



Cuba Salud

IV Convención
Internacional de Salud
17-21 de octubre, 2022

Evaluación de la estabilidad del SARS-CoV-2 en medios de transporte del BIOCEN

Gretel Susana Pérez Bartutis¹

Enrique Noa Romero¹

Juliet María Enriquez Puertas¹

Adelaida Ortega Suris¹

Otto Cruz Sui¹

Alexis Labrada Rosado²

Grupo de Diagnóstico Molecular del CICDC1

¹Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil, Mayabeque, Cuba, Email: jmenriquez@nauta.cu

² Centro de Nacional de Biopreparados. BioCen.

Resumen:

Introducción: La pandemia de COVID-19 ha llevado a una necesidad sin precedentes de diagnóstico mediante la prueba de RT-PCR; el transporte efectivo de muestras para entidades virales es vital para un diagnóstico certero. La demanda creciente de medios de transporte de muestras clínicas condujo a la necesidad de desarrollar medios de transporte para el diagnóstico del SARS-CoV-2: Medio de Transporte Esencial (BTE) y Medio de Transporte Universal (BTU) realizados por el Centro Nacional de Biopreparados (BIOCEN). Por tal motivo se evaluó la estabilidad del SARS-CoV-2 en los medios de transporte BTE y BTU y se comparó con el Medio de Transporte Viral en uso (BTV).

Materiales y métodos: Se añadieron 200µL de las diluciones virales 1: 100 y 1:1000 a los medios de transporte por triplicado. Se incubaron a 4 °C o a temperatura ambiente durante 96 horas. Bajo las mismas condiciones también se incubaron muestras de cada medio sin inocular como controles negativos. Después de la incubación (0, 24, 48, 72 y 96h) se tomaron alícuotas de cada muestra y de los controles negativos para la detección cualitativa directa del ARN de SARS-CoV-2 (RIDA®GENE SARS-CoV-2).

Resultados: Se demostró que los medios BTE y BTU almacenados a 4°C, permiten preservar el ARN de SARS CoV-2 durante las 96 horas, al igual que el BTV. El medio TAN permite la inactivación del virus y conservación del material genético almacenado a temperatura ambiente.

Conclusiones: Se demostró que los medios BTE y BTU almacenados a 4°C, permiten preservar el ARN de SARS CoV-2 durante las 96 horas, al igual que el BTV. A temperatura ambiente la estabilidad del material genético de SARS-CoV-2 fue inferior. Estos resultados sustentaron el registro de los medios de transporte por el Centro Estatal de Control de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médico (CECMED) y su introducción en el algoritmo de diagnóstico de la COVID-19.

Palabras clave: Sars-CoV-2, COVID-19, medio de transporte, diagnóstico, estabilidad.

I. INTRODUCCIÓN

Para el diagnóstico de enfermedades virales, se recolectan de forma rutinaria muestras como tejido, aspirados, líquidos, lavados e hisopados para el diagnóstico del agente causal. El transporte cuidadoso de las muestras desde el sitio de muestreo hasta el laboratorio de análisis dentro de un plazo adecuado es vital para un diagnóstico certero. Es posible que no se reconozca la necesidad de un medio de transporte eficaz cuando el tiempo de transporte entre la toma de la muestra y el ensayo es corto (menos de dos horas). La importancia del medio de transporte surge cuando el tiempo entre la recolección de la muestra y las pruebas de laboratorio es mayor de dos horas y es necesario mantener la viabilidad del agente infeccioso (para cultivo), o existe una necesidad reconocida de mantener la integridad de los antígenos virales y los ácidos nucleicos (1-6).

La pandemia de COVID-19 ha elevado la necesidad de su diagnóstico mediante la prueba de Reverso transcripción- Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), para la cual la muestra ideal es el hisopado nasofaríngeo que debe ser transportado al laboratorio de biología molecular en el medio de transporte para virus. A partir de marzo de 2020, la demanda creciente para las pruebas condujo a una escasez nacional de este medio y se creó una significativa carencia en los esfuerzos por realizar la prueba a gran escala (7-12).

El Centro Nacional de Biopreparados (BioCen) desarrolló un medio para el transporte de agentes virales, Medio de transporte de virus (BTV), y desde entonces ha cubierto la demanda nacional de este producto. Se desarrolla en la actualidad una segunda versión del medio de transporte convencional, Medio de Transporte Esencial (BTE) y Medio de Transporte Universal (BTU), sustituyendo ingredientes debido a las limitaciones con el suministro de materia prima que pone en riesgo la producción.

La introducción de estos medios de transporte debe demostrar su capacidad de mantener estable y bajo diferentes condiciones de almacenamiento la integridad de los antígenos virales y los ácidos nucleicos, como requisito indispensable para su aprobación de uso por el Centro Estatal para el Control de los Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED). Por tal motivo nos propusimos evaluar la estabilidad del SARS-CoV-2 en los medios de transporte de agentes virales producidos por el BioCen.

II. MÉTODO

A. Condiciones experimentales

Cepa viral: La cepa de SARS-CoV-2 empleada en el estudio fue la CU2010-2025 (SARS-CoV-2), aislada de un paciente asintomático con COVID-19 en el Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil (CICDC). La dosis infecciosa media en cultivo de células (DICC₅₀/mL) se determinó por el método de microtitulación en células Vero E6. El banco de cultivo de trabajo (BCT) empleado tiene un título de $10^{6,294}$ DICC₅₀/mL (log del título).

Medios de transporte a evaluar: Medio de transporte esencial (BTE) y Medio de transporte Universal (BTU). Se empleó para el control del estudio el Medio de transporte para virus (BTV) certificado por el CECMED para el transporte de muestras clínicas orofaríngeas y nasofaríngeas para el diagnóstico de virus por técnicas de PCR.

Inoculación de los medios de transporte: Se realizó un estudio previo con el empleo del medio BTV para evaluar la concentración de virus. Se prepararon 6 diluciones del virus 1:50, 1:100, 1:500,

1:1000, 1:3000 y 1:5000 en medio de cultivo MEM suplementado con 2 % de suero fetal bovino (SFB), 2 mM de L-glutamina al 1% y 1% bicarbonato de sodio al 7,5%.

Se inocularon 200µL de cada una de las diluciones en 6 mL de medio BTV de forma individual y se incubaron a 4°C y a temperatura ambiente (TA) durante cuatro días, con monitoreo cada 24 horas (0, 24, 48, 72 y 96 horas).

Todo el trabajo con SARS-CoV-2 viable se realizó en las instalaciones de nivel de bioseguridad 3 (BSL-3) del CICDC.

B. Detección de SARS-CoV-2 en los medios BTE y BTU

A 6mL de los medios a evaluar y el medio empleado como control, se adicionaron 200 µL de las diluciones 1:100 y 1:1000 del virus, considerando los resultados del reto del BTV. Se almacenaron a 4 °C y temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). De cada medio de transporte se tomaron muestras a razón de 500 µL previamente homogenizadas con vórtex, para el ensayo de PCR a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas. Como control negativo del ensayo se emplearon muestras de cada medio sin inocular tratadas bajo las mismas condiciones de almacenamiento.

La extracción del ARN viral se realizó a partir de 140µL de muestra de acuerdo a las instrucciones para el uso del estuche QIAamp Viral RNA MiniKit kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) y la plataforma de extracción QIAcube (QIAGEN). Previo a la extracción, se adicionó a cada muestra 10 µL del control de extracción de ARN presente en el estuche RIDA®GENE SARS-CoV-2 (R-Biopharm, Alemania). Los ARNs extraídos fueron empleados inmediatamente como moldes en la Reverso transcripción-Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (rtRT-PCR)

Para la rtRT-PCR se empleó el ensayo RIDA®GENE SARS-CoV-2 (R-Biopharm, Alemania), que detecta el gen E del SARS-CoV-2 y la plataforma Rotor Gene Q (QIAGEN). Las condiciones de amplificación fueron: 58°C-10 min, 95°C-1 min, 45 ciclos: 95°C -15 seg 60°C -30 seg (adquisición en 530 nm para el gen E y 660 nm para el Control Interno). Se consideraron positivas todas las muestras con curvas típicas (curva sigmoidal) de PCR y valores umbrales (Ct, siglas del inglés *Cycle threshold*) menores o igual a 36 ciclos para el gen E, independientemente del valor de Ct del control interno. El control de calidad de cada corrida incluyó el análisis y aceptación de los controles negativos (sin señal de amplificación) y positivos (positivos con valores de Ct y curvas típicas de PCR, así como los controles internos para la aceptación de los resultados).

C. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos en el estudio se realizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y el ensayo de comparación múltiple de Tukey con el empleo del GraphPad-Prism, versión 5.01.

III.RESULTADOS

Se detectó SARS-CoV-2 en todas las réplicas del medio BTV (almacenadas a 4 °C y a TA) retadas con diferentes diluciones del virus.; en las contaminadas con diluciones superiores a 1:1000 no se detectaron valores de Ct por debajo de 36; que corresponde al valor de corte del sistema de rtRT-PCR empleado. La figura 1 muestra que la media de los valores de Ct de las muestras inoculadas con las dos

diluciones (1:100 y 1:1000) de la cepa de SARS-CoV-2 incubadas a 4°C y a TA durante los cuatro días, se mantuvo por debajo de 36. Las diluciones 1:100 y 1:1000 contenía en 200µL, volumen que se inoculó en 6mL del medio de transportes, 390 y 39 partículas virales infecciosas, respectivamente.

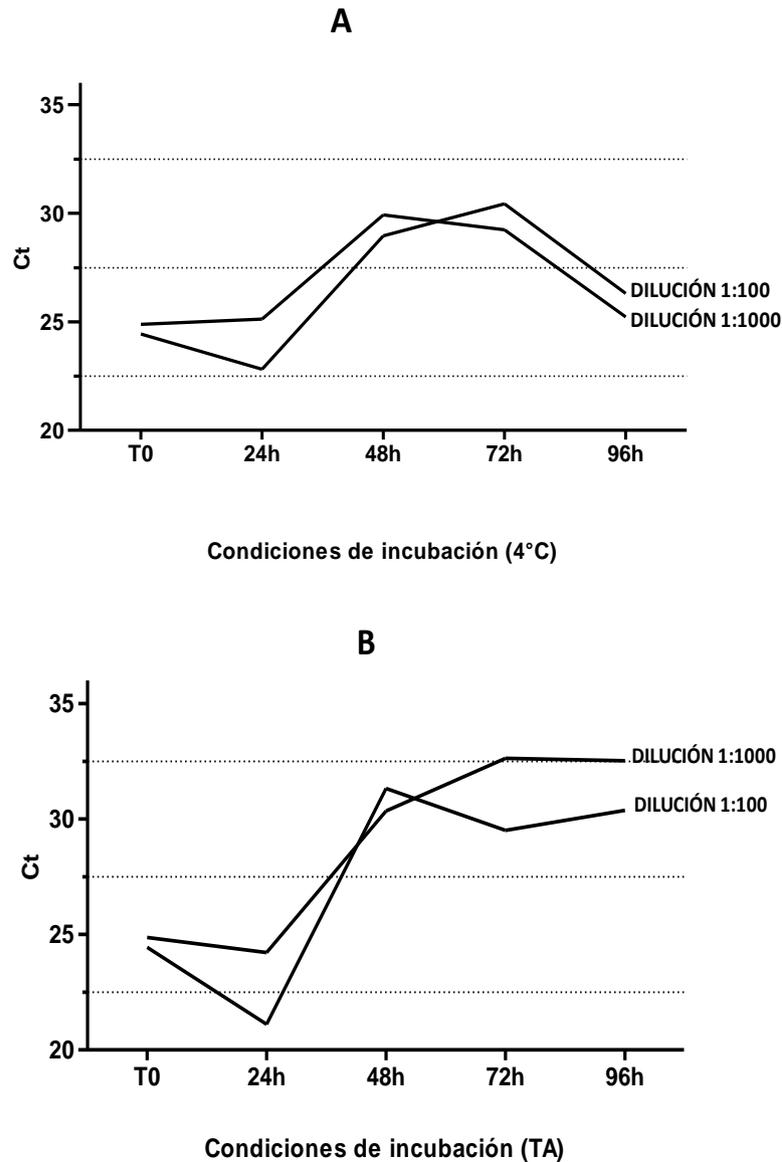


Figura 1. Comportamiento del valor de Ct del medio BTV retado con las diluciones 1:100 y 1:1000 de SARS-CoV-2 en diferentes condiciones de incubación. **A-** incubado a 4°C; **B-** incubado a TA.

La figura 2 muestra los resultados de la evaluación de los medios de transportes BTE y BTU, inoculados con la dilución 1:100 de SARS-CoV-2 en comparación con el medio BTV empleado actualmente en Cuba para el transporte y conservación de muestras clínicas para el diagnóstico por rtRT-PCR. La

capacidad de detección del virus no mostró diferencias significativas entre los tres tipos de medios de transporte; ni entre las diferentes condiciones de almacenamiento.

No se detectó ARN viral en las muestras correspondientes al medio BTE almacenadas a temperatura ambiente a las 96 horas. Lo cual puede estar dado por las diferencias en cuanto a los componentes que conforman la formulación de cada medio de trasporte.

El medio BTU fue capaz de conservar todas las muestras, al igual que el medio BTV empleado como control, tanto las almacenadas a 4°C como a temperatura ambiente, durante el periodo evaluado. Por lo tanto, el medio de transporte universal es estable y capaz de detectar ARN viral en la dilución de 1:100.

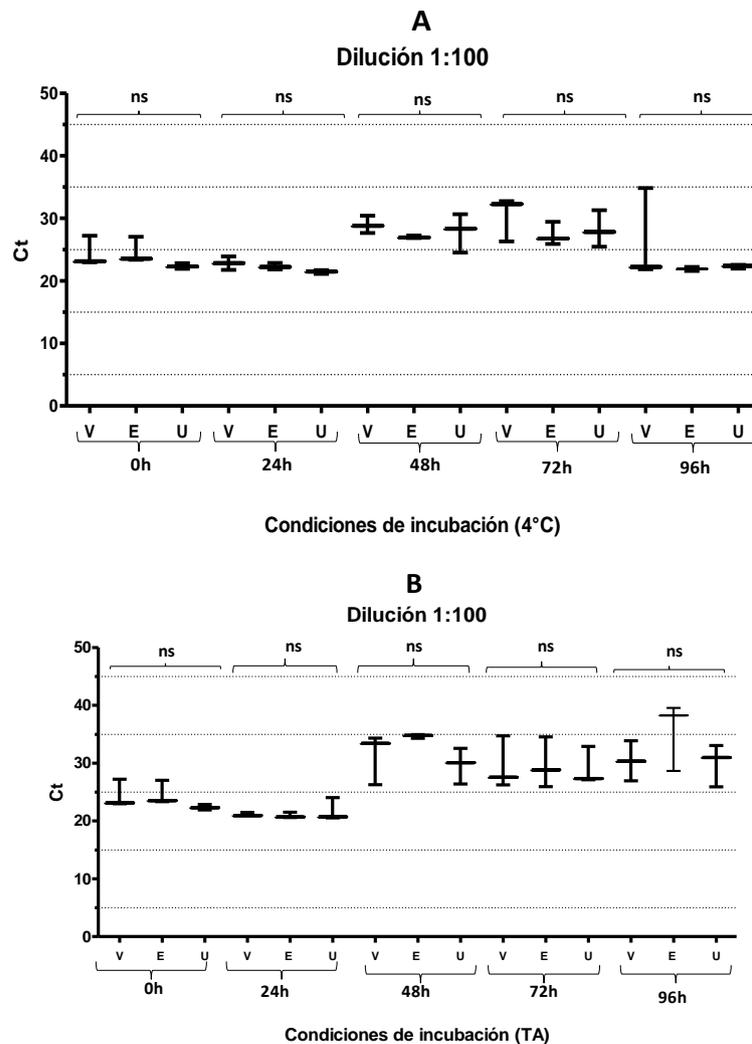


Figura 2. Diagrama de caja del valor de Ct de los medios de transporte retados con la dilución 1:100 de la cepa de SARS-CoV-2. Para cada conjunto de datos (3 puntos de datos), los valores mínimos y máximos son representados por bigotes debajo y encima de las barras agrupadas, respectivamente. La mediana en cada grupo de datos es indicada como una línea horizontal. Las líneas superiores, media e inferior de la caja indican percentil 75, mediana y percentil 25 dentro de cada grupo de datos, respectivamente. Comparación entre el Ct de cada medio de transporte y las condiciones de incubación usando ANOVA unidireccional. V (BTV), E (BTE), U (BTU), ns- no hay diferencia significativa ($p > 0,05$)

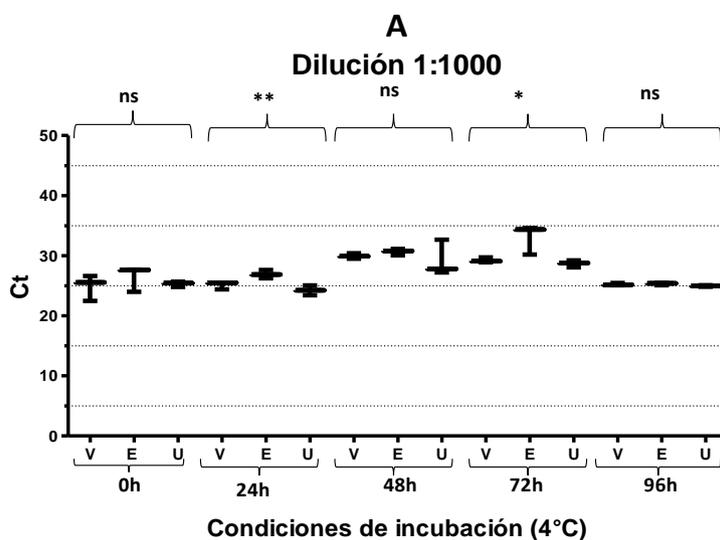
En la figura 3 se representa la capacidad de detectar el SARS-CoV-2 cuando los medios de transporte se retaron con una baja carga viral (dilución 1:1000).

Se observó diferencias significativas ($p < 0,05$) en la Ct de los medios de transporte retados con la dilución 1:1000 almacenados a 4 °C a las 24 y 72 horas. En estos casos los valores de Ct para las muestras del medio BTE fueron mayores; pero siempre por debajo del valor de corte del sistema ($Ct \leq 36$). Por lo que todas las réplicas resultaron positivas.

Para los dos medios de transporte se logró detectar el ARN del virus durante todo el periodo evaluado almacenado a 4 °C, como muestra la figura 3. Esto demuestra que tanto el medio BTE como el medio BTU son estables hasta 96 horas y permiten la detección del material genético del virus cuando se mantiene a 4°C.

Los medios de transporte almacenados a temperatura ambiente tuvieron diferente capacidad para la detección del material genético del SARS-CoV-2 en las condiciones de baja carga viral (dilución 1:1000), el cual se detectó en el medio BTV; mientras que en el medio BTU no se detectó ARN viral a partir de las 72 horas. En el medio BTE, a partir de las 48 horas, los valores de Ct fueron superiores al valor de corte y no se pudo detectar el ARN viral.

En el estudio se demostró la estabilidad de las muestras con baja carga viral de SARS-CoV-2 correspondientes a los medios BTE y BTU almacenadas a 4 °C, mientras que a temperatura ambiente se ve afectada la capacidad de detectar bajas cargas de material genético a partir de las 48 horas.



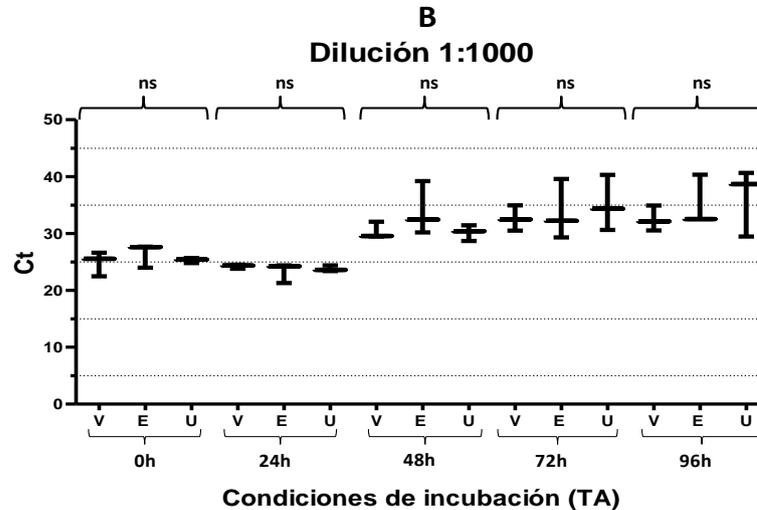


Figura 3. Diagrama de caja del valor de Ct de los medios de transporte retados con la dilución 1:1000 de la cepa de SARS-CoV-2. Para cada conjunto de datos (3 puntos de datos), los valores mínimos y máximos son representados por bigotes debajo y encima de las barras agrupadas, respectivamente. La mediana en cada grupo de datos es indicada como una línea horizontal. Las líneas superiores, media e inferior de la caja indican percentil 75, mediana y percentil 25 dentro de cada grupo de datos, respectivamente. Comparación entre el Ct de cada medio de transporte y las condiciones de incubación usando ANOVA unidireccional. A-incubado a 4°C; B-incubado a TA. V (BTV), E (BTE), U (BTU), ns- no hay diferencia significativa ($p>0,05$) * $p<0,05$ ** $p<0,01$

IV. CONCLUSIONES

Estos resultados demuestran que los medios BTE y BTU almacenados a 4°C, permiten preservar en muestras de pacientes el ARN de SARS-CoV-2 durante 96 horas, incluso cuando la muestra tiene una baja carga viral. También revelan que el almacenamiento a temperatura ambiente después de las 24 horas afecta la capacidad de detectar el material genético del SARS-CoV-2 con los medios BTE y BTU.

V. REFERENCIAS

1. Brasel T, Madhusudhan KT, Agans K, Dearen K, Jones SL, Sherwood RL. Performance evaluation of Puritan® Universal Transport System (UniTranz-RTTM) for preservation and transport of clinical viruses. *Journal of Medical Virology*. 2015; 87: 1976-180
2. Galipeau Y, Greig M, Liu G, Driedger M, Langlois M-A. Humoral Responses and Serological Assays in SARS-CoV-2 Infections. *Front. Immunol.* 2020; 11:610688.
3. Ganguli A, Mostafa A, Berger J, Lim J, Araud E y col. Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Ultrasensitive Detection of SARS-CoV-2 in Saliva and Viral Transport Medium Clinical Samples. *Anal. Chem.* 2021; 93: 7797-7807
4. Johnson FB. Transport of viral specimens. *Clinical Microbiology Rew* 1990; 3 (2): 120-131

5. Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Persons for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/guidelines-clinical-specimens.html>. 2020
6. McAuley J, Fraser C, Paraskeva E, Trajcevska E, Sait M, Wang N y col. Optimal preparation of SARS Cov-2 viral transport medium for culture. *Viol J.* 2021; 18:53
7. Mears MJ, Wallace MJ, Yount JS, Fowler LA, Jones PS, y col. Viral transport media for COVID-19 testing. *MethodsX*2021; 8: 101433
8. Patkar N, Rajpal S, Shetty N, Gokarn A, Mirgh S y col. Detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is influenced by the type of transport medium: implication for diagnosis and monitoring. *Int J ClinPract.* 2021; 75: e14311
9. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent end point. *Am J Hyg*1938; 27: 493-497
10. Smith KP, Cheng A, Chopelas A, DuBois-Coyne S, Mezghani I, Rodriguez S y col. Large-scale, in house production of viral transport media to support SARS-Cov-2 PCR testing in a Multihospital Health Care Network during the COVID-19 pandemic. *J ClinMicrobiol.* 2020; 58: e00913-20
11. Van Bockel D, Munier CM, Turville S, Badman SG, Walker G, y col. Evaluation of commercially Available viral transport medium (VTM) for SARS-CoV-2 inactivation and use in Point-of-Care (POC) testing. *Viruses.* 2020; 12:1208
12. Zou L. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *N Engl J Med.* 2020; 382 (12): 1177–9