Instituto Nacional de Salud

sura

Detección de SARS-CoV-2 por rRT- PCR en grupos de muestras “Pool Screening” en regiones con baja frecuencia de positividad

Detección de SARS-CoV-2 por rRT - PCR en grupos de muestras “Pool Screening” en regiones con baja frecuencia de positividad

ELABORADO POR:

- **Sofía Duque Beltrán.** Bsc. MSc en Parasitología Médica. Grupo de Parasitología. Dirección de Investigación en Salud Pública.
- **Carlos Franco Muñoz.** Bsc, MSc en Bioquímica. Grupo de Parasitología. Dirección de Investigación en Salud Pública.
- **Marcela Mercado Reyes.** Bac, MS en Epidemiología Clínica. Directora de Investigación en Salud Pública.
- **Leonel Andrés González Niño.** BSc, MSc en Biología Molecular y Biotecnología, Especialista en Bioinformática Clínica. Coordinador Nacional Unidad de Genética, Líder Técnico Nacional Covid-19. Ayudas Diagnósticas SURA
- **Magda Elizabeth Graciano Saldarriaga.** Microbióloga, MSc en Ciencias Biomédicas. Laboratorio Biología molecular. Ayudas Diagnosticas SURA
- **Sebastián Gutierrez Hincapié.** Microbiólogo, MSc en Microbiología y Bioanálisis. Laboratorio Biología molecular. Ayudas Diagnosticas SURA.
- **Lizet Jazmín Perez Zapata.** Microbiólogo, MSc en Epidemiologia. Laboratorio Biología molecular. Ayudas Diagnosticas SURA.
- **Richard Salazar Enríquez.** Microbiólogo, MSc en Ciencias Básicas Biomédicas. Laboratorio Biología molecular. Ayudas Diagnosticas SURA.
- **Johana Cañaveral Castañeda.** Ing Biológica, MSc en Ingeniería. Dirección de Gestión de Tendencias. Ayudas Diagnósticas SURA.

ADVERTENCIA

Este protocolo solo se recomienda en grupos de estudio, poblaciones o municipios donde **el porcentaje de positividad de SARS-CoV-2 sea igual o menor al 5%,** por lo tanto debe complementarse con la evaluación del contexto epidemiológico de los pacientes que se incluyan.

Es un método **diagnóstico de tamización en grupos particulares** como personas asintomáticas, con sintomatología leve, rastreo de contactos en conglomerados numerosos, búsqueda activa de casos y centinelas.

INTRODUCCIÓN

Actualmente la metodología Estándar de oro (Gold Estándar) para la detección de ARN viral de SARS-CoV-2 es la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (rRT-PCR) (WHO, 2020) en muestras respiratorias de todo paciente sintomático o contacto asintomático de SARS-CoV-2. Esta metodología de detección, tiene como regiones blanco fragmentos del gen E de la envoltura de los coronavirus del grupo sarbecovirus y del gen de la polimerasa de RNA dependiente de RNA (RdRp) del SARS-CoV-2 (Unidad de Secuenciación y Análisis Genómica, 2020).

Ante la necesidad de realizar diagnóstico temprano y de detectar asintomáticos positivos al virus, los laboratorios han requerido procesar grandes volúmenes de muestras de origen respiratorio, desbordando su capacidad de respuesta y agotando la disponibilidad de reactivos en insumos.

Una de las herramientas utilizadas para la detección de material genético a partir de grandes volúmenes de muestras es la tamización por grupos “Pool Screening” que en este caso del SARS-CoV-2 podría utilizarse para detectarlo en asintomáticos si fuese el caso que

éste estuviese infectado (Lohse et.al., 2020). El "Pool screening" permite detectar un infectado (positivo) entre un número grande de no infectados (negativos), cuando se espera *baja positividad* dentro del grupo poblacional. Esta herramienta hace obligatorio que, ante un grupo o pool de muestras con resultado positivo, se deba realizar el proceso completo de manera individual para poder identificar los positivos (Lohse et. al., 2020).

Es importante anotar que en esta modalidad de pooles, se deben incluir controles positivos y negativos de extracción y si se dispone de controles internos (CI) (algunos kits de extracción lo traen, estos deben ser adicionados a la solución reguladora de lisis (buffer de lisis), antes de agregar la muestra a extraer. Si alguno de los controles de extracción (positivo, negativo, CI) no resultan como se espera, la prueba y sus resultados no serán válidos. Por otra parte, esta falla indicaría que existen problemas con el método de extracción, debiendo revisarse acuciosamente cada paso y reactivo utilizado. Adicionalmente, esta herramienta, si bien maneja varios controles para ser válida, no es posible conocer la calidad de la muestra de manera individual evaluado como presencia de RNasaP humana, pues una muestras con baja celularidad, se vería solapada con aquellas con bastante celularidad.

Este proceso puede ser aplicado para cualquier agente patógeno donde la utilización de la Cadena de Reacción de la Polimerasa (PCR) se encuentre disponible (Katholi et. al., 1995). Este esquema de tamización por grupos reduce el número de pruebas a realizar y es aplicable a gran escala para detectar infección por SARS-CoV-2 en el ámbito de la actual pandemia COVID19 (Eberhardt et. al., 2020).

OBJETIVO

Objetivo General

Detectar SARS-CoV-2 en muestras respiratorias mediante la preparación de grupos de muestras *"Pool Screening"* de ARN en poblaciones con prevalencia positiva menor o igual al 5% como método de tamización poblacional.

Objetivo específico

Tamizar grupos de muestras (Pool Screening) en tamaños de **cinco** muestras por grupo de pacientes sintomáticos, contactos asintomáticos de SARS-CoV-2 en poblaciones con prevalencia positiva menor o igual al 5%.

ALCANCE

El diagnóstico de SARS-CoV-2 mediante *pool screening* aplica para poblaciones homogéneas con una prevalencia de COVID-19 menor o igual al 5% como un método diagnóstico de tamización en personas asintomáticas, con sintomatología leve y/o aquellas personas en contacto con pacientes positivos. Esta estrategia busca reducir el número de pruebas requeridas para el diagnóstico de SARS-CoV-2 y maximizar la eficiencia de las pruebas al identificar las personas positivas dentro de un grupo *(pool)* de muestras de distintos pacientes, se propone el siguiente protocolo para búsqueda activa de casos y proyectos centinelas.

METODOLOGÍA

Toma de muestras (Rodríguez LD et. al., 2020)

- Seguir los lineamientos establecidos para la vigilancia por Laboratorio de virus respiratorios
- Tener en cuenta que las muestras deben ser tomadas a la(s) persona(s) por personal capacitado
- Acatar todas las instrucciones de bioseguridad, incluido el uso de los equipos de protección personal adecuado para virus respiratorios

◁ Hisopado Nasofaringeo (Rodríguez LD et. al., 2020)

- El hisopo debe ser de punta sintética (poliéster o Dacron®) y mango plástico.
- Insertar el escobillón en la ventana nasal paralela al paladar. Deslizar por la mucosa del piso de la fosa nasal hasta tocar la pared posterior de la faringe, asegurándose que se encuentra en el área de la nasofaringe.
- Frotar la zona de la nasofaringe haciendo girar el escobillón para obtener una buena cantidad de células epiteliales.
- Retirar lentamente el escobillón con movimiento giratorio para absorber las secreciones.
- Repetir el procedimiento en la otra ventana nasal utilizando otro hisopo.
- Colocar los escobillones en el vial que contiene el medio de transporte viral, corte el resto del escobillón y tape el vial.
- Identificar el recipiente de la muestra con la fecha de recolección, el número consecutivo y el nombre de la persona.

◁ Hisopado Orofaringeo (Rodríguez LC et. al., 2007)

- El hisopo debe ser de punta sintética (poliéster o Dacron®) y mango plástico.
- Inclinar a la persona en un ángulo de 45 grados
- Solicitar a la persona abrir la boca, sacar la lengua y repetir reiterativamente la letra “A” para mantener la faringe cerrada
- Presionar la lengua con un baja lenguas
- Introducir el hisopo hasta el fondo de la orofaringe, rotarlo por la parte posterior de las amígdalas de arriba hacia abajo
- Colocar el hisopo en un vial que contiene 1.5 mL de medio de transporte viral (MTV) y cortar el resto del escobillón para cerrar el vial adecuadamente
- Identificar el recipiente de la muestra con la fecha de recolección, el número consecutivo y el nombre de la persona.

◁ Aspirado Nasofaríngeo (Rodríguez LD et. al., 2020;)

- Utilizar una sonda de calibre 8, para adultos, en un volumen mínimo de 3 mL de solución salina solución salina
- Medir la distancia entre el lóbulo auricular y la punta de la nariz de la persona. Esta medida es la indicada a introducir de la sonda
- Verificar la permeabilidad de las fosas nasales
- Utilizar la fosa nasal más permeable para realizar la aspiración
- Lubricar la punta de la sonda con solución salina
- Introducir 5 mL de solución salina fisiológica estéril (pH:7.0) en la fosa nasal utilizando una jeringa unida a la sonda nasofaríngea hasta la distancia medida anteriormente o hasta que se produzca tos
- Aspirar hasta donde sea posible todo el material de la secreción nasofaríngea, lo mínimo a aspirar son 3 mL del contenido instilado
- Adicionar la muestra al vial estéril

- Enjuagar la jeringa en el vial estéril
- Repetir el procedimiento realizado con la otra ventana nasal
- Colocar la muestra en el vial que contiene 2 mL de solución salina
- Identificar el recipiente de la muestra con la fecha de recolección, el número consecutivo y el nombre de la persona

Conservación de las muestras (Rodríguez LD et. al., 2020)

Las muestras clínicas recolectadas deben conservarse a temperatura de refrigeración (2°C a 8°C) pero posterior a 48 horas deben conservarse congeladas -70°C por años

Transporte de las muestras (Rodríguez LD et. al., 2020)

Utilizar el sistema básico de Triple embalaje acorde con las normativas vigentes para el transporte de sustancias infecciosas. Guía sobre la reglamentación relativa al transporte de sustancias infecciosas 2019-2020: *https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/327978/WHO-WHE-CPI-2019.20-spa.pdf?ua=1*
Si las muestras son para remitir al Instituto Nacional de Salud tener en cuenta el manual de procesamiento para la toma, conservación y envíos de muestras al LNR disponible en:

http://www.ins.gov.co/Direcciones/RedesSaludPublica/DocumentosdeInteresSRNL/Manual_tom a_envio_muestras_INS-2019.pdf
Embalaje:

- Recipiente principal o primario hermético: el que contiene la muestra
- Embalaje secundario (contenedor secundario hermético): debe ser resistente y anti fugas
- Embalaje exterior rígido con una superficie de al menos 10cm x 10cm

Pretratamiento de las muestras (Laboratorio de Biología Molecular COVID-19)

Hisopado

- Retirar el escobillón
- Homogenizar con vortex
- Las muestras de hisopado nasofaríngeo en su gran mayoría no requieren pretratamiento. sin embargo, se puede utilizar el mismo protocolo tal cual como se realiza con las muestras provenientes de aspirados nasofaríngeos sin afectar la calidad del ARN viral que será extraído utilizando el protocolo de extracción.

Aspirado nasofaríngeo

- Homogenizar con vortex a máxima velocidad durante 1 minuto
- Si la consistencia de la muestra requiere ser diluida, adicionar solución salina seguida de un vortex intenso. Ocasionalmente se requiere adicionar 50uL de cloruro de sodio (NaCl) 1N para lograr un lisado total.

Extracción de ARN

Existen diferentes metodologías para la extracción de ARN a partir de la muestras para el diagnóstico. Los métodos de extracción se pueden dividir en varias categorías, extracción basada en columnas de afinidad o basada en perlas magnéticas y extracción manual o automatizada. La técnica de extracción puede variar dependiendo el kit comercial que se utilice, entre los recomendados por el Centers for Disease Control and Prevention (CDC) se encuentran reactivos de extracción manual o equipo automatizados basado en perlas magnéticas.

Tamización por Agrupación (Pool screening)

Método que combina varias muestras y se procesan en un ensayo.

Blancos moleculares del genoma de SARS-CoV-2

Blanco Humano (Control Interno): **Gen *house keeping*** (por ejemplo RNAsa P)

Convención: P5: cinco muestras por grupo

Nota: A continuación se describe el protocolo rRT-PCR usando la metodología desarrollada por Corman y colaboradores en 2020 que se utiliza en la mayoría de los laboratorios del país como lo describe el documento: "Pruebas para la detección molecular de SARS-COV-2 por RT-PCR usadas en Colombia (https://www.ins.gov.co/Pruebas_Deteccio%CC%81n_Molecular_Sars-Cov-2_Rt-Pcr_Colombia.pdf).

-E assay: Realizar por cada blanco y por cada grupo de muestras el siguiente esquema:

MasterMix:	25 µl single rxn, µl	Cycler:		
H_2O (RNAse free)	2.6	55°C	10'	
2x Reaction mix*	12.5			
$MgSO_4$(50mM)	0.4	94°C	3'	45x
BSA (1 mg/ml)**	1	94°C	15"	
Fwd primer (10 µM)	1	58°C	30"	
Rev primer (10 µM)	1			
Probe (10 µM)	0.5	40°C	30"	
SSIII/Taq EnzymeMix*	1			
Total	20			

ARN plantilla: 5 (P5: 2 µl de la muestra #1; 2 µl de la muestra #2; 2 µl de la muestra #3, 2 µl de la muestra #4 y 2 µl de la muestra #5)

Nota: Se utilizan 5 µl del pool de ARN para incluir en la mezcla de reacción, se conservan 5 µl como contra muestra.

RdRpassay: MasterMix:	25µl single rxn, µl	Cycler:		
H_2O (RNAse free)	1.1	55°C	10'	
2x Reaction mix	12.5			
$MgSO_4$(50mM)	0.4	94°C	3'	45x
Fwd primer (10 µM)	1.5	94°C	15"	
Rev primer (10 µM)	2	58°C	30"	
Probe (10 µM)	0.5			
SSIII/Taq EnzymeMix	1	40°C	30"	
Total	20			

ARN plantilla: 5 (P5: 2 µl de la muestra #1; 2 µl de la muestra #2; 2 µl de la muestra #3, 2 µl de la muestra #4 y 2 µl de la muestra #5)

Nota: Se utilizan 5 µl del pool de ARN para incluir en la mezcla de reacción, se conservan 5 µl como contra muestra.

Observación sobre el límite de detección

Es posible que en un diseño de tamización por grupos el límite de detección de la prueba utilizada se vea alterado por efecto de dilución de las muestras positivas en la matriz de muestras negativas. Esta es una razón adicional para sugerir que se realicen los grupos (pooles) de cinco muestras.

Por ejemplo el límite de detección reportado para el protocolo de Berlín es:

Blanco	Protocolo de Berlín
Gen RdRP	3,8 copias RNA viral/reacción (IC 95% 2,7-7,6)
Gen E	5,2 copias RNA viral/reacción (IC 95% 3,7-9,6)

Adicionalmente, si en un pool de 5 muestras hay un positivo con un CT de 30, al realizarse el pool puede verse una lectura confiable aproximadamente en un CT de 32 es decir una diferencia cercana a 2 en el valor CT respecto a la muestra individual.

RESULTADOS ESPERADOS:

Emitidos por el termociclador acorde con la curva de amplificación y el umbral (Threshold) de acuerdo con la metodología que se utilice.

Por ejemplo:

Valor Ct < 40 (**Positivo**) para el Pool

Valor Ct >40 (**Negativo**) Para cada una de las muestras

INTERPRETACIÓN:

La amplificación control interno indica un resultado válido.

Un resultado negativo confirma que no hay infección en las muestras del grupo (Pool) procesado.

Un resultado positivo indica que hay infección en una o más de las muestras en el grupo (Pool) procesado. En este caso realizar, individualmente, el rRT-PCR a cada una de las muestras que conforman el "Pool" para detectar la muestra que contiene el ARN de SARS-CoV-2

Muestra #1 Muestra #2 Muestra #3 Muestra #4 Muestra #5	Pool #1	**Ct 25**	Realizar nuevamente el PCR de manera individual para detectar la presencia de SARS-CoV-2 en la muestra #1, o en la muestra #2, o en la muestra #3 o en la muestra #4 o en la muestra #5
Muestra #6 Muestra #7 Muestra #8 Muestra #9 Muestra#10	Pool #2	**Ct 39**	Realizar nuevamente el PCR de manera individual para detectar la presencia de SARS-CoV-2 en la muestra #1, o en la muestra #2, o en la muestra #3 o en la muestra #4 o en la muestra #5
Muestra #11 Muestra #12 Muestra #13 Muestra #14 Muestra #15	Pool #3	Ct > 40	Las muestras son negativas: No hay presencia de SARS-CoV-2 ni en la muestra 11, ni en la muestra 12, ni en la muestra 13, ni en la muestra 14 y ni en la muestra 15
Muestra #16 Muestra #17 Muestra #18 Muestra #19 Muestra #20	Pool #4	Indeterminado	Las muestras son negativas: No hay presencia de SARS-CoV-2 ni en la muestras 16, ni en la muestra 17, ni en la muestra 18, ni en la muestra 19 y ni en la muestra 20
Muestra #21 Muestra #22 Muestra #23 Muestra #24 Muestra #25	Pool #5	Inválido	El ensayo es inválido: No hay amplificación del control interno y el ensayo es inválido para todas las muestras del pool.

REFERENCIAS:

- Alvarez-Diaz DA, Franco-Muñoz C, Laiton-Donato K, Usme-Ciro JA, Franco-Sierra ND, Mercado-Reyes M. Molecular analysis of several in-house rRT-PCR protocols for SARS-CoV-2 detection in the context of genetic variability of the virus in Colombia. 2020 medRxiv, 2020. 2005.2022.20107292. doi:10.1101/2020.05.22.20107292
- Eberhardt JN, Breuckmann NP, Eberhardt CS. Multi-stage group testing improves efficiency of large-scale COVID19 screening. J Clin Virol 128 (2020) 104382
- International Conference on harmonisation (ICH) of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2 (R1). Disponible en http://www. ich. org/fileadmin/Public_WebSite/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pfd (consultado en 2018-03)
- Katholi Ch.R, Toé L, Merriweather A, Unnasch T. Determining the Prevalence of Onchocerca volvulus Infection in Vector Populations by Polymerase Chain Reaction Screening of Pools of Black Flies. J Infect Dis. 1995;172:1414-7.
- Laboratorio de Biología Molecular COVID-19. Ayudas diagnósticas SURA. 2020
- Lohse S, Pfuhl T, Berkó-Göttel B, Rissland J, Geißle T, Gärtner B, et. al. Pooling of samples for testing for SARS-CoV-2 in asymptomatic people. Lancet Infect Dis. 2020; Apr 28. doi:10.1016/S1473-3099(20)30362-5
- Rodríguez LC, Reyes Y, Rodriguez A, Salcedo I. Vigilancia por laboratorio de influenza y otros virus respiratorios en el Marco del Plan Antipandemia. Bogotá, D.C., Instituto Nacional de Salud; 2007
- Rodríguez LD, Barbosa J, Barros EC, Florez C. Lineamientos para la vigilancia por Laboratorio de virus respiratorios. Bogotá, D.C., Instituto Nacional de Salud; 2020
- Ruiz MC, Alvarez VH, Fuentes SL, Girón SL. Lineamientos para el uso de pruebas en el Laboratorio de Salud Pública (LSP) en el marco de la emergencia sanitaria por COVID-19 en Colombia. Bogotá, Ministerio de Salud y Protección Social; 2020.
- Unidad de Secuenciación y Análisis Genómica – Dirección de Investigación en Salud Pública - Instituto Nacional de Salud. Pruebas para la detección molecular de SARS-CoV-2 por RT-PCR usadas en Colombia. Instituto Nacional de Salud, 2020
- World Health Organization. Novel Coronavirus (2019-nCoV). 2020. technical guidance.

Presentación Protocolo Colombiano de Pooling