:** Nasopharyngeal swabs in transport medium for viruses or in RNase-free water were used for the comparison. Nucleic acids were extracted and purified by columns. Samples were inactivated by heating (*boiling*). Sample pools were obtained according to the matrix pool strategy. **Results:** No significant differences in Ct were observed in samples inactivated by boiling or in sample pools, respect to the results obtained by the traditional procedure. **Discussion:** The adoption of these strategies allowed optimizing extraction resources and time in the diagnosis of SARS-CoV-2. The realization of pools in matrix format could be applied in populations with low prevalence of infection, whereas inactivation by boiling could be used in times of high prevalence.

**Key words:** pandemic, *pools*, rt PCR, *boiling*, optimization.

## Introducción

En diciembre de 2019, un nuevo virus respiratorio emerge e impacta en todo el mundo. En marzo de 2020, se declara la situación de pandemia por este nuevo coronavirus, SARS-CoV-2, con la necesidad de tomar medidas sanitarias, entre ellas, aumentar masivamente los testeos en población sintomática, así como en asintomática, para evitar lo más eficientemente posible la propagación de este virus.

El método recomendado por la OMS para el diagnóstico de SARS-COV-2, considerado el *gold standard* es la PCR en tiempo real (rt PCR) en hisopado nasofaríngeo. La rt PCR consta de 3 pasos principales: inactivación de la muestra, extracción y purificación de ácidos nucleicos y, por último, la PCR propiamente dicha y detección del producto amplificado. Cada uno de estos pasos requiere diferentes insumos y reactivos, cuya demanda aumentó en forma abrupta en el contexto de pandemia ocasionando la falta generalizada de estos recursos.

Esta situación se convirtió en la principal dificultad para responder a las exigencias del diagnóstico y modificó los tiempos de entrega de resultados. Con el objeto de enfrentar la falta de recursos y disminuir los costos, se estudiaron nuevas alternativas y algoritmos diagnósticos a fin de lograr dar respuestas a las exigencias creadas por la pandemia.

La realización de pruebas en grupo ha sido ampliamente utilizada en serología y banco de sangre; adaptarlas a las PCR para diagnóstico de SARS-CoV-2 permitiría disminuir los tiempos de respuesta junto con un ahorro en el consumo de reactivos.

Objetivo: Comparar la extracción de ácidos nucleicos por el método tradicional versus la inactivación con calor (*boiling*) y el procesamiento individual versus la realización de mezclas de muestras (*pooling*), en el diagnóstico de SARS-CoV-2, de manera tal de poder prescindir de algunos reactivos y optimizar la utilización de otros para afrontar la gran demanda provocada por la pandemia.

## Materiales y métodos

Recolección de muestras: se recolectaron hisopados nasofaríngeos en tubo estéril con 2 mL de medio de transporte para virus universal o en 2 mL de agua libre de RNAsas.

Extracción y purificación de ácidos nucleicos: se realizó a través de método manual con columnas *Quick-RNA Viral Kit* de ZYMO RESEARCH.

Inactivación por calentamiento (*boiling*): se llevó a cabo el calentamiento durante 5 minutos a 95°C en termobloque. Se tomaron 18 muestras (8 detectables y 10 no detectables) recolectadas en agua libre de RNAsas, previamente extraídas y testeadas por el protocolo convencional, se inactivaron por el método de *boiling* y luego, se les realizó la PCR eliminando el paso de extracción.

Mezcla de muestras (*pooling*): se realizaron mezclas de acuerdo con una estrategia de pool en matriz. Cada matriz comprende 25 muestras dispuestas en un esquema de 5 filas por 5 columnas, como se puede observar en la Figura 1. Con cada fila y con cada columna se realizó un *pool* conformado por 5 muestras, tomando alícuotas iguales de cada una hasta llegar a un volumen final de 200 uL. De esta manera, por cada matriz se hicieron 10 extracciones y 10 PCR. Cada muestra se realizó por duplicado porque se encontraba formando parte de 2 *pools* en simultáneo: el de su fila y el de su columna.

Se elaboraron 10 matrices en total utilizando 250 muestras testeadas previamente, 240 negativas y 10 positivas con distintos valores de Ct. Se colocó una muestra positiva en cada matriz, en una posición al azar. La muestra positiva fue detectada mediante la intersección de la fila y columna positivas en la matriz.

Detección por rt PCR: se utilizó el kit AltoStar Sars-CoV-2 1.5 RUO de alta, que detecta específicamente los genes de las proteínas E y S de Sars-CoV-2. Se consideraron detectables aquellas muestras con un *cycle threshold* (Ct) < 38,

**Tabla I.** Comparación entre resultados de Ct por procedimiento habitual de extracción y purificación versus inactivación por calor, sin extracción, en muestras positivas.

Muestra	Ct gen E (extracción)	Ct gen E ( <i>Boiling</i> )	$\Delta$ Ct	Ct gen S (Extracción)	Ct gen S ( <i>Boiling</i> )	$\Delta$ Ct
1	25,88	28,84	2,96	25,31	28,79	3,48
2	26,55	27,04	0,49	25,46	26,90	1,44
3	22,43	23,00	0,57	21,56	23,22	1,66
4	18,77	20,52	1,75	17,12	21,62	4,5
5	26,57	28,77	2,2	26,01	27,99	1,98
6	24,68	24,98	0,3	24,03	23,91	-0,12
7	23,23	20,66	-2,57	22,53	20,32	-2,21
8	22,53	25,33	2,8	22,77	24,99	2,22

► Ct, *cycle threshold*,  $\Delta$ Ct, diferencia entre el Ct *boiling* y el Ct extracción; media de  $\Delta$ Ct gen E=1,70 (desvío estándar=0,66); media de  $\Delta$ Ct gen S=2,20 (desvío estándar=0,53).

**Tabla II.** Valores de Ct obtenidos para el gen E en las muestras individuales y en los *pools* de fila y columna de cada matriz.

Gen E	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
Ct muestra	19,08	21,7	23,47	23,59	24,70	25,74	25,95	26,71	28,18	29,27
Ct <i>pool</i> fila	22,74	25,05	23,36	25,35	24,08	23,33	26,78	27,25	26,8	26,87
Ct <i>pool</i> columna	22,06	25,08	25,3	23,45	24,63	24,92	27,61	27,57	27,45	26,6

► Ct, *cycle threshold*. Cada matriz se expresa como M seguida de un número del 1 al 10.  $\Delta Ct = [Ct \text{ pool fila/columna}] - [Ct \text{ muestra}]$ ; media de  $\Delta Ct$  final = 0,32 (desvío estándar = 2,14); media de  $\Delta Ct$  columna = 0,63 (desvío estándar = 1,87).

para ambos genes. Por otro lado, a aquellas muestras con Ct < 38 para solo uno de los dos genes, se las consideró indeterminadas. Por último, se consideraron no detectables aquellas muestras que no presentaron curva de fluorescencia o que tuvieron un Ct > 38 ya fuera para uno o ambos genes.

Para las rt PCR se utilizó el termociclador z480 de Roche.

## Resultados

### Detección de SARS-CoV-2 en HNF sin extracción

Los resultados obtenidos se pueden observar en la Tabla I. En la Figura 2, se pueden visualizar las diferencias halladas entre los Ct.

Para analizar la diferencia entre las muestras con y sin extracción de ácidos nucleicos, se calculó, en las muestras positivas, la diferencia de Ct para cada uno de los genes detectados, y a ese valor se lo llamó  $\Delta Ct$ . La medida de los  $\Delta Ct$  para cada uno de los genes estudiados fue de 1,70 para el gen E y de 2,20 para el gen S, con desvíos estándar de 0,66 y 0,53, respectivamente.

Se utilizaron 10 muestras negativas, que resultaron no detectables independientemente del paso de extracción/inactivación utilizado. Se obtuvo total concordancia en la interpretación clínica de las muestras estudiadas.

### Detección de SARS-CoV-2 en mezclas de muestras (*pooling*)

Los valores de Ct de las muestras individuales y de los *pools* realizados (de fila y columna de cada matriz) se encuentran en las Tablas II y III. En los gráficos (Figuras 3 y 4), se pueden observar para cada gen estudiado las diferencias de Ct entre las muestras individuales y los *pools*.

También se calculó la media de los  $\Delta Ct$  para cada uno de los genes con respecto a los *pools*. Para el gen E, se obtuvieron medias de  $\Delta Ct$  de 0,32 y 0,63 para los respectivos *pools* de fila y columna, con desvíos estándar de 2,14 y 1,87. Para el gen S, se realizaron los mismos cálculos y se obtuvieron medias de  $\Delta Ct$  de 0,16 y 0,41, con desvíos estándar de 2,38 y 2,04. El procedimiento por el cual se realizaron las matrices y la forma de detección de los positivos se esquematiza abajo (Figura 1).

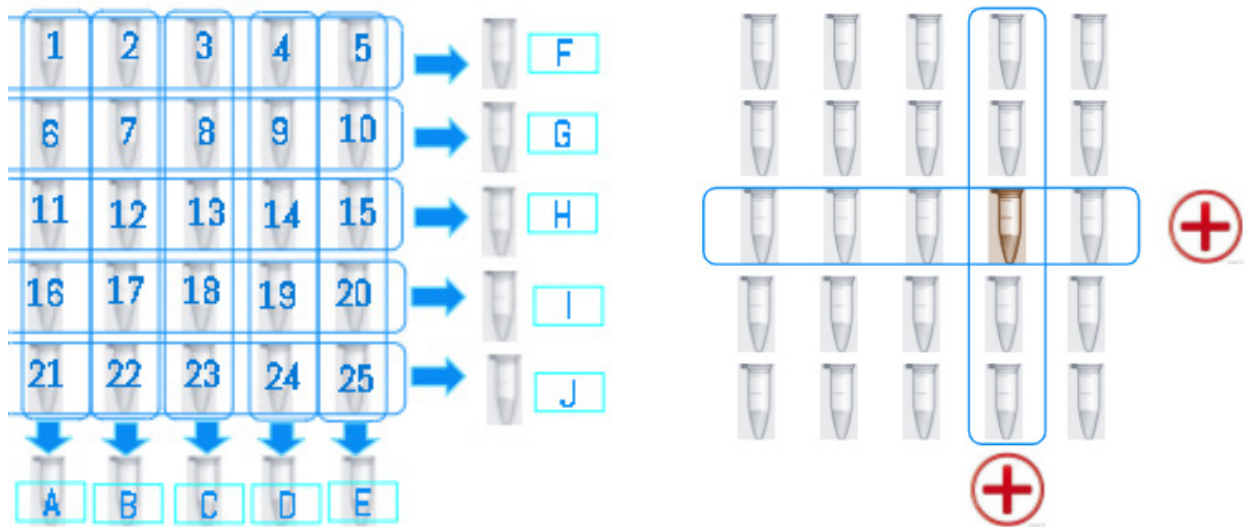
## Discusión

En primer lugar, se probó sustituir la extracción por *boiling* en las muestras obtenidas con agua. Se sabe que esta técnica se utilizó en otros trabajos<sup>1-3</sup> y también se utiliza como parte del protocolo de amplificación isotérmica desarrollado en nuestro país, Neokit. En concordancia con estos trabajos, se obtuvieron buenos resultados. Las diferencias

**Tabla III.** Valores de Ct obtenidos para el gen S en las muestras individuales y en los *pools* de fila y columna de cada matriz.

Gen S	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
Ct <i>pool</i> muestra	18,27	21,07	22,85	23,87	25,21	25,74	25,25	26,22	27,68	28,67
Ct <i>pool</i> fila	21,57	25,5	22,66	24,77	23,52	22,66	26,27	26,63	26,34	26,55
Ct <i>pool</i> columna	21,27	24,72	24,61	22,75	23,98	24,47	26,87	26,94	27,04	26,29

► Cada matriz se expresa como M seguida de un número del 1 al 10.  $\Delta Ct = [Ct \text{ pool fila/columna}] - [Ct \text{ muestra}]$ ; media de  $\Delta Ct$  final = 0,16 (desvío estándar = 2,38); media de  $\Delta Ct$  columna = 0,41 (desvío estándar = 2,04).

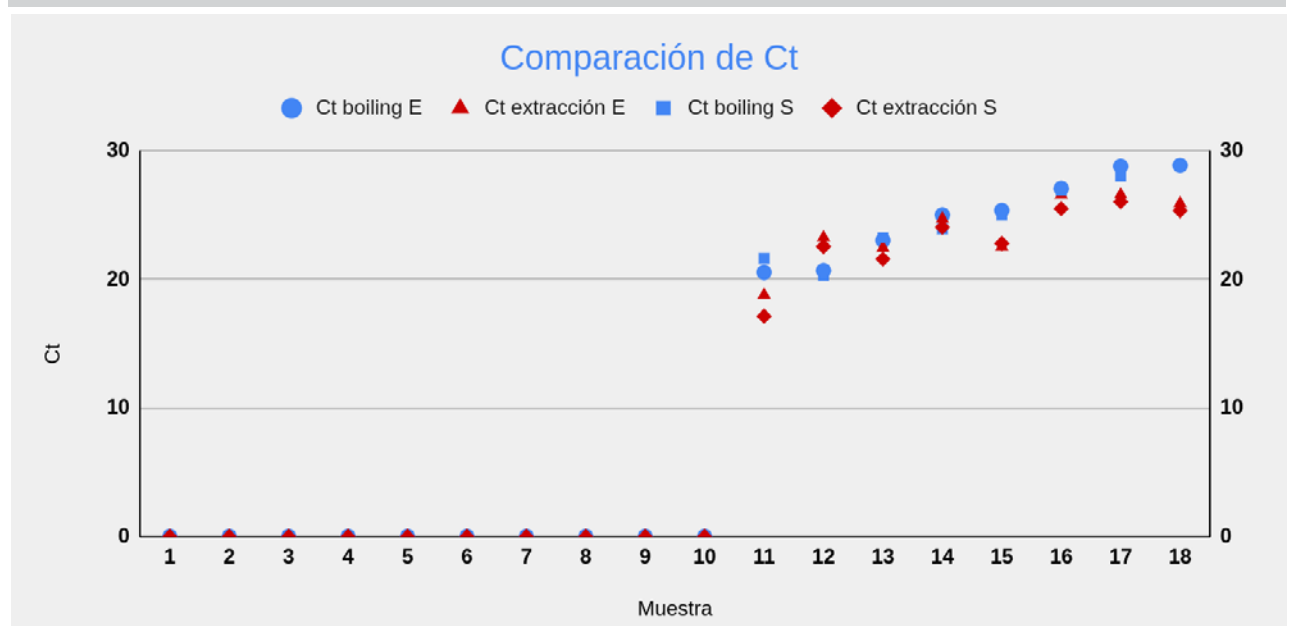
**Figura 1.** Esquema de *pools* en matriz.

► A la izquierda, se observa el esquema de pools en matriz. Las muestras que conforman una matriz están numeradas de la 1 a la 25. Con cada fila y con cada columna, se realizaron los pools, cada uno conformado por 5 muestras. Cada muestra de la matriz se encuentra formando parte de 2 pools en simultáneo, el de su fila y el de su columna. En total se realizaron 10 pools por matriz, denominados de la A a la J. A la derecha, en naranja, se evidencia una muestra positiva con sus respectivos pools de fila y columna positivos. Se identifica la muestra por la intersección de los pools positivos.

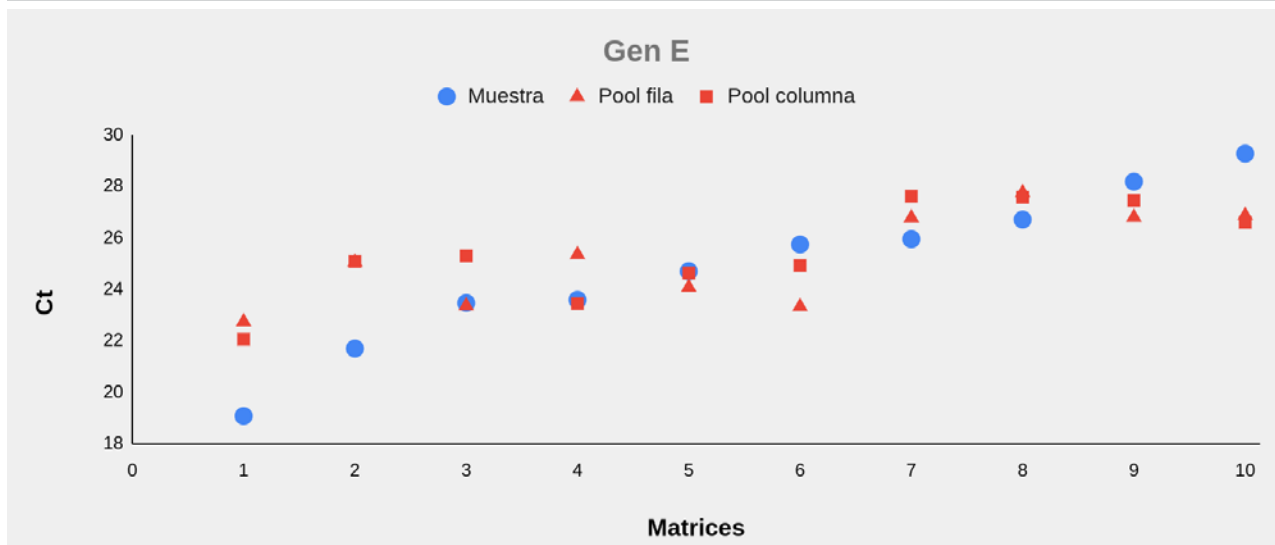
de Ct (de aproximadamente 2) se consideraron no significativas, y en este trabajo, se puede ver una concordancia total de la interpretación clínica de las muestras. Con estos resultados se podría pensar que sería un método útil ante una prevalencia alta de la infección, donde los Ct suelen ser bajos, y una diferencia como la hallada no sería entonces significativa. Con esta sustitución, se podrían ahorrar recursos de extracción y purificación. Como beneficio colateral,

también se optimizan los tiempos de proceso de las muestras asegurando un resultado con mayor rapidez. Queda pendiente evaluar con muestras obtenidas con otros medios.

En cuanto a las pruebas de *pooling* en matriz, se pudo apreciar que realizar mezclas no afecta de forma significativa el Ct obtenido por la rt PCR. Las diferencias de Ct son bajas, y se mantiene la interpretación clínica de las mues-

**Figura 2.** Diferencia de Ct entre las muestras inactivadas con calor, sin extracción, y las muestras que pasaron por el proceso de extracción y purificación habitual.

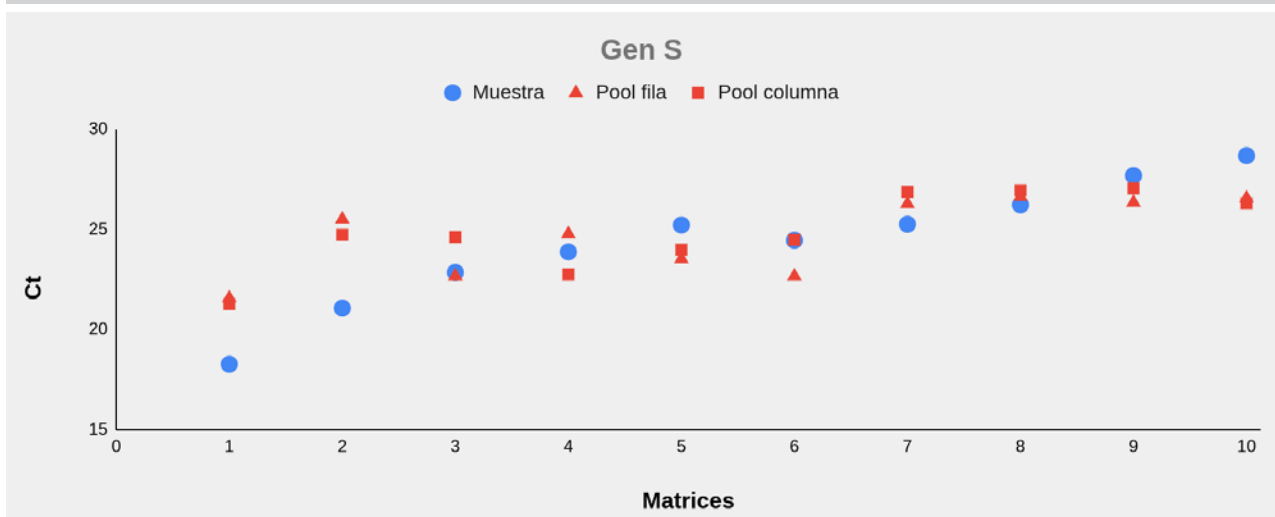
**Figura 3.** Diferencias de Ct entre muestras individuales y grupales para el gen E, para cada una de las matrices realizadas.



tras. En este caso, se probaron matrices de 25 muestras dispuestas en 5 filas por 5 columnas, realizando 10 extracciones y 10 rt PCR en lugar de las 25 que corresponden a la forma tradicional del proceso, por lo que se ahorran 15 kits de extracción y de rt PCR por cada 25 muestras procesadas. Lo destacable de esta forma de agrupar las muestras, en comparación con el método de *pooling* tradicional, es la capacidad de detectar la muestra positiva dentro de la matriz mediante la intersección de filas y columnas positivas, sin necesidad de recurrir a realizar en un segundo paso las pruebas individuales; en esto se conserva la agilidad del proceso. Además, como cada muestra se encuentra formando parte de 2 *pools* en simultáneo, se testean 2 veces en *pools* diferentes por lo que se eleva el valor predictivo negativo de las muestras no detectables.

Como desventaja se puede considerar que esta técnica es más trabajosa que el flujo tradicional de procesamiento de muestras individuales y, por lo tanto, requiere de personal entrenado, pero, dadas las circunstancias de escasez de reactivos, el beneficio aportado se consideró mayor. Además, su más importante limitación sería la prevalencia de la infección. Ben Ami *et al*<sup>4</sup>, quienes aplican esta técnica, desarrollaron un programa estadístico para evaluar la forma más eficiente de realizar *pooling*, y determinaron que es conveniente emplearlo cuando la prevalencia no es mayor que el 10 %, a diferencia del *boiling*, que es preferible en prevalencias más altas. Su limitación se debe a la forma de detección de los positivos, por intersección de filas y columnas positivas dentro de la matriz, ya que, ante una prevalencia mayor de la infección, con varias muestras

**Figura 4.** Diferencias de Ct entre muestras individuales y grupales para el gen S, para cada una de las matrices realizadas.



positivas por matriz, las intersecciones de filas y columnas positivas serían demasiadas, y, en ese caso, se deberían testear algunas muestras de forma individual, agregando pasos al proceso y perdiendo agilidad. Por este motivo, se considera que es un método que podría potencialmente aplicarse a poblaciones puntuales de pacientes donde la prevalencia se mantiene baja como en la población asintomática. Lohse *et al.* y Shental *et al.*<sup>5,6</sup> también demuestran que en estas poblaciones la realización de *pools* no altera el resultado de las muestras individuales. Dentro de este grupo, se podrían considerar como casos a individuos con contacto estrecho con pacientes positivos confirmados, viajeros, y como controles, a personal de salud asintomático dentro del lugar de trabajo, pacientes prequirúrgicos y muestras recibidas en etapas de pospandemia, con prevalencia de la infección baja.

La evaluación de los métodos estudiados presentó resultados que se consideraron aceptables y abrieron la posibilidad entonces de ahorrar en recursos tanto de extracción como de rt PCR, lo cual responde a las necesidades que surgieron durante la época de pandemia.

### Agradecimientos

Agradecemos al personal del laboratorio de Virología por su colaboración en la realización de este trabajo.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no poseer conflictos de interés público.

### Referencias bibliográficas

1. Merindol N, Pépin G, Marchand C, Rheault M, Peterson C, Poirier A et al. SARS-CoV-2 detection by direct rRT-PCR without RNA extraction. *J Clin Virol* 2020;128:104423.
2. Morecchiato F, Coppi M, Baccani I, Maggini N, Ciccone N, Antonelli A, et al Evaluation of extraction-free RT-PCR methods for faster and cheaper detection of SARS-CoV-2 using two commercial systems. *El sevier* 2021;112:264-268.
3. Perez V, Blohem Pessoa W, Andrade Galvão B, Soares Sousa E, Dejani N, Campana E, et al Evaluation of alternative RNA extraction methods for detection of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal samples using the recommended CDC primer-probe set. *Elsevier* 2021;1(3):100032.
4. Ben Ami R, Klochendler A, Seidel M, Sido T, Gurel-Gurevich O, Yassour M et al Large scale implementation of pooled RNA extraction and RT-PCR for SARS-CoV-2. *Clin Microbiol Infect* 2020;26(9):1248-1253.
5. Lohse S, Pfulhl T, Berkó-Göttel B, Geibler T, Gartner B, Smola S et al. Pooling of samples for testing for SARS-CoV-2 in asymptomatic people. *Lancet Infect Dis* 2020;20(11):1231-1232.
6. Shental N, Levvy S, Wuvshet V, Skorniakov S, Shalem B, Ottolengui A et al. Efficient high-throughput SARS-CoV-2 testing to detect asymptomatic carriers. *Sci Adv* 2020;6(37):eabc5961.