

# Optimización de la detección de SARS-CoV-2 mediante el análisis de muestras agrupadas

## Optimizing RT-PCR detection of SARS-CoV-2 for developing countries using pool testing

Mauricio J. Farfan<sup>1,2</sup>, Juan P. Torres<sup>2</sup>, Miguel O'Ryan<sup>3</sup>, Mauricio Olivares<sup>2</sup>, Pablo Gallardo<sup>2</sup>, Jorge Lastra<sup>1</sup> y Carolina Salas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna. Santiago, Chile.

<sup>2</sup>Departamento de Pediatría y Cirugía Infantil Oriente, Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago, Chile.

<sup>3</sup>Programa de Microbiología y Micología, Instituto de Ciencias Biomédicas, e Instituto Milenio de Inmunidad e Inmunoterapia, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago, Chile.

Financiamiento: Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna.

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

Recibido: 26 de mayo de 2020 / Aceptado: 28 de mayo de 2020

### Resumen

La escasez mundial de reactivos para la extracción de ácidos nucleicos y la detección molecular de SARS-CoV-2 requiere de nuevas estrategias de mayor rendimiento para el diagnóstico de casos sospechosos de COVID-19, especialmente en países que necesitan aumentar su capacidad diagnóstica. La detección de ácidos nucleicos en muestras agrupadas o *pool testing* se ha utilizado ampliamente como una estrategia costo-efectiva para el VIH, hepatitis B, hepatitis C e influenza. Adicionalmente, los protocolos que no requieren extracción de ARN aparecen como una opción para la detección de SARS-CoV-2. En este trabajo, presentamos los resultados de una estrategia de detección de SARS-CoV-2 en muestras agrupadas, que incluye diferentes métodos de extracción de ARN que puede ser una estrategia atractiva para los países en desarrollo. La agrupación de 5 muestras mostró variaciones  $C_T$  en el rango de 1,0 a 4,5 unidades, con una baja probabilidad de obtener falsos negativos, a diferencias de los resultados agregando muestras agrupadas directamente en la reacción de amplificación de SARS-CoV-2. En conclusión, la agrupación de muestras nasofaríngeas, demostró ser un método confiable y, por lo tanto, una alternativa para aumentar el rendimiento en el diagnóstico de COVID-19 para países en desarrollo.

**Palabras clave:** SARS-CoV-2; COVID-19; diagnóstico; muestras agrupadas; *pool testing*.

### Abstract

The global shortage of reagents and kits for nucleic acid extraction and molecular detection of SARS-CoV-2 requires new cost-effective strategies for the diagnosis of suspected COVID-19 cases, especially in countries that need to increase detection capacity. Pooled nucleic acid testing has been extensively used as a cost-effective strategy for HIV, HepB, HepC and influenza. Also, protocols dispensing of RNA extraction appears as an attractive option for detection of SARS-CoV-2. In this study, we found that pooling of 5 samples showed that  $C_T$  variations were in the range of 1.0–4.5 units, with less likelihood of a false negative result. Results of the sample without nucleic acid extraction, was unsatisfactory, with a significant increase in  $C_T$  values, and thus for risk of a false negative result. In conclusion, pooling nasopharyngeal samples with both automated and manual extraction proved reliable, and thus a potential efficient alternative for the diagnosis of suspected COVID-19 in developing countries.

**Keywords:** coronavirus; SARS-CoV-2; COVID-19; diagnosis; pool testing.

### Correspondencia a:

M. J. Farfán Urzúa  
mfarfan@med.uchile.cl

Juan Pablo Torres Torreti  
jptorres@uchile.cl

## Introducción

Los pilares para el control de la pandemia de COVID-19 son la detección temprana, la cuarentena de casos y contactos, junto con el distanciamiento social, especialmente cuando la detección es subóptima<sup>1,2</sup>. Actualmente, esta detección se basa en la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (sigla en inglés: RT-PCR) de muestras nasofaríngeas, una técnica que ha demostrado ser altamente específica y sensible durante la fase sintomática temprana<sup>3</sup>.

El número de sujetos analizados para el virus del SARS-CoV-2 varía significativamente según los países, siendo el más bajo en los países en desarrollo. Hay varias razones para esto, incluida la falta de una estrategia de detección adaptada a las condiciones del país, la insuficiente capacidad para realizar RT-PCR y/o la falta de reactivos para realizar una gran cantidad de pruebas, ya sea por un suministro insuficiente de reactivos para la extracción de ácidos nucleicos o para la detección molecular de SARS-CoV-2<sup>4</sup>.

En Chile, así como en otros países de ingresos medios y altos, se ha implementado una estrategia local con el objetivo de detectar la mayor cantidad de casos posible. Los objetivos declarados por el gobierno buscan aumentar la capacidad de detección de RT-PCR, para lo cual, se han adoptado varias estrategias. La estrategia principal ha sido organizar una red de laboratorios en todo el país, reclutando hospitales, instituciones públicas y privadas, así como laboratorios universitarios de investigación con capacidad de efectuar RT-PCR. Estos laboratorios han trabajado para desarrollar protocolos estandarizados bajo la supervisión del gobierno. La principal limitante para la puesta en marcha de esta estrategia, ha sido la disponibilidad de reactivos. Es importante destacar que la necesidad mundial de diagnóstico, permite prever una escasez de reactivos a mediano y corto plazo, la que afectará principalmente a los países en desarrollo.

En este escenario, varios grupos de investigación están buscando estrategias alternativas, incluidas el prescindir de la extracción de ARN y analizar muestras agrupadas. La detección de ácidos nucleicos en muestras agrupadas se ha utilizado ampliamente como una estrategia costo-efectiva para el VIH, la hepatitis B, la hepatitis C e influenza<sup>5,6</sup>. Datos publicados sugieren que la agrupación de cinco muestras, es un enfoque adecuado en lugares con una tasa de prevalencia entre 3 y 15%<sup>7</sup>. Presentamos aquí los resultados de una estrategia para la detección de SARS-CoV-2 en muestras agrupadas, que incluye diferentes métodos de extracción de ARN que puede ser una estrategia atractiva para los países en desarrollo.

## Métodos

### *Agrupación de muestras*

Se utilizaron muestras nasofaríngeas en medio de transporte universal (UTM; Copan Diagnostics Inc) de pacientes con resultado positivo y negativo mediante RT-PCR para SARS-CoV-2. Para la agrupación, se usaron alícuotas de 200 µl de 5 muestras nasofaríngeas en medio UTM para crear agrupaciones con un volumen final de 1 ml.

### *Extracción de ácidos nucleicos*

La extracción de ácidos nucleicos de 400 µl de la agrupación de muestras se realizó usando: a) El *kit MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I* (extracción automatizada) en el instrumento MagNA Pure LC o b) El *kit High Pure Viral Nucleic Acid Nucleic Acid Kit* (extracción manual), según a las instrucciones del fabricante (Roche). El volumen de elución se ajustó a 50 µl en ambos casos. También se realizó RT-qPCR sin extracción, agregando 5 µl de la mezcla de muestras agrupadas, directamente a la reacción de RT-PCR.

### *Detección de SARS-CoV-2*

Para la detección de SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR se utilizó el *kit TaqMan™ 2019-nCoV Assay Kit v1* para el gen *orf1ab*, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ThermoFisher) en un equipo LightCycler® 480 Instrument II (Roche), utilizando 5 µl de extracción de ácidos nucleicos o adicionando 5 µl de las muestras agrupadas sin extraer directo en la mezcla de amplificación. Se consideró positivo un umbral de ciclo ( $C_T$ ) < 37.

### *Aprobación del Comité de Ética*

El laboratorio de Biología Molecular del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna (HLCM) ha sido identificado por el Ministerio de Salud como un laboratorio de diagnóstico de COVID-19. Este trabajo se considera así como una intervención de salud pública para mejorar el diagnóstico y no se solicitó el consentimiento individual ni la aprobación ética. Todas las muestras nasofaríngeas de pacientes positivos y negativos de COVID-19 se anonimizaron.

## Resultados

El laboratorio de Biología Molecular del HLCM ha analizado hasta la fecha 13.703 muestras, de las cuales 5.251 han sido positivas. Para el propósito de este estudio, se seleccionaron 23 muestras positivas con  $C_T$  que van desde 16,6 a 36,1, y 40 muestras negativas.

Primero, se prepararon 6 grupos de 5 muestras c/u sometidas a extracción automatizada (Tabla 1). Los

**Tabla 1. Resultados de RPC\* del SARS-CoV-2 obtenidos de los primeros seis grupos o pools de muestras nasofaríngeas. La extracción de ácidos nucleicos se realizó mediante una extracción automatizada<sup>a</sup>**

Muestra	Valor de C <sub>T</sub> SARS CoV-2	Pool 1	Pool 2	Pool 3	Pool 4	Pool 5	Pool 6
1	Neg	X	X				X
2	Neg	X	X				X
3	Neg	X	X				X
4	Neg	X	X			X	
5	Neg	X		X	X		
6	Neg			X	X	X	
7	Neg			X	X	X	X
8	Neg			X	X	X	
9	Neg			X			
10	21,1		X				
11	23,8						
12	26,9					X	
13	31,6						X
<b>SARS-CoV-2 RT-PCR</b>		<b>Neg</b>	<b>Pos</b>	<b>Neg</b>	<b>Pos</b>	<b>Pos</b>	<b>Pos</b>
<b>Valor C<sub>T</sub></b>		-	24,3	-	27,2	30,1	34,0
<b>ΔC<sub>T</sub></b>		-	3,2	-	3,4	3,2	2,4

\*Reacción de polimerasa en cadena. <sup>a</sup>La extracción automatizada fue hecha mediante el kit *MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I* en el equipo *MagNA Pure LC* instrument. <sup>b</sup>Cambios en el valor C<sub>T</sub> comparado con el valor C<sub>T</sub> de la muestra presente en el grupo. Neg, negativo; Pos, positivo.

grupos 2, 4, 5 y 6 incluyeron 4 muestras negativas y 1 positivas con valores de C<sub>T</sub> de 21,1, 23,8, 26,9 y 31,6, respectivamente. Los grupos 1 y 3 contenían sólo muestras negativas. La amplificación del marcador del gen *orf1ab* se obtuvo en todos los grupos con una muestra positiva. Los valores de C<sub>T</sub> de los grupos 2, 4, 5 y 6 fueron 24,3, 27,2, 30,1 y 34, respectivamente, observando un aumento de 2,4 a 3,4 unidades de C<sub>T</sub> con respecto al valor de C<sub>T</sub> de la muestra original.

Para la comparación entre extracción automatizada, extracción manual y muestras sin extracción, se prepararon 5 nuevos grupos (Tabla 2). Los grupos 8 a 11 incluyeron 4 muestras negativas y 1 muestra positiva con valores de C<sub>T</sub> de 23,5, 16,8, 26,8 y 35 respectivamente. El grupo 7 incluyó 5 muestras negativas. La amplificación de SARS-CoV-2 se observó en los grupos 8, 9 y 10 mediante extracción automatizada, extracción manual o agregando la muestra del grupo directamente a la mezcla de PCR. Se observaron valores de C<sub>T</sub> similares utilizando extracción

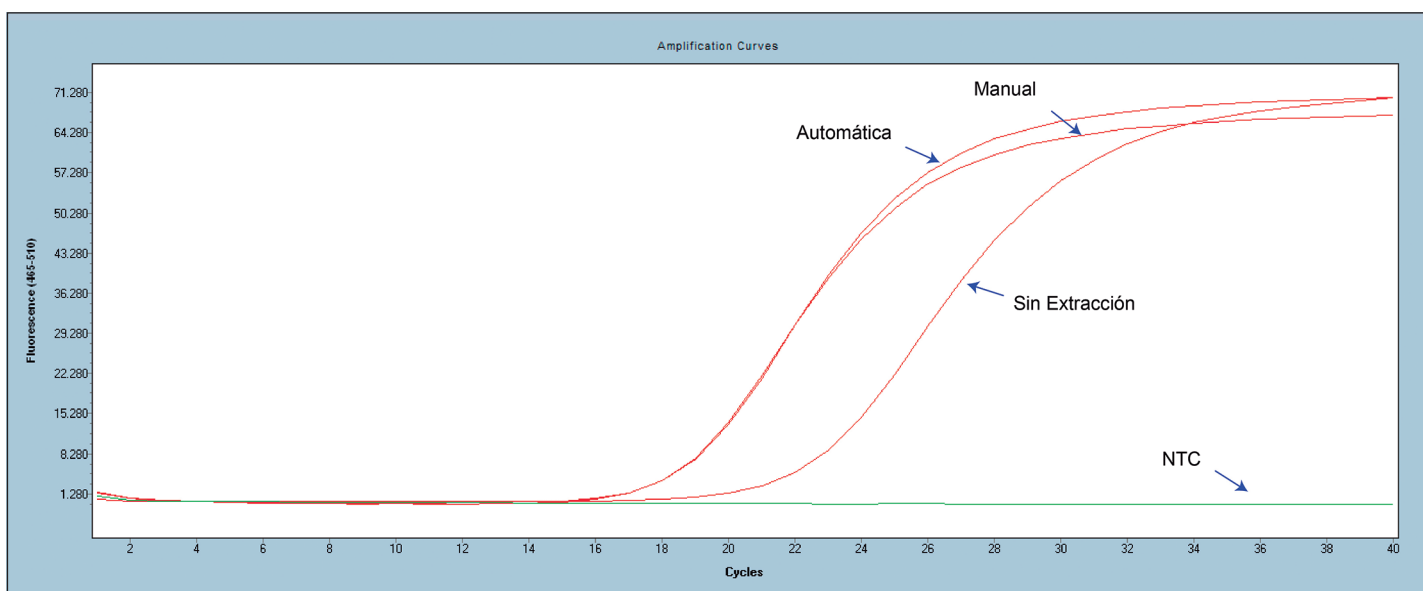
manual o automática, pero se observó un aumento de ~ 5 unidades al agregar 5 µl de muestras agrupadas no extraídas a la reacción de RT-PCR (Figura 1). No hubo señal de amplificación de SARS-CoV-2 en las agrupaciones 7 (solo con muestras negativas) y 11 (4 muestras negativas y una positiva con un C<sub>T</sub> 35) para ningún procedimiento de extracción.

Para probar la eficiencia de nuestros datos anteriores, se prepararon 20 nuevos grupos. Las agrupaciones 12 a 26 incluyeron 4 muestras negativas y 1 muestra positiva con C<sub>T</sub> que osciló entre 16,6 y 36,1; los grupos 27 a 31 incluyeron 5 muestras negativas. La extracción de ácidos nucleicos de los grupos se realizó mediante extracción manual. La amplificación de SARS-CoV-2 se observó en los grupos 12 a 25, observando un aumento de los valores de C<sub>T</sub> de 1 a 4,5. No se detectó señal de amplificación en el grupo 26, que incluye una muestra positiva con un C<sub>T</sub> = 36,1. Los grupos 27 a 31 fueron negativos para RT-PCR (Figura 2).

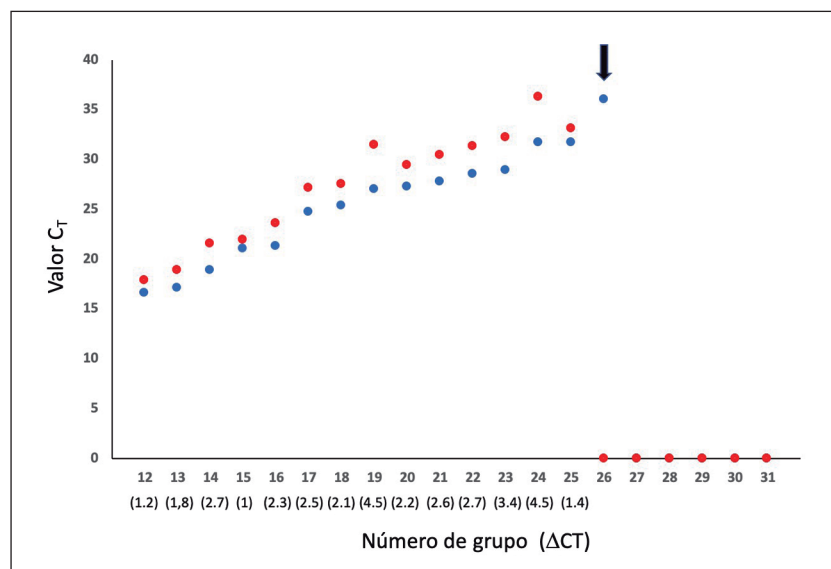
**Tabla 2. Resultados de RPC\* del SARS-CoV-2 obtenidos de 5 grupos o pools de muestras nasofaríngeas. La extracción de ácidos nucleicos se realizó utilizando una extracción automática<sup>a</sup> (A) y extracción manual<sup>b</sup> (M). También se evaluó la adición de la muestra de grupo (P) directamente a la reacción de PCR\***

Muestra	Valor de C <sub>T</sub> SARS CoV-2	Pool 7A	Pool SA	Pool 9A	Pool 10A	Pool 11A	Pool 7M	Pool 8M	Pool 9M	Pool 10M	Pool 11M	Pool 7P	Pool 8P	Pool 9P	Pool 10P	Pool 11P
14	Neg				X		X		X		X			X		X
15	Neg				X		X		X		X			X		X
16	Neg				X		X		X		X			X		X
17	Neg				X		X		X		X			X		X
18	Neg				X											X
19	23,5						X									
20	16,8								X							
21	26,8											X				
22	35													X		
<b>SARS-CoV-2 RT-PCR</b>		<b>Neg</b>	<b>Pos</b>	<b>Pos</b>	<b>Pos</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>Pos</b>	<b>Pos</b>	<b>Pos</b>	<b>Neg</b>	<b>Neg</b>	<b>Pos</b>	<b>Pos</b>	<b>Pos</b>	<b>Neg</b>
<b>Valor C<sub>T</sub></b>		-	25,6	18,3	29,0	-	-	25,2	18,5	29,0	-	-	28,1	22,3	32,1	-
<b>ΔC<sub>T</sub><sup>d</sup></b>		-	2,1	1,5	2,2	-	-	1,7	1,7	2,2	-	-	4,6	5,5	5,3	-

\*Reacción de polimerasa en cadena. <sup>a</sup>La extracción automática fue realizada usando el kit *MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I* en el equipo *MagNA Pure LC instrument* (Roche). <sup>b</sup>La extracción manual fue realizada usando el kit *High Pure Viral Nucleic Acid Kit* (Roche). <sup>c</sup>Cinco microlitros de muestras agrupadas (sin extracción) fueron agregadas directamente a la reacción de RT-PCR. <sup>d</sup>Cambio del valor C<sub>T</sub> comparado con el valor C<sub>T</sub> de la muestra positiva presente en el grupo. Neg, negativo; Pos, positivo.



**Figura 1.** Curvas de amplificación para SARS-CoV-2 obtenidas para el grupo 9. El RT-PCR para SARS-CoV-2 se realizó usando como templado ácidos nucleicos purificados a partir extracción automatizada, manual, o las muestras agrupadas (sin extracción). NTC, control sin templado.



**Figura 2.** Valores  $C_T$  de los resultados de amplificación de SARS-CoV-2 para los grupos 12-31. El RT-PCR para SARS-CoV-2 se realizó usando como templado ácidos nucleicos purificados a partir de extracción manual y se graficaron los valores de  $C_T$  obtenidos en las muestras positivas al efectuar la detección individual (puntos azules) y dentro de su grupo respectivo (puntos rojos). Adicionalmente, se incluye entre paréntesis el valor de cambio de  $C_T$  de la muestra dentro del grupo respecto a su valor en detección individual. Se asignó un valor de  $C_T$  de 0 a las muestras sin amplificación. El grupo 26 está resaltado con una flecha negra.

## Discusión

Nuestro estudio demuestra que la combinación de cinco muestras nasofaríngeas de SARS-CoV-2 negativas y/o cuatro negativas y una positiva en la misma prueba de RT-PCR puede identificar efectivamente todas las muestras negativas y detectar la muestra positiva. Además, se observaron resultados de detección similares al comparar la extracción automática y manual de las muestras. Los resultados de las muestras sin extracción de ácidos nucleicos no fueron satisfactorios, con un aumento significativo en los valores de  $C_T$  y, por lo tanto, un alto riesgo de obtener un resultado falso negativo. Para las muestras extraídas, las variaciones de  $C_T$  estuvieron en el rango de 1,0-4,5 unidades, con menos probabilidad de un resultado falso negativo.

No observamos resultados falsos negativos significativos. En todos los casos en los que hubo una muestra positiva, la detección en la agrupación de muestras fue positiva, tanto en muestras extraídas automáticas como manuales, excepto en dos casos, donde las muestras positivas presentaban valores  $C_T$  de 35 y 36,1, cerca del límite de detección de la RT-PCR ( $C_T < 37$ ).

La agrupación de muestras se ha descrito previamente para la detección de SARS-CoV-2 en países desarrollados. Hogan y cols.<sup>8</sup>, estudiaron 292 grupos de muestras en 2.740 muestras nasofaríngeas y 148 muestras de lavado broncoalveolar, observando una tasa de positividad de 0,07% en el área de la Bahía de San Francisco (California, E.U.A). Este estudio es complementario al nuestro, ya que se usaron muestras negativas para otros virus, sin incluir muestras con valores de  $C_T$  conocidos. Otro

estudio en Israel, encontró que se podía detectar una sola muestra positiva, incluso en grupos de extracciones de ácidos nucleicos de hasta 32 muestras, con una tasa de falsos negativos estimada de 10%<sup>9</sup>. Utilizando un enfoque similar al descrito en este estudio, Abdalhamid y cols.<sup>7</sup>, encontraron que el tamaño del grupo de 5 muestras proporciona la mayor reducción en el número esperado de pruebas.

La detección en muestras agrupadas pueden ser una buena alternativa para aumentar el rendimiento de las pruebas, utilizando menos reactivos y ofreciendo resultados más rápidos. Esto es relevante para los países sub-desarrollados o en desarrollo, donde los recursos pueden ser escasos. La posibilidad de aumentar el número de muestras para la detección de SARS-CoV-2 podría ayudar significativamente a los países con recursos reducidos a obtener mejores resultados para la pandemia de COVID-19. Para el diagnóstico post-pandemia de grandes poblaciones, la agrupación de muestras también representará una alternativa importante de considerar.

Nuestro estudio tiene la limitación de haber realizado solo 31 agrupaciones en 63 muestras nasofaríngeas (40 negativas y 23 positivas); sin embargo, los resultados son consistentes y proporcionan información relevante para la implementación de estrategias que permitieran optimizar la detección de SARS-CoV-2. Incluimos cinco muestras en cada grupo, lo que parece adecuado en una situación con una tasa de positividad general del 10%.

En áreas con tasas de positividad más bajas, especialmente en futuras pruebas post-pandemia, puede considerarse aumentar el número de muestras para hacer las agrupaciones. Finalmente, no probamos la inclusión

de más de una muestra positiva en cada grupo; sin embargo, no esperaríamos que esto modifique los resultados observados.

En conclusión, la agrupación de muestras nasofaríngeas, junto con la extracción de ácido nucleicos a través de métodos automáticos o manuales es estrategia alternativa

confiable y eficiente para la detección de SARS-CoV-2 en regiones menos desarrolladas que cuentan con una capacidad de detección reducida.

*Agradecimientos.* Este manuscrito ha sido publicado como pre-impresión en medRxiv (Farfan, et al.).

## Referencias bibliográficas

- 1.- Jee. Y. WHO International Health Regulation Emergency Committee for the COVID-19 outbreak. *Epidemiol Health* 2020; 42: e2020013. doi: 10.4178/epih.e2020013.
- 2.- Lau H, Khosrawipour V, Kocbach P, Mikolajczyk A, Schubert J, Bania J, Khosrawipour T. The positive impact of lockdown in Wuhan on containing the COVID-9 outbreak in China. *J Travel Med* 2020; pii: taaa037. doi: 10.1093/jtm/taaa037.
- 3.- Tang Y W, Schmitz J E, Persing D H, Stratton C W. Laboratory diagnosis of COVID-19: Current issues and challenge *J Clin Microbiol* 2020; doi: 10.1128/JCM.00512-20.
- 4.- El Lau L S, Samari G, Moresky R T, Casey S E, Kachur S P, Roberts L F, et al. Covid-19 in humanitarian settings and lessons learned from past epidemics. *Nat Med* 2020; doi: 10.1038/s41591-020-0851-2.
- 5.- El Ekiaby M, Lelie N, Allain J P. Nucleic acid testing (NAT) in high prevalence-low resource setting. *Biologicals* 2010; 38 (1): 59-64. doi: 10.1016/j.biologicals.2009.10.015. Epub 2010 Jan 15.
- 6.- Van T T, Miller J, Warshauer D M, Reisdorf E, Jernigan D, Humes R, et al. Pooling nasopharyngeal/throat swab specimens to increase testing capacity for influenza viruses by PCR. *J Clin Microbiol* 2012; 50 (3): 891-6. doi: 10.1128/JCM.05631-11. Epub 2012 Jan 11.
- 7.- Abdalhamid B, Bilder C R, McCutchen E L, Hinrichs S H, Koepsell S A, Iwen P C. Assessment of specimen pooling to conserve SARS CoV-2 testing resources. *Am J Clin Pathol* 2020; 153, 6 (June): 715-8.
- 8.- Hogan C A, Sahoo M K, Pinsky B A. Sample pooling as a strategy to detect community transmission of SARS-CoV-2 *JAMA*. 2020; pii: 2764364. doi: 10.1001/jama.2020.5445.
- 9.- Yelin I, Aharoni N, Shaer-Tamar E, Argoetti A, Messer E, Berenbaum D, et al. Evaluation of COVID-19 RT-qPCR test in multi-sample pools. *BMJ Yale*. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.26.20039438>. *Clin Infect Dis*. doi: 10.1093/cid/ciaa531.
- 10.- Lohse S, Pfuhl T, Berkó-Göttel B, Rissland J, Geißler T, Gärtner , et al. Pooling of samples for testing for SARS-CoV-2 in asymptomatic people. *Lancet Infect Dis* 2020. ISSN 1473-3099. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30362-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30362-5).