

ARTÍCULO ORIGINAL

Uso de sales de Hank, de solución salina y buffer de fosfatos (PBS) como medio de transporte en la identificación de SARS-CoV-2 por RT-PCR

Use of Hank's salts, saline and phosphate buffer (PBS) as transport medium in the identification of SARS-CoV-2 by RT-PCR

Parra-Ortega Israel,^{*,‡} Carbajal-Franco Ebzadrel,^{*}

Nieto-Rivera Brenda,^{*} Galaviz-Hernández Stephania,^{*}

López-Martínez Irma,[§] Barrera-Badillo Gisela,[¶] López-Martínez Briceida^{*,‡}

Palabras clave:

Solución salina,
buffer de fosfatos,
medio de transporte,
identificación de SARS-
CoV-2.

Keywords:

Saline, phosphate
buffer, transport
medium, SARS-CoV-2
identification.

* Departamento
de Laboratorio
Clínico, Hospital
Infantil de México
«Federico Gómez».
CDMX, México.

† Dirección de
Enseñanza e
Investigación.
Laboratorios Ruiz,
Puebla, México.

‡ Dirección de
Diagnóstico y
Referencia, Instituto
de Diagnóstico
y Referencia
Epidemiológicos.
CDMX, México.

¶ Laboratorio de

RESUMEN

Introducción: La detección temprana y oportuna de los casos que presentan el virus SARS-CoV-2 permite implementar medidas de aislamiento, las cuales están encaminadas a mitigar la transmisión de casos en esta pandemia. Por lo anterior nosotros mostramos la evidencia obtenida en el manejo de algunas alternativas como medio de transporte para muestras de hisopados nasofaríngeos para la identificación del SARS-CoV-2. **Material y métodos:** Se prepararon tres medios de transporte: 1) solución salina balanceada de Hank, 2) solución salina fisiológica al 0.9% y 3) buffer de fosfatos (PBS) 1X. Los tres medios fueron suplementados con 5% de suero fetal bovino inactivado con calor y 1% de penicilina/estreptomicina. En el periodo de mayo-julio de 2020 se incluyeron las muestras de todos los pacientes pediátricos del Hospital Infantil de México «Federico Gómez» a los cuales se les realizó la prueba para la detección de infección por COVID-19. En el proceso analítico de todos los casos, se registraron los valores del *cycle threshold* (Ct) de los genes virales y el control interno para fines de este estudio, se utilizó únicamente el valor del Ct del gen humano RNAasa P (control interno), para evaluar la presencia de material genético obtenido en la toma de muestras. **Resultados:** No se documentaron diferencias entre los diferentes medios de transporte viral, tanto en los casos positivos como en los negativos. **Conclusiones:** El uso de los medios de transporte viral elaborados en los laboratorios de diagnóstico como el nuestro, es de gran ayuda para la identificación del virus SARS-CoV-2 sin comprometer la calidad de los resultados, siempre y cuando se realice el análisis pertinente y el monitoreo del desempeño en todas las etapas del proceso y se establezcan puntos de control en cada etapa.

ABSTRACT

Introduction: Early and timely detection of cases with the SARS-CoV-2 virus allows the implementation of isolation measures, which are aimed at mitigating the transmission of cases in this pandemic. Therefore, we show the evidence obtained in the handling of some alternatives as a means of transport for nasopharyngeal swab samples for the identification of SARS-CoV-2. **Material and methods:** Three transport media were prepared: 1) Hank's balanced salt solution, 2) 0.9% physiological saline, and 3) 1X phosphate buffer (PBS). The three media were supplemented with 5% heat inactivated fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin. In the period May-July 2020, samples from all pediatric patients of the Hospital Infantil de México «Federico Gómez» who were tested for the detection of COVID-19 infection were included. In the analytical process of all cases, the values of the cycle threshold (Ct) of the viral genes and the internal control were recorded for the purposes of this study, only the value of the Ct of the human RNAase P gene (internal control) was used, to evaluate the presence of genetic material obtained in the sampling. **Results:** No differences were documented between the different means of viral transport, both in positive and negative cases. **Conclusions:** The use of viral transport media elaborated in diagnostic laboratories like ours are of great help for the identification of the SARS-CoV-2 virus without compromising the quality of the results, as long as the pertinent analysis and monitoring is carried out performance at all stages of the process and establish control points at each stage.



Citar como: Parra-Ortega I, Carbajal-Franco E, Nieto-Rivera B, Galaviz-Hernández S, López-Martínez I, Barrera-Badillo G et al. Uso de sales de Hank, de solución salina y buffer de fosfatos (PBS) como medio de transporte en la identificación de SARS-CoV-2 por RT-PCR. Rev Mex Patol Clin Med Lab. 2021; 68 (2): 51-55. <https://dx.doi.org/10.35366/103339>

Virus Respiratorios,
Instituto de Diagnóstico
y Referencia
Epidemiológicos.
CDMX, México.

Correspondencia:
**Dra. Briceida López-
Martínez**
Directora de
Enseñanza e
Investigación,
Laboratorios Ruiz
Blvd. Díaz Ordaz
Núm. 808, Edificio C
Col. Azures, 72530,
Ciudad de Puebla,
Pue., México.
Tel: 2222-438-100,
ext. 3218
E-mail: briceida.
lopez@
laboratoriosruiz.com

Recibido: 30/09/2021
Aceptado: 05/11/2021

INTRODUCCIÓN

El SARS-CoV-2 es un virus de ARN monocatenario con un genoma de 29,903 nucleótidos, lo cual lo hace el segundo genoma de ARN más grande que se conoce. Éste consta de dos regiones no traducidas (UTR) en los extremos 5' y 3', así como 11 marcos de lectura abiertos (ORF), los cuales codifican 27 proteínas.¹⁻⁴

La identificación de SARS-CoV-2 se basa en la detección del ARN del virus mediante ensayos de RT-PCR en tiempo real, en los cuales se lleva a cabo la amplificación de los diferentes genes blancos o diana de acuerdo al kit o prueba utilizada, siendo las regiones más utilizadas las ubicadas en los genes N, S, RdRp y Orf 1ab.^{5,6}

En México, la pandemia generó muchos problemas con respecto a la importación y adquisición de productos e insumos de laboratorio, siendo los medios de transporte viral una limitante.

La detección temprana y oportuna de los casos que presentan el virus SARS-CoV-2 permite implementar medidas de aislamiento, las cuales están encaminadas a mitigar la transmisión de casos en esta pandemia. Por lo anterior nosotros mostramos la evidencia obtenida en el manejo de algunas alternativas como medio de transporte para muestras de hisopados nasofaringeos para la identificación del SARS-CoV-2.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio, se prepararon tres medios de transporte distintos.

Se utilizaron 500 mL de solución salina balanceada de Hank (HBSS) 1X (Gibco) (medio de transporte #1); Solución salina fisiológica al 0.9% (PiSA) (medio de transporte #2) y PBS 1X (Gibco) (medio de transporte #3). Los tres medios fueron suplementados con 5% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco) inactivado con calor y 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco). Posteriormente, las soluciones se filtraron empleando botellas al vacío con membranas con un diámetro de poro de 0.22 µm (Corning). Finalmente, de cada medio se realizaron alícuotas de 2 mL en tubos Falcon de 15 mL (Corning) y se mantuvieron a cuatro grados centígrados hasta su uso. Para la

identificación de las alícuotas elaboradas, los tubos fueron identificados de acuerdo a un código de colores: Medio de transporte #1 (tubos tapón azul), medio de transporte #2 (tapón amarillo) y medio de transporte #3 (tapón verde).

En el periodo comprendido de mayo-julio de 2020 se incluyeron las muestras de todos los pacientes pediátricos con síntomas de infección por COVID-19 del Hospital Infantil de México «Federico Gómez». Los hisopados se colectaron durante la primera semana del inicio de los síntomas, mediante un procedimiento estándar de toma de muestra.^{6,7} Las muestras se colocaron en los medios de transporte viral preparados con anterioridad. El ARN total fue extraído y purificado empleando el robot QIAcube (QIAGEN) y el QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN), siguiendo los protocolos del fabricante. La detección de los genes virales ORF-1ab, nucleocápside (NC), espícula (S) y del gen humano RNAasa P (control interno) se realizó mediante reacción en cadena de polimerasa-trascipción reversa (RT-PCR) en tiempo real con los kits *Detection Kit for 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) RNA (PCR-Fluorescence Probing)* (DAAN Gene Co. Ltd. Of Sun Yat-Sen University) y *TaqMan 2019-nCoV Assay Kit v1* (Thermo Fisher Scientific). Los termocicladores *QuantStudio 5 System* (ABI/Life Technologies) equipado con el *QuantStudio Design & Analysis Software* versión 2.3.3 y el *CFX96 Real-Time System* (BIO-RAD) se utilizaron para la amplificación y detección del material genético siguiendo las recomendaciones de los fabricantes y los lineamientos operativos vigentes establecidos por el InDRE.^{6,7} En todos los casos se registraron los valores del *cycle threshold* (Ct) de los genes virales y el control interno para fines de este estudio, se utilizó únicamente el valor del Ct del gen humano RNAasa P (control interno), para evaluar la presencia de material genético obtenido en la toma de muestras.

En los casos en los que se detectó la presencia del virus SARS-CoV-2, se realizó el análisis de la distribución de la carga viral relativa, además de un análisis estadístico descriptivo con los datos obtenidos a partir de los ensayos de laboratorio, utilizando el sistema informático *GraphPad Prism 6.0 para Windows*.

RESULTADOS

Se documentó información de 522 muestras de pacientes pediátricos (edad de 0 a 18 años, con una media de edad de 6.9 años), que reciben atención de tercer nivel. Dentro de las características de estos pacientes, el 70% se atendieron en consulta externa y dentro de los hospitalizados coexistieron con comorbilidades, siendo las patologías más frecuentes las neoplasias, enfermedades cardiovasculares y enfermedades pulmonares.

Se identificaron 65/522 (12.5%) pacientes que resultaron positivos para la prueba, de los cuales, 305/522 (58.4%) fueron del sexo masculino. De todos los pacientes positivos se estimó la distribución de carga viral relativa de

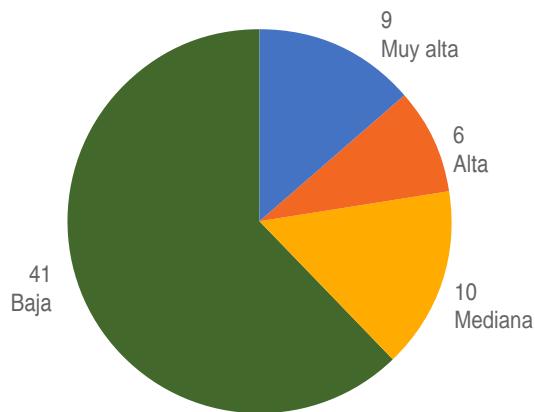


Figura 1: Distribución de la cantidad de ARN viral al momento del diagnóstico (carga viral relativa) de acuerdo al valor de *cycle threshold* (Ct).

acuerdo al sexo y la edad,⁸ así como el momento en que se realizó la detección (mes del diagnóstico). De acuerdo al valor del valor de Ct (utilizado para estimar la cantidad ARN viral) se observó que 9/65 (12.30%) de los pacientes positivos presentaron carga viral muy alta, 6/65 (9.23%) carga viral alta, 10/65 (15.38%) carga viral media y 41/65 (65.07%) carga viral baja (*Figura 1*).

Los resultados indeterminados o no concluyentes se observaron en 13 muestras (siete en el medio de transporte #1, cinco en el medio de transporte #2 y una en el medio de transporte #3), los cuales fueron también incluidos en el análisis. La distribución de las muestras de acuerdo a cada medio de transporte y la distribución de los valores del Ct del gen humano RNAsa P (control interno) se describen en la *Tabla 1*.

En la *Figura 2* se muestra la distribución del valor del Ct y de los percentiles en los diferentes medios de transporte, se incluye también la distribución de los Ct del control interno de los casos indeterminados o no concluyentes.

DISCUSIÓN

Dentro de las recomendaciones que se han establecido al momento de la toma de muestras para la identificación del virus SARS-CoV-2, se ha enfatizado la calidad del hisopado; sin embargo, algunos factores importantes como lo son: 1) tiempo de proceso entre la toma de muestra y la extracción de ARN, 2) la temperatura de almacenamiento y trasporte, y 3) la estabilidad de la muestra en los diferentes viales o medios de transporte, hace imperativo generar información con respecto a estos

Tabla 1: Distribución de muestras.

	Medio de transporte #1 (sales de Hank)	Medio de transporte #2 (solución salina)	Medio de transporte #3 (buffer de fosfatos)
Número de muestras	301	116	105
Valor del Ct mínimo	21.81	21.65	21.18
Percentil 25%	24.57	25.18	25.31
Mediana	25.96	27.90	27.54
Percentil 75%	27.72	29.77	29.76
Valor del Ct máximo	38.33	34.17	34.17
Media ± DE	26.37 ± 2.460	27.67 ± 2.760	27.62 ± 2.670
Valor mínimo intervalo de confianza al 95%	26.09	27.16	25.31
Valor máximo intervalo de confianza al 95%	26.65	28.18	27.54

Ct = *cycle threshold* (umbral del ciclo).

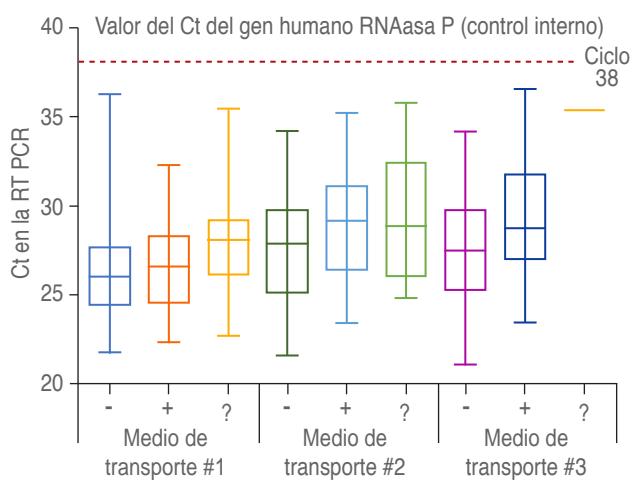


Figura 2: Se describen los valores del *cycle threshold* (Ct) del gen humano RNAsa P (control interno), en donde se observa la distribución en las muestras positivas (+), negativas (-) e indeterminadas o no concluyentes (?).

puntos; es por ello que el haber realizado las diferentes comparaciones con los tres medios disponibles en nuestro hospital genera información importante que puede ser útil para la estandarización de los procesos. Con base en los resultados estadísticos, podemos decir que no se observaron diferencias significativas en los valores obtenidos, pues las medias, medianas y desviaciones estándar en los diferentes viales resultan muy similares, por lo que no encontramos diferencias estadísticas que hagan inferir afectación en los resultados. En el caso de los valores de pacientes negativos a la detección de SARS-CoV-2, se observó una distribución heterogénea. En la *Figura 2* se observa que en sales de Hank (medio de transporte #1) se tienen valores de Ct menores a los otros dos medios de transporte ($p < 0.05$); sin embargo, considerando otros criterios y puntos clave en la interpretación de los resultados, como lo es el ciclo de PCR utilizado como corte o límite (ciclo 38), ningún valor obtenido se encuentra cerca de dicho valor.

Los resultados indeterminados o no concluyentes observados pueden atribuirse a varias causas, dentro de las diversas fases del proceso, siendo las más significativas y mencionadas con anterioridad: 1) el momento de la toma de la muestra a partir del inicio de signos y síntomas de la enfermedad, 2) la calidad de la muestra al momento de la toma, 3) el tiempo y temperatura de transporte desde la toma de muestra hasta su proceso, 4) la eficiencia del proceso de extracción de ácidos nucleicos, 5) la sensibilidad analítica del método o plataforma analítica utilizada. Por lo anterior, las 13 muestras identificadas (siete en el

medio de transporte #1, cinco en el medio de transporte #2 y una en el medio de transporte #3) no permiten hacer inferencias sobre la eficiencia y funcionalidad de los medios utilizados; por ello, cada caso se analizó de manera particular, solicitando una nueva muestra para atender principalmente el contexto de la pandemia, ya en la segunda muestra se caracterizaron como positivas o negativas a la presencia de SARS-CoV-2.

En situaciones de emergencia como en esta pandemia, se debe considerar que los recursos son finitos y que la adquisición de los mismos puede ser compleja; por lo tanto, los analistas en conjunto con los directivos y responsables de calidad de las instituciones deben generar evidencias de sus procesos a fin de garantizar la confiabilidad de los mismos. Nosotros documentamos y compartimos esta información a fin de generar evidencia y basados en el estudio de Perchetti GA y colaboradores⁹ y otras publicaciones importantes,¹⁰⁻¹⁴ en donde hacen énfasis en que el PBS es un medio clínicamente útil que se puede implementar fácilmente para el transporte y la conservación a corto plazo de muestras que contienen SARS-CoV-2. Además, existe evidencia que refiere que el uso de PBS como medio de transporte tiene el potencial de aumentar la capacidad de prueba para el SARS-CoV-2, ayudando a una detección más generalizada y un diagnóstico temprano de COVID-19.⁹⁻¹⁴

CONCLUSIONES

Nos atrevemos a decir que en situaciones de escasez de recursos, el uso de los medios de transporte viral elaborados en los laboratorios de diagnóstico como el nuestro, son de gran ayuda para la identificación del virus SARS-CoV-2 sin comprometer la calidad de los resultados, siempre y cuando se realice el análisis pertinente y el monitoreo del desempeño en todas las etapas del proceso y se establezcan puntos de control en cada etapa.

REFERENCIAS

- Xu Z, Shi L, Wang Y, Zhang J, Huang L, Zhang C et al. Pathological findings of COVID-9 associated with acute respiratory distress syndrome. Lancet Respir Med. 2020; 8 (4): 420-422. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30076-X.
- Colaneri M, Sacchi P, Zuccaro V, Biscarini S, Sachs M, Roda S et al. Clinical characteristics of coronavirus disease (COVID-19) early findings from a teaching hospital in Pavia, North Italy, 21 to 28 February 2020. Euro Surveill. 2020; 25 (16): 2000460.
- Helmy YA, Fawzy M, Elaswad A, Sobieh A, Kenney SP, Shehata AA. The COVID-19 pandemic: a comprehensive review of taxonomy, genetics, epidemiology, diagnosis, treatment, and control. J Clin Med. 2020; 9 (4): 1225.

4. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020; 395 (10223): 514-523.
5. Hilgenfeld R, Peiris M. From SARS to MERS: 10 years of research on highly pathogenic human coronaviruses. *Antiviral Res.* 2013; 100 (1): 286-295. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.08.015.
6. Parra-Ortega I, Carballo-Franco E, Vilchis-Ordoñez A, Ángeles-Floriano T, Nieto-Rivera B, López-Martínez I et al. Distribución de los valores del Ct en la RT-PCR para SARS-CoV-2 al momento del diagnóstico en pacientes pediátricos mexicanos. *Rev Mex Patol Clin Med Lab.* 2020; 67 (4): 176-182. doi.org/10.35366/99463.
7. Parra-Ortega I, Vilchis-Ordoñez A, López-Martínez B, Angeles-Floriano T. Analytical recommendations for SARS-CoV-2 identification by RT-PCR in pediatric patients. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2021; 78 (3): 171-180. doi:10.24875/BMHIM.20000210.
8. Heald-Sargent T, Muller WJ, Zheng X, Rippe J, Patel AB, Kocolek LK. Age-related differences in nasopharyngeal severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) levels in patients with mild to moderate coronavirus disease 2019 (COVID-19). *JAMA Pediatr.* 2020; 174 (9): 902-903. doi: 10.1001/jamapediatrics.2020.3651.
9. Perchetti GA, Huang ML, Peddu V, Jerome KR, Greninger AL. Stability of SARS-CoV-2 in phosphate-buffered saline for molecular detection. *J Clin Microbiol.* 2020; 58 (8): e01094-e01020. doi: 10.1128/JCM.01094-20.
10. Liu M, Li Q, Zhou J, Ai W, Zheng X, Zeng J et al. Value of swab types and collection time on SARS-CoV-2 detection using RT-PCR assay. *J Virol Methods.* 2020; 286: 113974. doi: 10.1016/j.jviromet.2020.113974.
11. Smith KP, Cheng A, Chopelas A, DuBois-Coyne S, Mezghani I, Rodriguez S et al. 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 Clin Microbiol.* 2020; 58 (8): e00913-e00920. doi: 10.1128/JCM.00913-20.
12. Rogers AA, Baumann RE, Borillo GA, Kagan RM, Batterman HJ, Galdzicki MM, Marlowe EM. Evaluation of transport media and specimen transport conditions for the detection of SARS-CoV-2 by use of real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 2020; 58 (8): e00708-e00720. doi: 10.1128/JCM.00708-20.
13. Radbel J, Jagpal S, Roy J, Brooks A, Tischfield J, Sheldon M et al. Detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is comparable in clinical samples preserved in saline or viral transport medium. *J Mol Diagn.* 2020; 22 (7): 871-875. doi: 10.1016/j.jmoldx.2020.04.209.
14. Rodino KG, Espy MJ, Buckwalter SP, Walchak RC, Germer JJ, Fernholz E et al. Evaluation of saline, phosphate-buffered saline, and minimum essential medium as potential alternatives to viral transport media for SARS-CoV-2 testing. *J Clin Microbiol.* 2020; 58 (6): e00590-e00520. doi: 10.1128/JCM.00590-20.