



# EVALUACIÓN DE DIFERENTES FÓRMULAS DE MEDIO DE TRANSPORTE VIRAL PARA SU USO EN LA DETECCIÓN DE ARN DE SARS-COV-2 MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL EN MUESTRAS CLÍNICAS.

CURSO 2022 - 2023

**NATALIA BERNAL ANDRÉS**

Directores

Juan Calvet Seral. Grupo de Genética de Micobacterias.

Cristina Escolar Miñana. CerTest Biotec

Tutor

Jesús A. Gonzalo Asensio. Grupo de Genética de Micobacterias.

RESUMEN.....	2
1 ANTECEDENTES .....	3
1.1 SARS-CoV-2.....	3
1.2 Patogenia .....	4
1.3 Evolución.....	5
1.4 Diagnóstico .....	6
1.5 Proyecto colaboración- Valle de la muerte. ....	7
2 OBJETIVOS .....	7
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
3.1 Estudio prospectivo .....	8
3.2 Fórmulas desarrolladas .....	8
3.3 Toma de muestra nasofaríngea .....	9
3.4 Extracción de los ácidos nucleicos.....	9
3.5 Diagnóstico molecular mediante RT-PCR .....	10
3.6 Análisis y tratamiento de los datos .....	12
4 CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	12
5 RESULTADOS .....	13
5.1 Formulas desarrolladas .....	14
5.2 Valor Ct.....	14
5.3 Estudio estadístico .....	16
5.3.1 Control interno: .....	17
5.3.2 Genes Diana (orf1ab & Gen N): .....	17
6 DISCUSION .....	18
6.1 Fórmulas.....	18
6.2 Valor Ct.....	18
6.3 Variantes.....	19
6.4 Simplificación de pasos .....	20
6.5 Economía.....	20
7 CONCLUSIONES .....	21
8 AGRADECIMIENTOS .....	22
9 BIBLIOGRAFIA .....	23
10 ANEXOS .....	26
10.1 Anexo I. Gráficas de amplificación por PCR a tiempo Real.....	26
10.2 Anexo II: Datos valor Ct .....	31

## RESUMEN

La rápida expansión del síndrome respiratorio agudo causado por el coronavirus respiratorio 2 (SARS-CoV-2) produjo una elevada demanda y escasez de reactivos comerciales asociados a pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés, PCR). Desde el grupo de Genética de Micobacterias de la Universidad de Zaragoza, se propuso al Hospital Universitario Miguel Servet emplear el medio de transporte destinado a la extracción de Ácido Ribonucleico (ARN) de micobacterias, como medio alternativo para la toma de muestras respiratorias procedentes de pacientes con sospecha de infección por SARS-CoV-2.

Debido a la complejidad de este medio, se propuso desarrollar diferentes fórmulas simplificadas, capaces de actuar como medio de transporte y medio de inactivación para SARS-CoV-2. Para poder estudiar el comportamiento de estas formulaciones, se solicitó al Comité de Ética de la Investigación de la Comunidad de Aragón (CEICA) la toma de muestra a pacientes positivos de covid-19 en los diferentes medios desarrollados para poder realizar la extracción del ARN del virus y su amplificación mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).

Los resultados mostraron que ninguna de las fórmulas desarrolladas inhibía el proceso de amplificación, y, que la variación del número de Ct (en inglés, ciclo umbral) obtenido entre el Medio de Transporte Viral (siglas en inglés, VTM) control y los desarrollados, no fueron elevados. Además, se evaluó la posibilidad de que la acción del medio de transporte sustituyera al proceso de lisis al emplear guanidinio como agente lisante, eliminando la capacidad infectiva de la muestra. Tras comprobar la eficacia biológica y optimizar el proceso, se realizó un estudio económico con el fin de seleccionar una de las fórmulas como alternativa para la toma de muestras respiratorias para el diagnóstico de covid-19.

## ABSTRACT

The rapid expansion of the acute respiratory syndrome caused by the respiratory coronavirus 2 (SARS-CoV-2) produced a high demand and shortage of commercial reagents associated with polymerase chain reaction (PCR) tests. From the Mycobacterial Genetics group of the University of Zaragoza, it was proposed to the Miguel Servet University Hospital to use the transport medium for the extraction of Ribonucleic Acid (RNA) from mycobacteria, as an alternative means for taking respiratory samples from patients with suspected SARS-CoV-2 infection.

Due to the complexity of this medium, it was proposed to develop different simplified formulas, capable of acting as a transport medium and an inactivation medium for SARS-CoV-2. In order to study the behavior of these formulations, the Research Ethics Committee of the Community of Aragon (CEICA) was requested to take samples from covid-19 positive patients in the different media developed to be able to extract RNA from the virus and its amplification by quantitative real-time PCR (qRT-PCR).

The results showed that none of the formulas developed inhibited the amplification process, and that the variation in the number of Ct (Cycle threshold) obtained between the control Viral Transport Medium (VTM) and those developed were not high. In addition, the possibility that the action of the transport medium replaced the lysis process by using guanidinium as a lysing agent, eliminating the infective capacity of the sample, was evaluated. After verifying the biological efficacy and optimizing the process, an economic study was carried out in order to select one of the formulas as an alternative for taking respiratory samples for the diagnosis of covid-19.

## 1 ANTECEDENTES

### 1.1 SARS-CoV-2

El coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo 2 (SARS-CoV-2) se extendió rápidamente desde su origen (8 diciembre 2019) en la ciudad de Wuhan (China) al resto del mundo <sup>(1,2)</sup>. Esta expansión exponencial provocó una crisis de salud pública, y con ello, una carrera por desarrollar en todo el mundo diferentes métodos de detección del SARS-CoV-2, basados tanto en técnicas inmunológicas como técnicas moleculares, donde destaca la reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés, PCR), actualmente considerada la técnica *gold standard* para la detección de este virus.

El SARS-CoV-2 es un Betacoronavirus, perteneciente a la familia Coronaviridae. Como se puede ver en la Figura 1, este virus posee una envoltura lipídica y su genoma está formado por una cadena de ARN monocatenaria positiva de casi 30.000 nucleótidos (nt), de la que dos tercios codifican proteínas no estructurales (nsps) y accesorias (ORF 1a/b codifica para las nps1 a 16), y el otro tercio de genes codifica las proteínas estructurales S, M, E y N <sup>(3)</sup>.

El gen que codifica la proteína S (Spike) está formado por 1273 nt entre los que se codifica un péptido señal (1-12 nt) y la secuencia de la propia proteína dividida en los tres dominios. Un dominio extracelular (13 – 1213 nt), un dominio transmembrana (1214 -1234 nt) y un dominio citoplasmático (1235 – 1273 nt) <sup>(4, 5)</sup>. Fijándonos en la Figura 1, vemos como estos tres dominios forman parte de las dos subunidades de la proteína, la subunidad 1 (13 – 685 nt) donde encontramos el extremo N-terminal y el sitio de unión al receptor (RBD), y la subunidad 2 (686 – 1273 nt). El dominio S2 se encuentra muy conservado entre los distintos coronavirus, mientras que el S1 es más variable <sup>(4)</sup>.

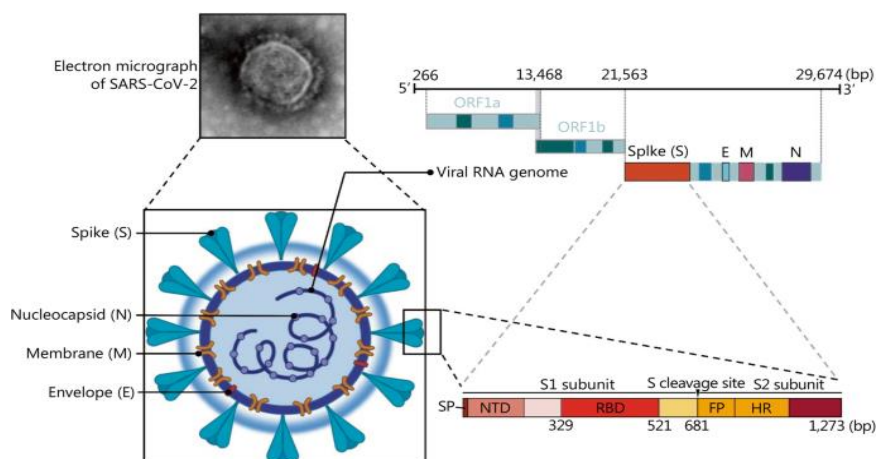


Figura 1. Partícula de SARS-CoV-2 observada por microscopía electrónica, esquema de la localización de la proteína Spike y genoma del SARS-CoV-2. <sup>(6)</sup>

La proteína S es una glicoproteína de carácter inmunogénico que se expresa en forma de homotrímero, formando la espícula viral de la cápside del virus. Está formada por tres dominios; el dominio extracelular, formado en su mayoría por láminas beta, es el encargado del reconocimiento y la adhesión a la célula huésped, y el dominio transmembrana, formado por estructuras alpha hélice, es necesario para la fusión de la membrana viral con la membrana celular <sup>(4)</sup>.

Evaluación de diferentes fórmulas de medio de transporte viral para uso en SARS-CoV-2.

Por tanto, las funciones de la proteína Spike se basan en el reconocimiento y adhesión a la célula huésped mediante su unión con el receptor ACE2 (enzima convertidora de angiotensina 2). Y, además, debido a su localización en la cápside del virus, es una importante diana inmunogénica <sup>(3,4)</sup>.

El gen que codifica la proteína N (Nucleocápside) es más pequeño que el gen S (Figura 2.A). Está formado por 419 nt, entre los que diferenciamos un extremo N-terminal, una región enlazadora central (LKR) y un extremo C-Terminal (Figura 2.B).

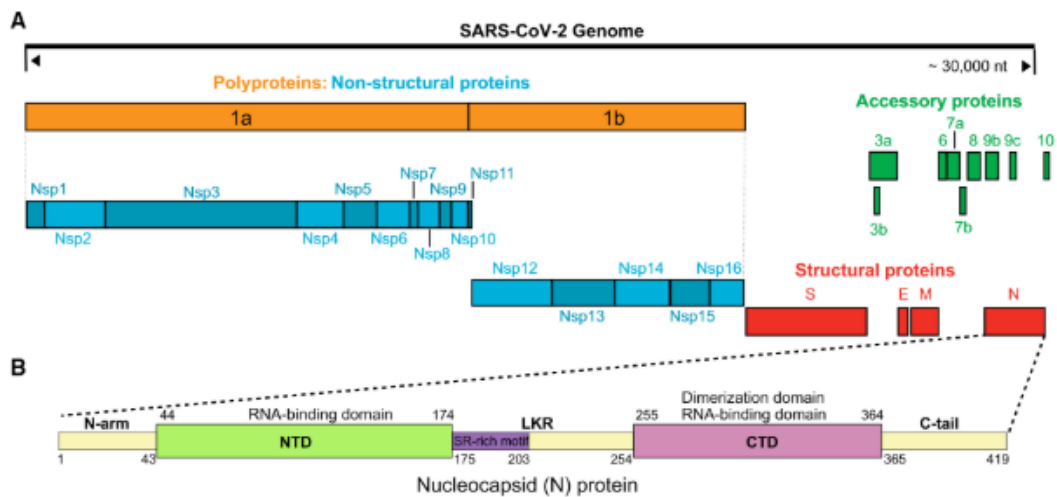


Figura 2. Se muestra el genoma del SARS-CoV-2 (A) y la estructura del gen de la proteína N (B)<sup>(7)</sup>.

Dentro de estas regiones encontramos dos dominios, uno en N-terminal (44-174 nt) que es el encargado de unirse al ARN, y otro en C-terminal (255-364 nt) que es el encargado de la dimerización de la proteína N. Como se aprecia en la figura 2.B, estos dominios están conectados por una región intrínsecamente desordenada (IDR) rica en serinas y argininas (LKR (175-254 nt)) y flanqueados por otras dos IDR, el brazo N (1-43 nt) y la cola C-terminal (365-419 nt)). Estas IDR modulan la actividad de unión a ARN y la dimerización de la proteína <sup>(7,8)</sup>.

La proteína N se expresa en forma de homodímero. Está involucrada en la replicación y el ensamblaje, se une al ARN formando el complejo ribonucleoproteína. Además, participa en la transcripción y replicación del ARN mensajero (ARNm), organización del citoesqueleto y regulación inmunitaria. Es capaz de inducir respuestas inmunitarias, tanto humorales como celulares, después de la infección, lo que la convierte en un objetivo clave para el diagnóstico y el desarrollo de vacunas <sup>(7)</sup>.

## 1.2 PATOGENIA

La evolución del SARS-CoV-2 se asocia a mutaciones en el genoma que han proporcionado al virus ventajas; como un mayor escape a los anticuerpos neutralizantes del huésped o una mayor afinidad por su receptor de membrana, lo que ha dado lugar a una selección positiva del virus y, con ello, a la aparición de diferentes variantes <sup>(9)</sup>.

En la Figura 3 podemos ver un gráfico de la base de datos de “Gisaid” <sup>(10)</sup> en el que se incluyen todas las mutaciones importantes detectadas desde marzo de 2020 hasta la actualidad.

Gran parte de las mutaciones están concentradas en el extremo N-terminal del gen S; mientras que, el resto del genoma del virus está más conservado, empleándose preferentemente como dianas inmunológicas y de diagnóstico (7).

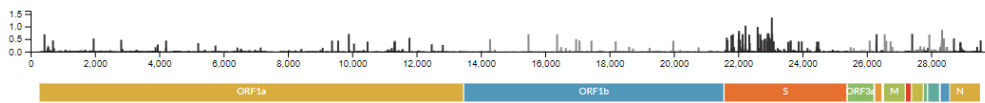


Figura 3. Localización de las mutaciones que se han ido produciendo en el SARS-CoV-2 desde marzo de 2020. Fuente: GISAID (10) <https://nextstrain.org/ncov/gisaid/global/6m>.

Como consecuencia de la infección por Sars-CoV-2 se desarrolla la enfermedad, denominada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), covid-19, cuya patología está asociada principalmente a vías respiratorias y tejido pulmonar, aunque el receptor ACE2 tiene también una elevada expresión en riñón, testículos, corazón e intestino (11,12). En humanos, la transmisión del virus se produce principalmente por el contacto con aerosoles, gotículas y secreciones respiratorias de una persona enferma. Estas pueden infectar a otra persona si entran en contacto con su nariz, ojos o boca, ya sea directamente o a través de las manos, o indirectamente con superficies contaminadas (1,2).

Según explica López Pérez *GT. et al.* (13), en una infección vírica, la entrada del ARN viral en la célula es detectada por diferentes receptores que reconocen PAMPs (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos), induciendo la respuesta inmune innata y la expresión de genes proinflamatorios, activando la vía del interferón I, las citoquinas y las quimioquinas. Estas dos últimas, son necesarias para la respuesta inmune inicial, pero una activación excesiva provoca una llegada masiva, lo que se conoce como “tormenta de citoquinas”. La tormenta de citoquinas puede desencadenar una fibrosis en fase tardía del ARDS (síndrome de dificultad respiratoria aguda), impidiendo la llegada de oxígeno al pulmón y al torrente sanguíneo, una respuesta inflamatoria sistémica y daño multiorgánico. Esta respuesta elevada/exacerbada y desequilibrada, es la causante de la patología grave del SARS-CoV-2) (2).

Sin embargo, el SARS-CoV-2, desactiva la activación de esta respuesta en las primeras fases de la infección. Tal y como describen *Li N. et al.* (14), esto se debe a que cuando el SARS-CoV-2 secuestra la maquinaria de la célula huésped para replicarse, utiliza una N-6-metiltransferasa de la célula huésped (MTTL3) para añadir grupos metilo en las posiciones 6 de las adeninas de su extremo 3' (m6A). Esta modificación impide que sea detectado por RIG-I, receptor que reconoce y se une a los PAMPs de SARS-CoV-2, impidiendo la activación de la respuesta inmune innata y activando genes pro-virales, que producen entre otras, la sobreexpresión de ACE2 y TMPRSS2 en las células de tejido pulmonar, facilitando el proceso de infección.

### 1.3 EVOLUCIÓN

La región del genoma del virus que codifica para la proteína Spike es la que más tasa de mutación presenta. De éstas, las mutaciones que le otorgan al SARS-CoV-2 algún tipo de ventaja permanecen dando lugar a diferentes variantes del virus.

La proteína Spike se emplea como diana inmunológica, por lo que estas mutaciones también le permiten evadir los anticuerpos neutralizantes formados frente a ella (9).

Se ha demostrado que las mutaciones provocan una mejora en la unión entre el virus y el receptor ACE2 y/o que adquiriera la capacidad de escapar del sistema inmune <sup>(15)</sup>. Las mutaciones que se producen en el RBD, como la N501Y, proporcionan ventajas tanto en la evasión del sistema inmune, como en la interacción con la célula huésped. Las variaciones en el extremo N-terminal, altamente expuesto y con alto carácter inmunogénico, como las deleciones H69-V70, provocan un cambio conformacional en la proteína, que hacen que disminuyan la efectividad de los anticuerpos neutralizantes. Si la mutación se produce en el sitio de escisión entre las dos subunidades de la proteína, como la P681H, puede afectar a la transmisibilidad del virus <sup>(16,17)</sup>.

En “Microbioun” <sup>(18)</sup> se muestra la evolución de las variantes en base a las mutaciones. Podemos observar que existe una mutación clave en las líneas presentes en la actualidad, la D614G, que aumenta la estabilidad del homotrímero S, proporcionándole una conformación más abierta y una mayor exposición de los tres RBD <sup>(19)</sup> gracias al aumento de la eficiencia en la activación de la proteína Spike por la acción de TMPRSS2. Además, aumenta la inmunogenicidad, por lo que esta mutación se podría emplear como futura diana de vacunas <sup>(18)</sup>.

En enero de 2021 las variantes más importantes eran B.1.1.7, Alpha, (Reino Unido), B.1.351 (Sudáfrica), P1 (Brasil), la B.1.526 (Nueva York) y la CAL.20C/B.1.429(California) <sup>(20,21)</sup>. En mayo surgió una nueva variante en India (B.1.617), Delta, que presentaba 3 mutaciones importantes. L452R y E484Q aumentan la estabilidad y las interacciones de las cadenas de la proteína Spike, aumentan la capacidad de replicación, afectan a la interacción con los anticuerpos y son capaz de evadir la inmunidad celular (HLA) a antígeno. P681R aumenta la capacidad de invasión, lo que provocó su rápida extensión en un periodo corto de tiempo <sup>(15,22)</sup>.

En el momento en que se desarrolló este trabajo, la variante predominante era la B.1.1.529, omicron (Sudafrica) en especial B.4 y B.5. Esta nueva variante acumula más de 50 mutaciones, de las cuales 32 se encuentran en la secuencia que codifica para la proteína S y solo 8 en la secuencia que codifica para la proteína N. Las mutaciones se relacionaron con un posible escape inmunológico y un posible aumento de la transmisibilidad <sup>(23)</sup>.

#### 1.4 DIAGNÓSTICO

Como ya se ha expuesto, uno de los métodos de detección de SARS-CoV-2 más empleados está basado en la técnica qRT-PCR, la cual requiere una extracción previa del ARN del virus de una muestra biológica.

La PCR se basa en la reacción en cadena de la polimerasa, replicando exponencialmente la cadena de ácido nucleico en cada ciclo de amplificación. Al ser el SARS-CoV-2 un virus ARN, es necesario llevar a cabo un paso previo de retrotranscripción, que permita transcribir el ARN en ADNc (ADN complementario) y a partir de éste, poder realizar la amplificación de la secuencia diana, produciéndose ambas reacciones en el mismo pocillo. En cada ciclo de amplificación, las sondas liberan fluorescencia proporcional a la cantidad de ARN generado, obteniendo una curva al finalizar la reacción.

El ciclo a partir del cual el nivel de fluorescencia supera la línea de umbral establecida, se le denomina Ct (en inglés, Cycle threshold) y se emplea como medición relativa de la concentración del ácido nucleico presente.

La toma de muestra se puede realizar mediante frotis nasofaríngeo, orofaríngeo y nasal, con un hisopo, el cual debe conservar la muestra en condiciones óptimas hasta su procesamiento en el laboratorio. Para ello, se emplean medios específicos que permiten su conservación durante el transporte y almacenamiento, con el fin de evitar la degradación del material genético.

A día de hoy, la mayoría de las soluciones comerciales, conocidas como “Viral Transport media” (VTM), no son capaces de inactivar el virus, lo que implica que la muestra sigue siendo infectiva. Por tanto, son necesarias dos disoluciones en los pasos previos al diagnóstico molecular del SARS-CoV-2, por un lado, una disolución de transporte de la muestra clínica (VTM) que aporte estabilidad y, por otro lado, una disolución para la inactivación de la muestra infecciosa.

Esto requiere de equipos y laboratorios especializados para su procesamiento, evitando de este modo que el personal de laboratorio sufra el riesgo de contagiarse.

### **1.5 Proyecto colaboración- Valle de la muerte.**

A raíz de la problemática expuesta, el Grupo de Genética de Micobacterias (GGM) de la Universidad de Zaragoza, y la empresa CerTest Biotec, solicitaron el proyecto “Valle de la muerte”, el cual fue aprobado el 29 de julio de 2020.

Este proyecto se basa en el desarrollo de un medio alternativo de inactivación y transporte (Medio IT) para muestras clínicas procedentes de pacientes con sospecha de infección por SARS-CoV-2, con el que se pretende acelerar y mejorar la trazabilidad del diagnóstico y aumentar la seguridad del personal sanitario, así como facilitar el escalado y una producción económica del mismo.

Al inicio de la pandemia y ante la elevada demanda y escasez de reactivos comerciales asociados a pruebas de PCR, desde el grupo GGM de la Universidad de Zaragoza, se propuso al Hospital Universitario Miguel Servet (HUMS) emplear un medio de transporte alternativo para la toma de muestras respiratorias procedentes de pacientes con sospecha de infección por SARS-CoV-2. Entre el GGM y el HUMS se comprobó que la formulación del medio utilizado para la extracción de ARN de micobacterias podía utilizarse como medio de transporte, demostrando resultados robustos con muestras clínicas respiratorias de pacientes covid-19 positivos. Sin embargo, su composición es más compleja que la necesaria para SARS-CoV-2, y, por tanto, requiere una optimización que garantice la integridad del material genético del virus, de forma que aumente la seguridad y la rapidez del procesado de muestras sin comprometer el funcionamiento de los test moleculares empleados en el diagnóstico de este virus.

## **2 OBJETIVOS**

El objetivo final de este trabajo fin de grado es analizar diferentes formulaciones para el análisis de SARS-CoV-2 a partir de muestras respiratorias que permitan; un transporte estable, biológicamente seguro, económico y escalable.

Para abordar este objetivo, se plantean tres partes a trabajar:

1. Documentación técnica
  1. Planificar, definir y redactar el proyecto.
  2. Aprobación del trabajo por parte del CEICA.



2. Desarrollo de formulaciones como medio IT:
  1. Obtener una fórmula de transporte de virus más simple.
  2. Reducir costes en la producción del Kit de diagnóstico.
3. Estudio de las muestras biológicas en las formulaciones desarrolladas:
  1. Obtener una solución inactivante para el SARS-CoV-2 que mantenga intacto su ácido nucleico.
  2. Estudiar la posibilidad de modificar el paso de lisis, previo a la extracción del ARN.

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

Para poder evaluar el funcionamiento de las formulaciones propuestas, ha sido necesario realizar una toma de muestra de pacientes covid-19 positivo empleando las diferentes fórmulas de medio de transporte, analizándose de forma simultánea con el medio de transporte utilizado de forma rutinaria en el hospital.

Por tanto, para poder llevar a cabo este estudio, ha sido necesario la aprobación previa del trabajo por parte del CEICA, con el fin de obtener las muestras necesarias tras su previa anonimización por parte de Biobanco del Sistema de Salud de Aragón (BSSA).

Para estudiar la estabilidad del Ácido Nucleico, empleando cada una de las fórmulas desarrolladas, se llevará a cabo la técnica qRT-PCR para cada una de las muestras.

#### 3.1 Estudio prospectivo

De forma rutinaria en la planta COVID del Hospital Royo Villanova, se realiza un seguimiento del estado de los pacientes covid-19 positivos con PCR mediante la toma de muestra diaria. Tras la aprobación del proyecto por parte del CEICA, se solicitó la colaboración de 25 voluntarios diagnosticados de covid-19.

Para ello, se hizo preciso la firma del consentimiento informado en el que se especificaban los criterios de inclusión en el estudio, que consistieron en:

- Pacientes mayores de edad, con plena capacidad de leer y comprender tal consentimiento informado, ingresados en planta COVID y con diagnóstico positivo de SARS-CoV-2.

#### 3.2 Fórmulas desarrolladas

Como podemos observar en la siguiente tabla, se prepararon cinco soluciones modificando alguno de los componentes del Medio IT.

Tabla 1. Composición de las diferentes formulaciones desarrolladas. (X: presencia; -: ausencia).

Reactivos	Medio	Fórmula	Fórmula	Fórmula	Fórmula
	IT	1	2	3	4
Tiocianato de Guanidinio	x	x	x	x	x
Citrato de sodio	x	x	x	x	x
H2O DEPC	x	x	x	x	x
$\beta$ -Mercaptoetanol	x	-	-	-	-
N-Lauryl-Sarcosina	x	x	-	x	-
Tween 80	x	x	x	-	-
Tritón X-100	-	-	-	-	x

De cada una de estas soluciones se prepararon 100 mL. En todas ellas las concentraciones de los diferentes componentes fueron las mismas; Tiocianato de Guanidinio a 4 M, Citrato de Sodio a 250 mM,  $\beta$ -Mercaptoetanol a 0,1 M, N-Lauryl-Sarcosina a 0,5% p/v, Tween-80 a 0,5% v/v y Tritón X-100 a 5% v/v.

Se enrasó a volumen final con el Agua DEPC necesaria en cada caso y se almacenaron a 4°C. Se dispensaron 2,0 mL de cada una en los viales de recogida de muestra para ser empleadas en el Hospital Royo Villanova.

### **3.3 Toma de muestra nasofaríngea**

Tal como describe el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) <sup>(24)</sup>, la toma de muestra nasofaríngea debe realizarse con un hisopo estéril durante los tres primeros días de presentación de síntomas, y debe introducirse en un vial con 2,0 mL del medio de transporte viral sin antibióticos. Además, si el análisis no va a realizarse en las primeras 48h desde la obtención de la muestra, debe conservarse congelado a una temperatura  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ .

Siguiendo estas indicaciones, el servicio de neumología del hospital Royo Villanova realizó la toma de muestra a los pacientes incluidos en este estudio.

Se obtuvieron un total de dos hisopos por paciente, el primero se recogió empleando el medio de transporte de rutina del hospital (A) y el segundo utilizando las diferentes fórmulas desarrolladas (B). Estas muestras se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta que se llevó a cabo su procesamiento.

### **3.4 Extracción de los ácidos nucleicos**

Para la extracción de las muestras se empleó el Kit de Extracción “*Viasure RNA-DNA Extraction Kit*” siguiendo las indicaciones del fabricante (CerTest Biotec). En este protocolo hay un primer paso de lisis celular y un segundo paso de purificación del ácido nucleico.

Tras añadir la cantidad necesaria de etanol e isopropanol a los componentes del Kit que lo requerían, se preparó la solución de lisis, para la cual se añadieron 2,1 mL de *Lysis buffer*, 210  $\mu\text{L}$  de un *Carrier* de ARN y 210  $\mu\text{L}$  de Proteinasa K.

Para la primera etapa de lisis celular, se mantuvo el protocolo del fabricante en el Hisopo A y a partir del Hisopo B se llevaron a cabo tres protocolos:

Hisopo A: se siguió el protocolo marcado por el fabricante, añadiendo 240  $\mu\text{L}$  de la solución de *Lysis buffer* recién preparada, y 200  $\mu\text{L}$  de la muestra, a un tubo colector de 2,0 mL.

Hisopo B: se realizaron tres protocolos diferentes.

B.1: se siguió el protocolo marcado por el fabricante, añadiendo 240  $\mu\text{L}$  de la solución de *Lysis buffer* recién preparada, y 200  $\mu\text{L}$  de la muestra, a un tubo colector de 2,0 mL.

B.2: se añadieron 240  $\mu\text{L}$  de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) y 200  $\mu\text{L}$  de la muestra, a un tubo colector de 2,0 mL.

B.3: se añadieron 400  $\mu\text{L}$  de la muestra a un tubo colector de 2,0 mL.

De forma que se obtuvieron cuatro muestras de cada sujeto, una a partir del Hisopo A y tres a partir del Hisopo B.

Evaluación de diferentes fórmulas de medio de transporte viral para uso en SARS-CoV-2.

Para la purificación del ARN se siguió en todos los casos el protocolo indicado por fabricante.

- Tras homogeneizar con ayuda de un vortex, se somete a las muestras a dos ciclos de 10 minutos de calor, el primero a 65°C y el segundo a 95°C.
- Al finalizar se añade a cada tubo 260 µL de “*Binding buffer*”, se homogeneiza de nuevo con ayuda del vortex y se incuba a T° ambiente durante 5 minutos. Cada muestra se transfiere a una columna “*Mini Spin Column*” sin tocar la membrana y se centrifuga un minuto a 11.100 x g.
- La columna se transfiere a otro tubo colector y se añaden 600 µL del “*Wash buffer I*”. Se repite el proceso y tras centrifugar, se coloca la columna en un tubo colector nuevo, en el que se añaden 700 µL de “*Wash buffer II*” y se vuelve a centrifugar. Este paso se repite dos veces. La segunda centrifugación se realiza a 11,100 x g durante cinco minutos.
- La columna se transfiere a un tubo eppendorf de 1,5 mL y se añaden 200 µL de “*Elution buffer*” precalentado a 65°C. Tras incubar 1 minuto se centrifuga de nuevo y, en este caso, se descarta la columna. El tubo eppendorf de 1,5 mL con el ARN extraído se guarda a -80°C.

Al final del proceso, se obtuvieron 4 extracciones de cada sujeto (A, B1, B2 y B3), es decir, un total de 100 extracciones.

### **3.5 Diagnóstico molecular mediante RT-PCR**

La retrotranscripción del ARN y la amplificación del ADNc, se realiza en un solo paso con el kit comercial “*VIASURE Real Time PCR detection*” proporcionado por CerTest Biotec. Este kit emplea oligonucleótidos específicos y sondas marcadas con fluorescencia que hibridan con una región diana conservada de los genes ORF1ab y N. Además, contiene un control interno para verificar la posible inhibición de la ADN polimerasa durante el proceso.

Durante la reacción de amplificación, este producto aprovecha la actividad 5' exonucleasa de la ADN polimerasa para hidrolizar la sonda unida a la secuencia de ADNc separando el fluoróforo del *quencher*. De esta manera se libera una señal de fluorescencia proporcional a la cantidad de ADNc y, por tanto, a la cantidad de ARN de SARS-Cov-2 presente en la muestra.

La secuencia de los cebadores utilizados para la reacción de amplificación es la recomendada por el CDC <sup>(25)</sup>:

#### Target 1 (ORF1ab)

Cebador directo: 5'-CCCTGTGGGTTTTACTTAA-3'

Cebador reverso: 5'-ACGATTGTGCATCAGCTGA-3'

Sonda Taqman: 5'-FAM-CCGTCTGCGGTATAGTGGAAGGTTATGG-BHQ1 -3'

#### Target 2 (Gen N)

Cebador directo: 5'-GGGGAAGTTCTCCTGCTAGAAT-3'

Cebador reverso: 5'-CAGACATTTTGCTCTCAAGCTG-3'

Sonda Taqman: 5'-ROX-TTGCTGCTGCTTGACAGATT-TAMRA-3'

No se muestran las secuencias de los cebadores ni de la sonda del control interno ya que están protegidas por propiedad industrial.

La detección del ARN de las muestras se realizó por duplicado. Cada pocillo se rehidrató con 15 µL de tampón de rehidratación y se añadieron 5 µL de muestra, previamente descongelada en hielo. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo incluyendo controles positivos y negativos.

El control positivo del producto se suministra liofilizado, por lo que se reconstituyó con 100 µL de agua libre de RNAsa/DNAsa. Para no contaminar las muestras se trabajó dentro de una cabina de extracción.

Una vez añadidas todas las muestras, se centrifugaron 30 segundos y se introdujeron las tiras de pocillos en el termociclador StepOne plus. El programa utilizado para la amplificación (Tabla 2) consistió en 15 minutos a 45°C como etapa de retrotranscripción, dos minutos a 95°C para realizar una desnaturalización inicial y 45 ciclos de desnaturalización (10 segundos a 95°C), hibridación y elongación (50 segundos a 60°C).

Tabla 2. Programa empleado para amplificar las muestras en el termociclador StepOne plus

Nº Ciclos	Etapa	Tiempo	Temperatura
1	Retrotranscripción	15 min	45 °C
1	Desnaturalización inicial	2 min	95°C
45	Desnaturalización	10 seg	95°C
	Hibridación/Elongación (lectura de fluorescencia)	50 seg	60°C

Tras la reacción de amplificación en cada ciclo, se realiza la lectura de la fluorescencia en cada uno de los canales; el gen ORF1ab se detecta en el canal FAM, el gen N se detecta en el canal ROX, y el control interno en el canal VIC. El ciclo a partir del cual se empieza a detectar el nivel de fluorescencia por encima del ruido del fondo, y que nos indica la presencia de ARN del virus en la muestra, se denomina ciclo umbral (en inglés, Ct, cycle threshold).

En la Figura 4 se muestra un esquema del procedimiento llevado a cabo desde la selección de los pacientes hasta la obtención del ARN del SARS-CoV-2 en las muestras obtenidas. En la imagen de la izquierda (1), se muestra el estudio prospectivo, la selección de 25 pacientes positivos de covid-19 y como estos se distribuyen entre las diferentes fórmulas. Arriba a la derecha (2), vemos como de cada individuo se obtienen dos hisopos, y como cada uno de estos se guarda en un frasco con soluciones diferentes, la solución control (Hospital) y a una de nuestras fórmulas, en este caso el medio IT.

En la parte de abajo (3), se muestra el proceso seguido en la toma de muestra y en las extracciones de ARN en un sujeto.

Las diferentes formulaciones están asociadas a un color, que se mantiene durante toda la representación de los resultados, al igual que las diferentes tonalidades de las 4 extracciones de cada paciente.

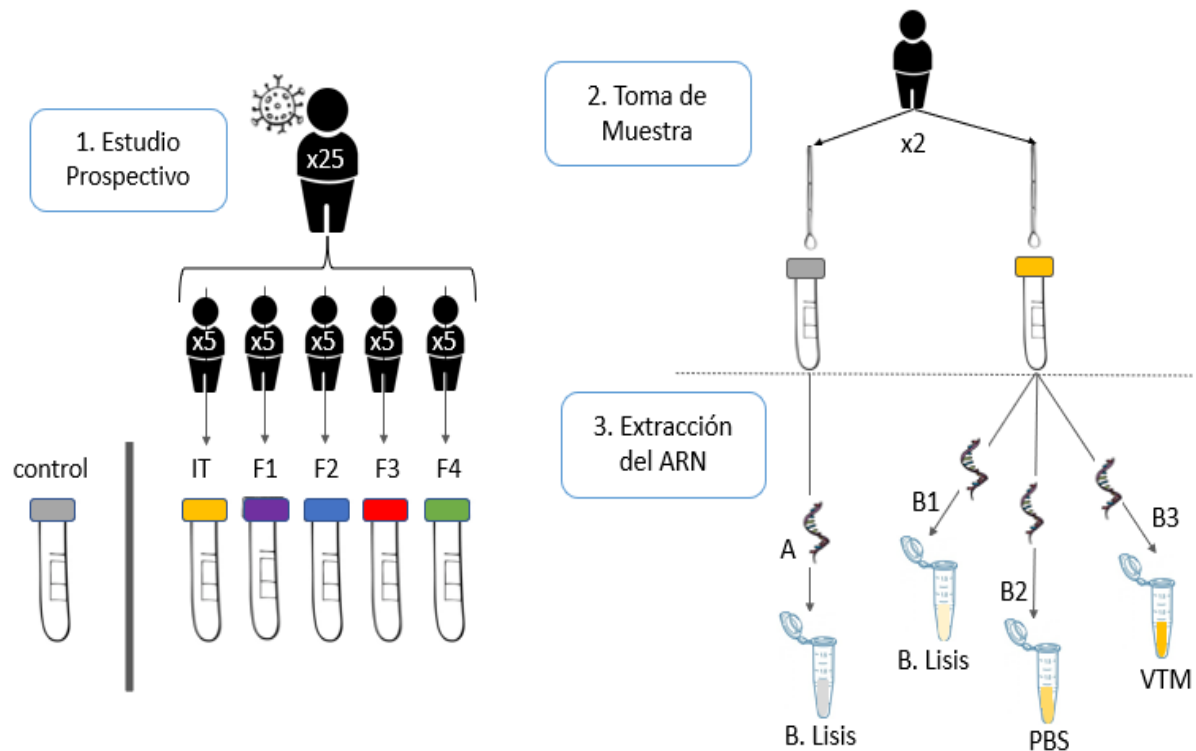


Figura 4. Esquema del procedimiento llevado a cabo desde la selección de los sujetos a estudio hasta la extracción del ARN de las muestras.

### 3.6 Análisis y tratamiento de los datos

Los datos fueron agrupados en las diferentes formulaciones, comparando los valores Ct obtenidos. Para cada sujeto, los datos de la muestra A nos sirven como control, los datos de la muestra B1 nos permiten comparar la fórmula desarrollada con la empleada en el hospital (muestra A).

Los resultados de las muestras B2 y B3, nos permiten comprobar si la modificación del paso de lisis durante la extracción del ARN tiene algún efecto sobre la amplificación de éste en la PCR, comparando con los resultados de B1.

Esta comparación se ha realizado mediante la representación de los valores de los Cts del gen control interno, el gen N y el gen ORF1ab y mediante su análisis estadístico utilizando un “Heat Map (mapa de calor)”.

Además, se evaluó la forma de la curva de amplificación, así como los niveles de fluorescencia para cada una de las dianas amplificadas, con el fin de confirmar el correcto funcionamiento de la PCR.

## 4 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este proyecto de investigación surgió de una necesidad existente, la falta de medios de transporte viral (VTM) inactivantes y la escasez de reactivos, durante la pandemia provocada por el SARS-CoV-2. Para poder llevarlo a cabo, era imprescindible el trabajo con muestras biológicas de personas infectadas con este virus.

Debido a esto, fue necesario la aprobación del proyecto por parte CEICA, y la colaboración del Biobanco del Sistema de Salud de Aragón (BSSA) para la cesión y anonimización de las muestras.

En la Figura 5 se recogen los pasos realizados para llegar a cabo este estudio. Se muestra una línea temporal de las etapas y los logos de todas las entidades implicadas en él. Los diferentes colores expuestos en la escala nos ayudan a diferenciar las diferentes etapas: En gris se observan las etapas previas a la aprobación por parte de la Garantía del grado de Biotecnología de la propuesta de trabajo como TFG, en azul las reuniones más importantes que se llevaron a cabo, en amarillo la parte experimental en los laboratorios del Grupo de Genética de Micobacterias, en rojo todos los pasos relacionados con la escritura, presentación y aprobación del proyecto por el CEICA, y en verde la toma y anonimización de muestras.



Figura 5. Línea temporal de las etapas llevadas a cabo en este trabajo y los logos de todas las entidades implicadas en él.

## 5 RESULTADOS

En el presente trabajo, se propone la idea de desarrollar una fórmula capaz de actuar como medio de transporte y medio de inactivación para SARS-CoV-2, por lo que de cada paciente se obtuvieron dos hisopos; A con el VTM empleado de forma rutinaria en el hospital y B con una de las fórmulas desarrolladas a estudio. A la hora de extraer el ARN de las muestras, se planteó que, si la fórmula desarrollada tenía capacidad de lisar las partículas virales, no sería necesario realizar una lisis inicial en el proceso de extracción del ácido nucleico, por ello, se tuvieron en cuenta tres procesos diferentes.

Para la muestra B1 (hisopo B) se hizo el paso con *Lysis Buffer*, siguiendo las instrucciones del fabricante (CerTest Biotec). De esta manera, se parte de un control frente a la amplificación de la muestra obtenida del hisopo A, así como frente al resto de variaciones propuestas.

En el caso de la muestra B2 (hisopo B), se eliminó la solución de *Lysis buffer* manteniéndose el volumen de muestra inicial que se emplea en la extracción. Por ello, se añadió el mismo volumen de PBS que el que se emplea de *Lysis buffer* para el hisopo B1. En la muestra B3 (hisopo B), se empleó únicamente la muestra como material de partida, por lo que fue necesario duplicar el volumen de ésta. De esta manera, se evalúa la posibilidad de no diluir la muestra, pudiendo emplear la muestra directamente.

El resto de procedimientos fue común para las 4 extracciones en las 5 formulaciones.

### 5.1 Formulas desarrolladas

Para el diseño de estas formulaciones se partió de la composición del medio IT para micobacterias, descartando algunos de los reactivos y simplificando su composición, con el fin de optimizar este medio y mantener la concentración en la solución final de cada uno de los componentes empleados en cada formulación. En la tabla 1 (apartado 3.2) se muestra la composición del medio IT y las cuatro formulaciones desarrolladas a partir de éste. El Tiocianato de Guanidinio, el Citrato de Sodio y el Agua DEPC están presentes en todas las fórmulas. Se ha descrito que la sola presencia de Guanidinio ya es suficiente para inactivar el virus <sup>(26)</sup>, ya que es un agente caotrópico capaz de desnaturalizar proteínas, lo que le convierte en un buen componente para lisar células e inactivar virus <sup>(27,28)</sup>, además, durante la extracción de ARN y ADN, evita que actúen ADNasas y la ARNasa, conservando el ácido nucleico. El Citrato de Sodio se emplea como tampón y anticoagulante, evitando la ionización del calcio; además, dado su efecto quelante, reduce la hidrólisis del ARN.

El  $\beta$ -Mercaptoetanol es un agente reductor de puente disulfuros que provoca el despliegue y desestructuración proteica. En extracciones de Ácido ribonucleico (ARN) actúa sobre las ribonucleasas, evitando la degradación de éste. Por tanto, al usar Tiocianato de Guanidinio, no es necesario el empleo de  $\beta$ -Mercaptoetanol.

En cuanto a los surfactantes; se realizaron diferentes combinaciones; la N-Lauryl-Sarcosina es un surfactante aniónico que rompe los enlaces no covalentes de las proteínas, haciendo que estas se desnaturalicen y pierdan su conformación nativa.

El Tween-80 y el Tritón X-100 son detergentes, tensioactivos no iónicos, que disuelven las grasas mediante la formación de micelas. La diferencia entre ellos es que el tritón tiene un carácter lipofílico mayor que el Tween y, por tanto, es capaz de disociar más cantidad de membrana celular (más fuerte). Todos ellos provocan una desestabilización y rotura de la membrana celular y la envoltura lipídica del virus, provocando su lisis <sup>(29)</sup>.

Se espera que las formulaciones de composición más sencillas, mantengan el ARN estable sin que sufra degradación, de manera que, tras su amplificación en la PCR, el valor Ct al que se detecte sea igual o mejor al obtenido con el control.

A sí mismo, al introducir tiocianato de guanidinio se espera que todas las soluciones sean capaces de inactivar el SARS-CoV-2, aunque esta comprobación no se ha llevado a cabo en este Trabajo de Fin de Grado.

### 5.2 Valores Cts obtenidos

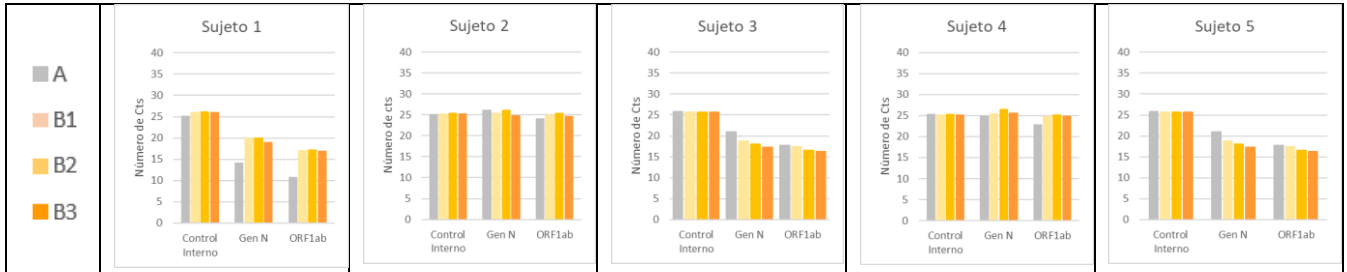
Para facilitar la comprensión de la representación de los resultados, se ha seguido el esquema de colores de la figura 5, siendo:

- Medio completo (IT): Naranja.
- Formulación 1: Sarcosina + Tween 80: Morado.
- Formulación 2: Tween 80: Azul.
- Formulación 3: Sarcosina: Rojo.
- Formulación 4: Tritón X-100: Verde.

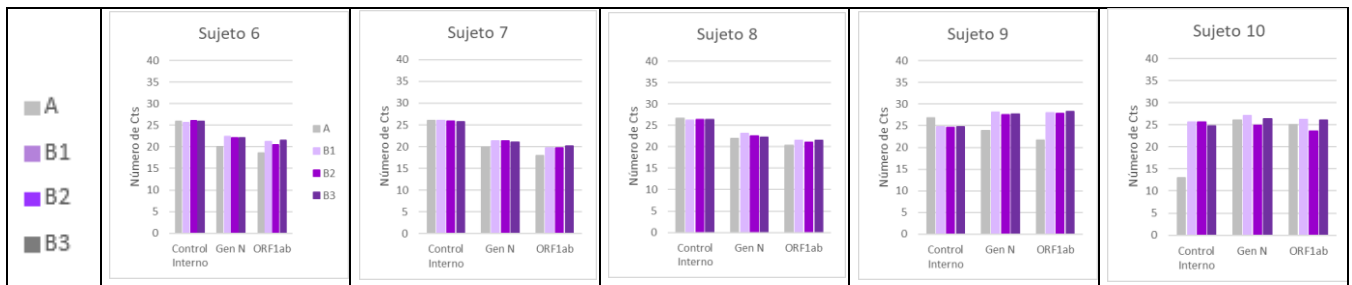
A su vez, en todas ellas, los datos pertenecientes al control (muestra A) se muestran en gris. Las diferentes variantes introducidas en el paso de lisis celular se muestran en diferentes intensidades del color, siendo la más clara la muestra B1, la intermedia la B2

y la más intensa la perteneciente a la B3.

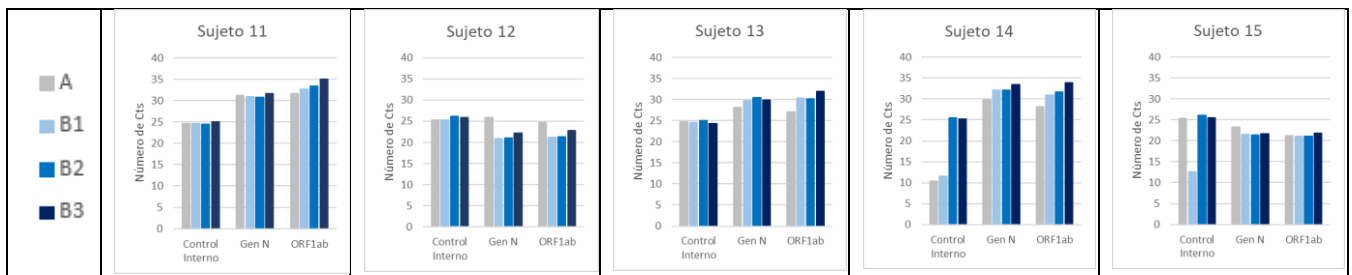
En las siguientes gráficas se han representado los datos obtenidos de los valores Ct, (*Anexo 2*), en las que se muestran el valor Ct (eje Y) en el que han amplificado cada gen en cada una de las muestras (A-B3) en diferentes colores (eje X). Se han dispuesto en cinco bloques, en función de la formulación desarrollada empleada como VTM en el hisopo B.



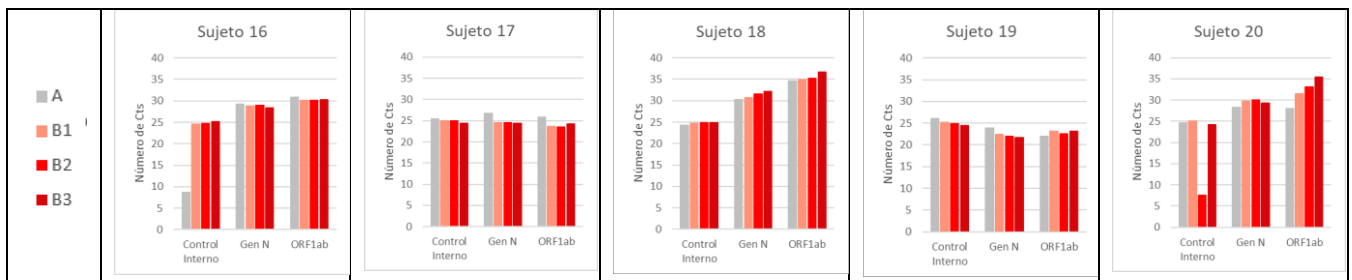
Gráficas 1. Se empleó el Medio IT como VTM.



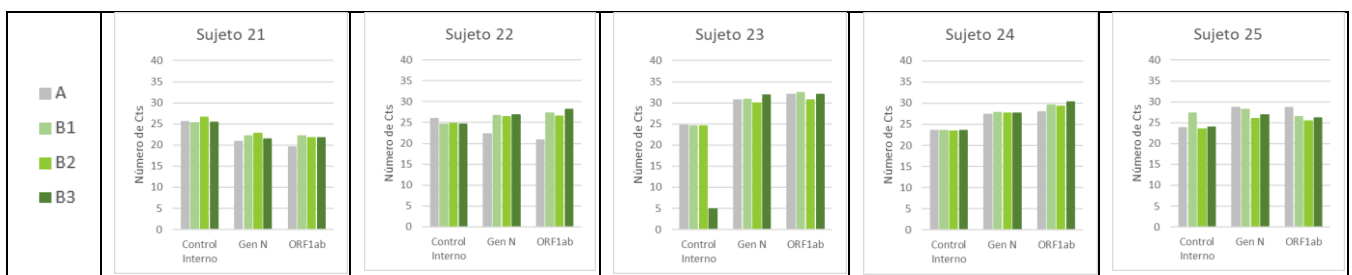
Gráficas 2. Se empleó la Fórmula 1 como VTM



Gráficas 3. Se empleó la Fórmula 2 como VTM



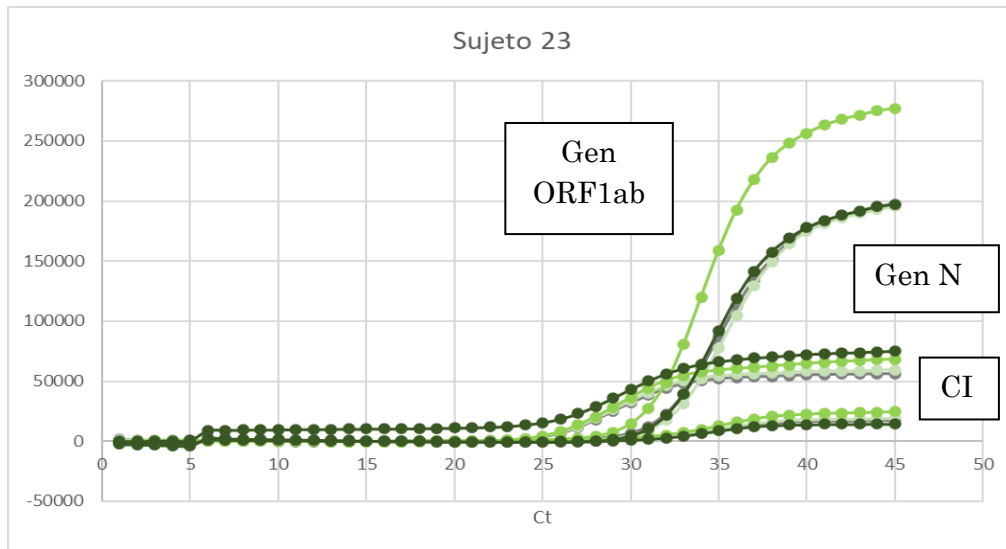
Gráficas 4. Se empleó la Fórmula 3 como VTM



Gráficas 5. Se empleó la Fórmula 4 como VTM



En algunas de las gráficas observamos que el valor para alguna de las dianas presenta un valor inferior a 13; esto puede ser debido a la presencia de algún artefacto o burbuja que emite una fluorescencia elevada y por tanto proporciona un valor Ct inferior al real; sin embargo, no se observa diferencia cuando se representan las curvas de amplificación, pudiéndose considerar como positivas (*Anexo 1*). A continuación, se muestra una de las gráficas como ejemplo (Gráfica 6).



Gráficas 6. Curva de amplificación con la formulación cuatro.

La Gráfica 6 corresponde a una muestra en la formulación cuatro. Los diferentes genes amplificados se muestran en color verde, siguiendo el esquema de colores dispuesto a lo largo del presente trabajo. A la altura del ciclo 5, se observa un ligero aumento de la fluorescencia que no corresponde con una amplificación real, si bien proporciona un valor Ct inferior al representado por las curvas de amplificación.

### 5.3 Estudio estadístico

Al ser una muestra de cada paciente y en medios de transporte diferentes no se ha podido hacer un estudio estadístico; sin embargo, se ha realizado un *Heat Map* que permite visualizar los datos de una forma más visual. A continuación (Tabla 3), se muestra la diferencia del número de Cts del control (hisopo A) para cada uno de los genes en las diferentes extracciones del hisopo B.

En rojo se representa el atraso del valor Ct, mientras que en verde se representa el adelanto.

Tabla 3. Se muestra la diferencia de Cts obtenidas entre las muestras procedentes del hisopo B frente a la muestra control.

Medio IT	Sujeto 1			Sujeto 2			Sujeto 3			Sujeto 4			Sujeto 5		
	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab
Delta B1	-1	-6	-6	0	1	-1	0	0	-4	0	-1	-2	0	2	0
Delta B2	-1	-6	-6	0	0	-1	0	-1	-3	0	-2	-2	0	3	1
Delta B3	-1	-5	-6	0	1	-1	0	-1	-5	0	-1	-2	0	4	2

Fórmula 1	Sujeto 6			Sujeto 7			Sujeto 8			Sujeto 9			Sujeto 10		
	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab
Delta B1	0	-2	-3	0	-1	-2	0	-1	-1	2	-4	-6	-12	-1	-1
Delta B2	0	-2	-2	0	-2	-2	0	0	-1	2	-4	-6	-13	1	1
Delta B3	0	-2	-3	0	-1	-2	0	0	-1	2	-4	-7	-12	0	-1

Fórmula 2	Sujeto 11			Sujeto 12			Sujeto 13			Sujeto 14			Sujeto 15		
	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab
Delta B1	0	0	-1	0	5	3	0	-2	-3	-1	-2	-3	13	2	0
Delta B2	0	0	-2	-1	5	3	0	-2	-3	-15	-2	-4	-1	2	0
Delta B3	0	-1	-3	-1	4	2	0	-2	-5	-15	-4	-6	0	2	-1

Fórmula 3	Sujeto 16			Sujeto 17			Sujeto 18			Sujeto 19			Sujeto 20		
	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab
Delta B1	-16	0	1	0	2	2	-1	0	0	1	1	-1	0	-2	-3
Delta B2	-16	0	1	0	2	2	-1	-1	-1	1	2	-1	17	-2	-5
Delta B3	-16	1	1	1	2	2	-1	-2	-2	2	2	-1	0	-1	-7

Fórmula 4	Sujeto 21			Sujeto 22			Sujeto 23			Sujeto 24			Sujeto 25		
	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab
Delta B1	0	-1	-3	1	-4	-6	0	0	0	0	0	-2	-3	0	2
Delta B2	-1	-2	-2	1	-4	-6	0	1	1	0	0	-1	0	3	3
Delta B3	0	-1	-2	1	-5	-7	20	-1	0	0	0	-2	0	2	2

### 5.3.1 Control interno:

A continuación, se discuten los resultados obtenidos para el control interno en cada una de las muestras testadas, aportando información relacionada con la inhibición de la reacción.

- 1 Medio IT: en los sujetos 2-5 se obtienen valores de Cts comprendidos entre 25 y 26. Solo en el caso del sujeto 1 se obtiene un valor para de 25 para A y de 26 para B.1. Estos resultados confirman que el Medio IT es comparable con el medio de rutina del hospital en cuanto a términos de inhibición.
- 2 Fórmula 1: en los sujetos 6-8 se mantiene el número de Ct en ambas fórmulas. En el caso del sujeto 9 se observa un adelanto en el valor de Ct de 2 unidades.
- 3 Fórmula 2: en los sujetos 11-13 se mantiene el número de Cts.
- 4 Fórmula 3: en los sujetos 17,18 y 20 se mantiene el número de Cts , en el sujeto 19 se observa un adelanto de 1 Ct.
- 5 Fórmula 4: para los sujetos 21, 23 y 24 se mantienen el número de Cts, el 22 mejora en 2 Ct y el 25 empeora en 3 Cts.

En el caso de los sujetos 10, 14, 15 y 16 el valor del Ct obtenido es inferior al esperado. A la hora de evaluar la forma de la curva, así como los niveles de fluorescencia, se aprecia la presencia de un artefacto que atraviesa el valor de Ct en un ciclo inferior al que corresponde, sin embargo, el aspecto de la curva, así como los niveles de fluorescencia son equiparables al resto de las muestras por lo que es posible que se trate de una burbuja. A la vista de estos resultados, podemos considerar que el sujeto 10 presenta valores de Ct normales para el control interno.

A excepción del sujeto 10, todas las curvas de amplificación mostraron forma sigmoidea y valores de fluorescencia en torno a  $5,00 \times 10^4$  unidades de fluorescencia.

### 5.3.2 Genes Diana (orf1ab & Gen N):

A continuación, se discuten los resultados obtenidos para los genes diana del SARS-CoV-2 en cada una de las muestras testadas, aportando información relacionada con la degradación del ARN.

1. Medio IT: el sujeto 5 presenta una mejora de hasta 4 Cts, sin embargo, los sujetos 3 y 4 muestran un aumento considerado en el número de Cts del gen orflab.
2. Fórmula 1: los Cts de los dos genes amplificados del virus (N y orflab) presentan un aumento de 1 o 2 Cts, siendo en los sujetos 6 y 9 en los que más diferencia se aprecia.
3. Fórmula 2: es la fórmula que presenta los valores de Ct más elevado para las dos dianas estudiadas.
4. Fórmula 3: los Cts de los genes N y orflab se mantienen igual que en el control o se mejoran, excepto para el sujeto 20 el cual presenta un retraso de 1 Ct en la amplificación.
5. Fórmula 4: esta fórmula no sigue un patrón en los resultados. En el caso del sujeto 22 hay un aumento de entre 4 y 7 Cts, sin embargo, el sujeto 25 tiene una mejora de hasta 3 Cts en ambos genes.

En el caso del sujeto 1 el valor del Ct obtenido en la muestra control A, es inferior al esperado. A la hora de evaluar la forma de la curva, así como los niveles de fluorescencia, se aprecia la presencia de un artefacto que atraviesa el valor Ct en un ciclo inferior al que corresponde, sin embargo, el aspecto de la curva, así como los niveles de fluorescencia son equiparables al resto de las muestras por lo que es posible que se trate de una burbuja.

El aspecto de las curvas de amplificación fue el esperado en todos los casos observándose valores de fluorescencia entre  $2,00 \times 10^4$  y  $4,00 \times 10^4$  unidades de fluorescencia para la diana orflab y en torno a  $2,00 \times 10^4$  unidades de fluorescencia para el gen N. En todos los casos se observó amplificación sigmoidea.

## 6 DISCUSION

### 6.1 Formulas

A la vista de los resultados no se observan diferencias en los valores de Cts correspondiente al control interno, así como formas o niveles de fluorescencia anómalos y, por tanto, podemos concluir que ninguna de las fórmulas inhibe la reacción de amplificación.

### 6.2 Valor del Ct

- Cambio de VTM comparamos Cts entre A y B.1:

Los resultados obtenidos entre el control (A) y cada una de las fórmulas con la muestra B1 son similares.

Además, no se observan diferencias en los valores de Cts correspondiente para ninguna de las dianas, así como formas o niveles de fluorescencia anómalos y por tanto podemos concluir que todas las fórmulas mantienen estable el ARN del virus y ninguna de ellas inhibe la reacción de amplificación.

De todas ellas, la tercera fórmula presentó los mejores resultados si bien, la fórmula 2 y 4 también se consideran óptimas para el propósito.

Cabe destacar que la formulación 2 es más económica y por tanto podría considerarse una buena alternativa frente a la formulación 3.

Los datos económicos se discuten posteriormente en el apartado 6.5.

- Método de extracción. Comparamos Cts entre B.1, B.2 y B.3.

Empleando tres procedimientos iniciales de extracción se han obtenido resultados similares, lo que implica que el paso de lisis celular no es necesario, y, por tanto, que el guanidinio en las fórmulas es suficiente para lisar el virus e inactivarlo.

Además, en la extracción B.3, se añade directamente VTM, sin realizar la dilución 1/2 que se realiza en el protocolo actual en el paso previo de lisis. Esto implica que, añadiendo el doble de volumen de muestra estamos obteniendo los mismos resultados que cuando la diluimos en PBS o en Lisis buffer.

Gracias a esto, se podría evitar un paso inicial y extraer el ARN directamente de la muestra del paciente, sin riesgo alguno para el operario.

Hay que tener en cuenta que el número de muestras empleado no es lo suficientemente representativo, y habría que confirmar estos resultados con un número de muestras mayor, si bien, al tratarse de resultados preliminares, esta información contribuye al diseño y elección de un VTM optimizado.

### 6.3 Variantes

Como se puede observar en la Figura 6, obtenida de la base de datos "Gisaid" <sup>(10)</sup>, las variantes predominantes en España desde diciembre de 2019 hasta marzo de 2022, periodo de tiempo en el que se llevó a cabo la recogida de muestras, eran Alpha (linajes B.1.1.7 y Q, según el CDC) y Delta (linajes B.1.617.2 y AY, según el CDC) <sup>(4)</sup> En la figura se ha resaltado una franja blanca, correspondiente al periodo entre junio y septiembre de 2021, que indica el periodo en el que tuvo lugar la recogida de muestras del estudio. Se observa que las variantes mayoritarias eran la variante Delta (amarillo) y la variante Alfa (verde).

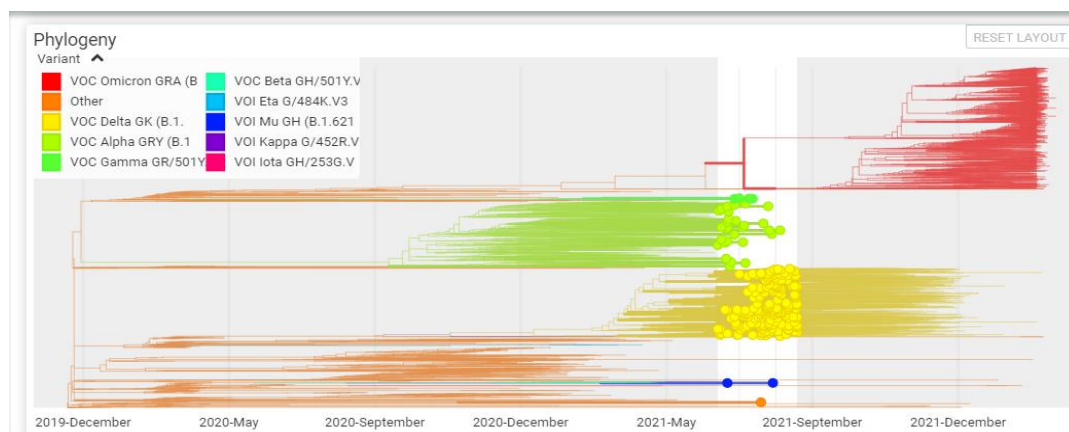


Figura 6. Variantes del virus Sars CoV-2 circulantes en el periodo Diciembre 2019- Diciembre 2021. Fuente: Base de datos Gisaid (<https://www.gisaid.org/phylogenetics/european->

En base a los estudios *in silico* realizados por el fabricante del kit de PCR (CerTest Biotec), las dianas incluidas permiten detectar ARN de SARS-CoV-2 pertenecientes a las variantes Alpha, Delta y Omicrom.

La variante Omicrom, en principio, no fue detectada en España hasta finales de noviembre, pero, si alguna de las muestras empleadas en este estudio hubiera sido positivo en covid-19 debido a esta variante, no hubiera interferido, obteniendo los mismos resultados, siendo estos extrapolables a la situación actual en la que predomina la variante Omicrom.

#### **6.4 Simplificación de pasos**

La optimización del procesado de la muestra y su tratamiento hasta la obtención del diagnóstico es un valor añadido a tener en cuenta en el diseño de la fórmula que actuará como medio de transporte e inactivante de la muestra biológica.

Los resultados obtenidos permitirían evitar el paso de lisis celular, realizando la extracción del ácido nucleico a partir del propio medio de transporte, ya que no se ha visto una diferencia significativa en los Cts obtenidos a partir de la extracción B2 y B3 (en las que se eliminó el paso de lisis previo a realizar la extracción del ARN), y el resto de extracciones, A y B1, (en las que si hubo un paso de lisis celular previo a la extracción).

Si, además, la presencia del Tiocianato de Guanidinio demuestra esta lisis celular, y, por tanto, una inactivación del virus, las muestras clínicas dejarían de ser potencialmente peligrosas, evitando riesgo de contagio en el personal en el momento de su transporte y manipulación, permitiendo además su tratamiento sin necesidad de condiciones de seguridad exigentes.

Así, se permitiría aumentar la rapidez y la seguridad en el procesado de las muestras clínicas, así como disminuir los recursos humanos y costes necesarios en su manipulación.

#### **6.5 Economía**

Tras alcanzar una eficacia biológica y una optimización del proceso, otro punto importante a tener en cuenta es el económico, puesto que hay que hacer un balance entre estos tres aspectos.

Se ha hecho una estimación económica de lo que supondría la fabricación de ambas soluciones a pequeña escala y su transferencia a una producción industrial.

En la siguiente tabla (Tabla 4), se muestra el coste estimado de cada reactivo para preparar 100 mL de cada una de las soluciones propuestas en este trabajo, y lo que supone económicamente, en base a esta estimación un volumen de 2,0 mL, que es el volumen dispensado en cada recipiente de recogida y transporte de muestra, y un volumen de 1000 litros, que correspondería a una fabricación a gran escala. de las fórmulas.

Podemos ver que, aunque la diferencia económica en base a un recipiente de recogida (2 mL) es de 1 céntimo, cuando estas soluciones se transfieren a una producción a gran escala (1000 L), la diferencia entre ellas asciende a aproximadamente 5000 €, siendo la fórmula dos la más económica. De ahí la importancia del balance entre efectividad biológica, funcionalidad productiva y costes económicos.

Tabla 1 Estimación del coste de cada formulación.

Reactivos (€/100 mL)	Medio IT	Fórmula 1	Fórmula 2	Fórmula 3	Fórmula 4
<b>Tiocianato de Guanidinio</b>	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Citrato de Sodio	5,55	5,55	5,55	5,55	5,55
<b>H2O DEPC</b>	3,68	3,68	3,68	3,68	3,68
<b>N-Lauryl-Sarcosina</b>	0,45	0,45	-	0,45	-
<b>Tween 80</b>	0,022	0,02	0,02	-	-
<b>b-Mercaptoetanol</b>	0,14	-	-	-	-
<b>Tritón X-100</b>	-	-	-	-	0,60
<b>Total (€)/100 mL</b>	10,09	9,95	9,50	9,92	10,07
<b>Total (€)/2 mL</b>	0,21	0,20	0,19	0,20	0,20
<b>Total (€)/1000 L</b>	100.853	99.466	94.986	99.245	100.743

A la vista de los resultados se observa que, en general, las diferentes fórmulas de transporte de muestra presentan resultados de diagnóstico semejantes a los observados en una situación real, e, incluso, en algunos casos los mejoran, a la vez que permiten simplificar los pasos tanto en el proceso de fabricación de la fórmula de transporte, como en el proceso de extracción del ARN de la muestra, evitando el paso de lisis celular.

Todo ello con un ahorro económico en comparación al Medio IT propuesto en un principio por el Grupo de Genética de Micobacterias, consiguiendo, por tanto, una optimización de este medio de transporte.

## 7 CONCLUSIONES

1. Para la realización de trabajos de investigación empleando muestras biológicas procedentes de pacientes se requiere la aprobación del comité de ética y por tanto una planificación exhaustiva desde la toma de muestras hasta el análisis de los resultados.
2. Las diferentes fórmulas de transporte de muestra desarrolladas han presentado resultados similares a los obtenidos con los medios comerciales empleados en la actualidad, permitiendo la estabilización del ácido nucleico, así como evitando la inhibición de la reacción de PCR.
3. Las fórmulas propuestas se presentan como una alternativa más simple y económica para la toma de muestras respiratorias en la identificación de ARN de SARS-CoV-2.
4. Al variar el protocolo de extracción del ARN, eliminando el paso de lisis en las extracciones B2 y B3, se ha observado que los resultados de amplificación son similares. Esto permitiría extraer el ARN directamente de la muestra, simplificando este proceso.
5. Se plantea la posibilidad de emplear guanidinio como agente lisante, capaz de liberar el ARN viral eliminando la capacidad infectiva de la muestra; si bien es necesario llevar a cabo estudio que puedan confirmar esta infectividad.

## CONCLUSIONS

1. To perform research works using biological samples from patients, the approval of the ethics committee is required and, therefore, an exhaustive planning from the taking of samples to the analysis of the results.
2. The different sample transport formulations developed have presented similar results to those obtained with the commercial media currently used, allowing the stabilization of the nucleic acid, as well as, avoiding the inhibition of the PCR reaction.
3. The formulations proposed are presented as a simpler and cheaper alternative for taking respiratory samples in the identification of SARS-CoV-2 RNA.
4. With the modification in RNA extraction protocol, removing the lysis step in extractions B2 and B3, it has been observed that the amplification results are similar. This would allow the RNA to be extracted directly from the sample, simplifying this process.
5. The possibility of using guanidinium as a lysing agent, capable of releasing viral RNA, removing the infective capacity of the sample, is proposed; although, it is necessary to perform a study to confirm this infectivity.

## 8 AGRADECIMIENTOS

Este Trabajo de Fin de grado ha sido posible gracias a la colaboración de un gran número de personas, por eso me gustaría agradecer,

- Al equipo del Hospital Royo Villanova, los neumólogos David Nieto Sánchez, Laura Pérez Giménez y Marco Zuil Martín, la microbióloga M<sup>a</sup> Luisa Monforte Cirac, y la enfermera de neumología Eva Anadón Galicia, por su colaboración e implicación en la toma de las muestras biológicas necesarias para el estudio.
- Al Biobanco de muestras, perteneciente al IACS (Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud), y en especial a Delia Recalde, por su ayuda en la anonimización de las muestras.
- A Henar Alonso Ezcurra, responsable de Evaluaciones Clínicas en CerTest Biotec, por su ayuda en toda la documentación necesaria presentada ante el CEICA.
- A Jesús Gonzalo Asensio, Investigador Principal, por supervisar cada uno de los pasos que se daban en el trabajo y aportar su experiencia en el campo.

## 9 BIBLIOGRAFIA

1. Coronavirus disease (COVID-19) – World Health Organization [Internet]. Who.int. [citado el 8 de septiembre de 2022]. Disponible en: <http://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>
2. Guo Y-R, Cao Q-D, Hong Z-S, Tan Y-Y, Chen S-D, Jin H-J, et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status. *Mil Med Res* [Internet]. 2020 Dec 13;7(1):11. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1186/s40779-020-00240-0#auth-3>
3. Das A, Ahmed R, Akhtar S, Begum K, Banu S. An overview of basic molecular biology of SARS-CoV-2 and current COVID-19 prevention strategies. *Gene Reports* [Internet]. 2021;23(December 2020):101122. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101122>
4. Spike glycoprotein [Internet]. Uniprot.org. [citado el 8 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.uniprot.org/uniprot/P59594>
5. spike protein [Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2] - Protein - NCBI [Internet]. Nih.gov. [citado el 6 de mayo de 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/QIH45093>
6. Li DD, Li QH. SARS-CoV-2: vaccines in the pandemic era. *Mil Med Res* [Internet]. 2021;8(1):1–15. Available from: <https://mmrjournal.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s40779-020-00296-y.pdf>
7. Peng Y, Du N, Lei Y, Dorje S, Qi J, Luo T, et al. Structures of the SARS-CoV-2 nucleocapsid and their perspectives for drug design. *EMBO J* [Internet]. 2020 Oct 15;39(20). Available from: <https://doi.org/10.15252/emboj.2020105938>
8. Chang C, Hou M-H, Chang C-F, Hsiao C-D, Huang T. The SARS coronavirus nucleocapsid protein – Forms and functions. *Antiviral Res* [Internet]. 2014 Mar;103:39–50. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.12.009>
9. Focosi D, Maggi F. Neutralising antibody escape of SARS-CoV-2 spike protein: Risk assessment for antibody-based Covid-19 therapeutics and vaccines. *Rev Med Virol*. 2021;(January).
10. GISAID - NextStrain [Internet]. Gisaid.org. [citado el 8 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.gisaid.org/phylogenetics/global/nextstrain/>
11. Harmer D, Gilbert M, Borman R, Clark KL. Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme. *FEBS Lett* [Internet]. 2002 Dec 4;532(1–2):107–10. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03640-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03640-2)
12. Hikmet F, Méar L, Edvinsson Å, Micke P, Uhlén M, Lindskog C. The protein expression profile of ACE2 in human tissues. *bioRxiv*. 2020;1–16.
13. López Pérez GT, Ramírez Sandoval M de LP, Torres Altamirano MS. Participantes de la respuesta inmunológica ante la infección por SARS-CoV-2. *Alergia, Asma e Inmunol Pediátricas*. 2020;29(1):5–15.
14. Li N, Hui H, Bray B, Gonzalez GM, Zeller M, Kristian G, et al. METTL3 regulates viral m6A RNA modification and host cell innate immune responses during SARS-CoV-2 infection. 2021;



15. Kumar V, Singh J, Hasnain SE, Sundar D. Possible link between higher transmissibility of B.1.1.617 and B.1.1.7 variants of SARS-CoV-2 and increased structural stability of its spike protein and hACE2 affinity. 2021;1–12.
16. SARS-CoV-2 reinfection by the new Variant of Concern (VOC) P.1 in Amazonas, Brazil [Internet]. Virological.org. 2021 [citado el 8 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://virological.org/t/sars-cov-2-reinfection-by-the-new-variant-of-concern-voc-p-1-in-amazonas-brazil/596>
17. Mutations arising in SARS-CoV-2 spike on sustained human-to-human transmission and human-to-animal passage [Internet]. Virological.org. 2021 [citado el 8 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://virological.org/t/mutations-arising-in-sars-cov-2-spike-on-sustained-human-to-human-transmission-and-human-to-animal-passage/578>
18. López-Goñi I, Perfil VT mi. Guía para entender los mutantes y variantes del SARS-CoV-2 [Internet]. Blogspot.com. [citado el 8 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://microbioun.blogspot.com/2021/03/guia-para-entender-variantes-SARSCoV2.html>
19. Zhang J, Cai Y, Xiao T, Lu J, Peng H, Sterling SM, et al. Structural impact on SARS-CoV-2 spike protein by D614G substitution. *Science* (80- ). 2021;2303(March):eabf2303.
20. Concerning variants of SARS CoV 2 [Internet]. Caymanchem.com. [citado el 8 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.caymanchem.com/news/concerning-variants-of-sars-cov-2>
21. The Bacterial Viral Bioinformatic Resource Center [Internet]. Bv-brc.org. [citado el 8 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://bv-brc.org/view/VariantLineage/>
22. Solis-Moreira J. <https://www.news-medical.net/news/20210411/4/Spanish.aspx> [Internet]. Available from: <https://www.news-medical.net/news/20210411/4/Spanish.aspx>
23. López-Goñi I. Ómicron, lo que no sabemos de la nueva variante [Internet]. Microbioblog.es. 2021 [citado el 8 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://microbioblog.es/omicron-lo-que-no-sabemos-de-la-nueva-variante>
24. CDC. Clasificaciones y definiciones de las variantes del SARS-CoV-2 [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2022 [citado el 8 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://espanol.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html>
25. CDC C, Orflab C. Summary table of available protocols in this document Institute Gene targets [Internet]. Who.int. [citado el 9 de septiembre de 2022]. Disponible en: [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/whoinhouseassays.pdf?sfvrsn=de3a76aa\\_2](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/whoinhouseassays.pdf?sfvrsn=de3a76aa_2)
26. Welch SR, Davies KA, Buczkowski H, Hettiarachchi N, Green N, Arnold U, et al. Inactivation analysis of SARS-CoV-2 by specimen transport media, nucleic acid extraction reagents, detergents and fixatives. *bioRxiv*. 2020;58(11):1–13.

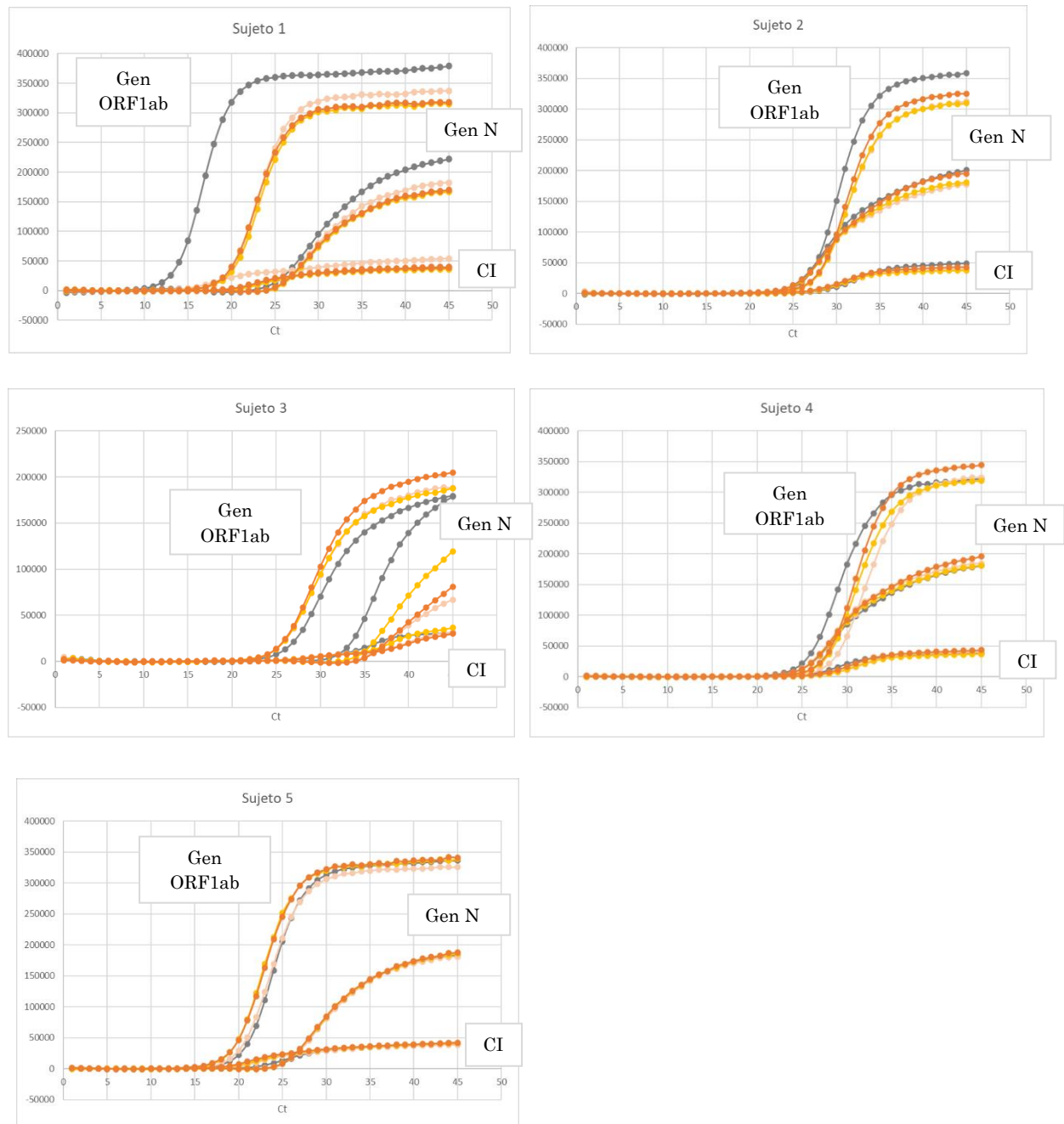
27. Scallan MF, Dempsey C, MacSharry J, O'Callaghan I, O'Connor PM, Horgan CP, et al. Validation of a lysis buffer containing 4 M Guanidinium Thiocyanate (GITC)/ Triton X-100 for extraction of SARS-CoV-2 RNA for COVID-19 Testing: Comparison of formulated lysis buffers containing 4 to 6 M GITC, roche external lysis buffer and Qiagen RTL lys. bioRxiv. 2020;
28. Auerswald H, Yann S, Dul S, In S, Dussart P, Martin NJ, et al. Assessment of inactivation procedures for SARS-CoV-2. J Gen Virol. 2021;1–5.
29. Wang D, Lin H, Kan J, Liu L, Zeng X, Shen S. Food chemistry. Food Chemistry. 2012. 1–370 p.

## 10 ANEXOS

### 10.1 Anexo I. Gráficas de las amplificaciones.

Gráficas correspondientes a las muestras en Medio IT.

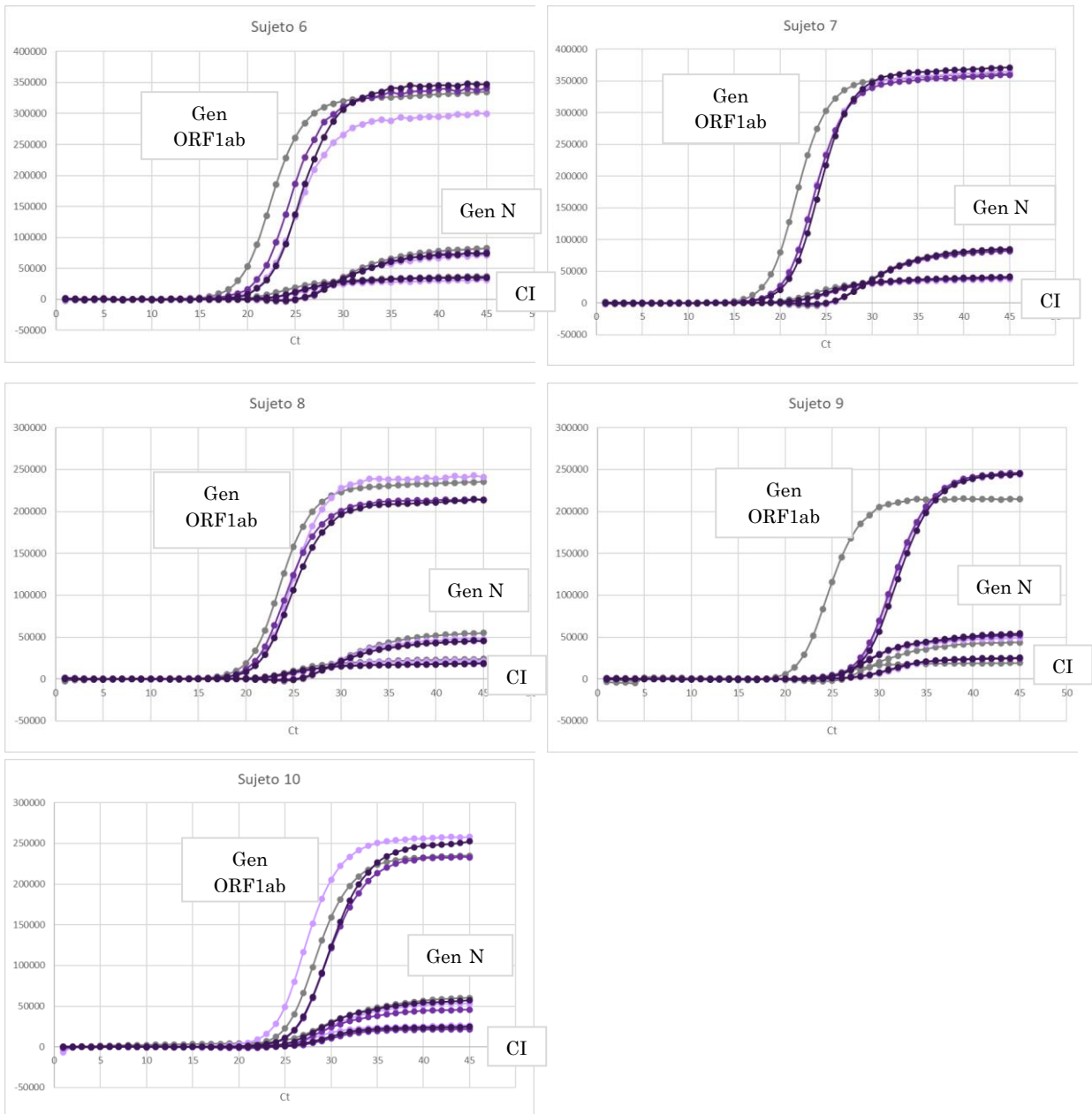
Siguiendo los patrones de colores establecidos en todos los trabajos en gris se observa la curva de amplificación de la muestra A, en naranja claro la muestra B1, en amarillo la muestra B2 y en naranja la muestra B3. En el eje Y se muestran los valores de fluorescencia obtenidos y en el eje X el número de ciclo de amplificación.



Gráficas 7. Se muestran las curvas de amplificación de las muestras en Medio IT.

Gráficas correspondientes a las muestras en la formulación 1:

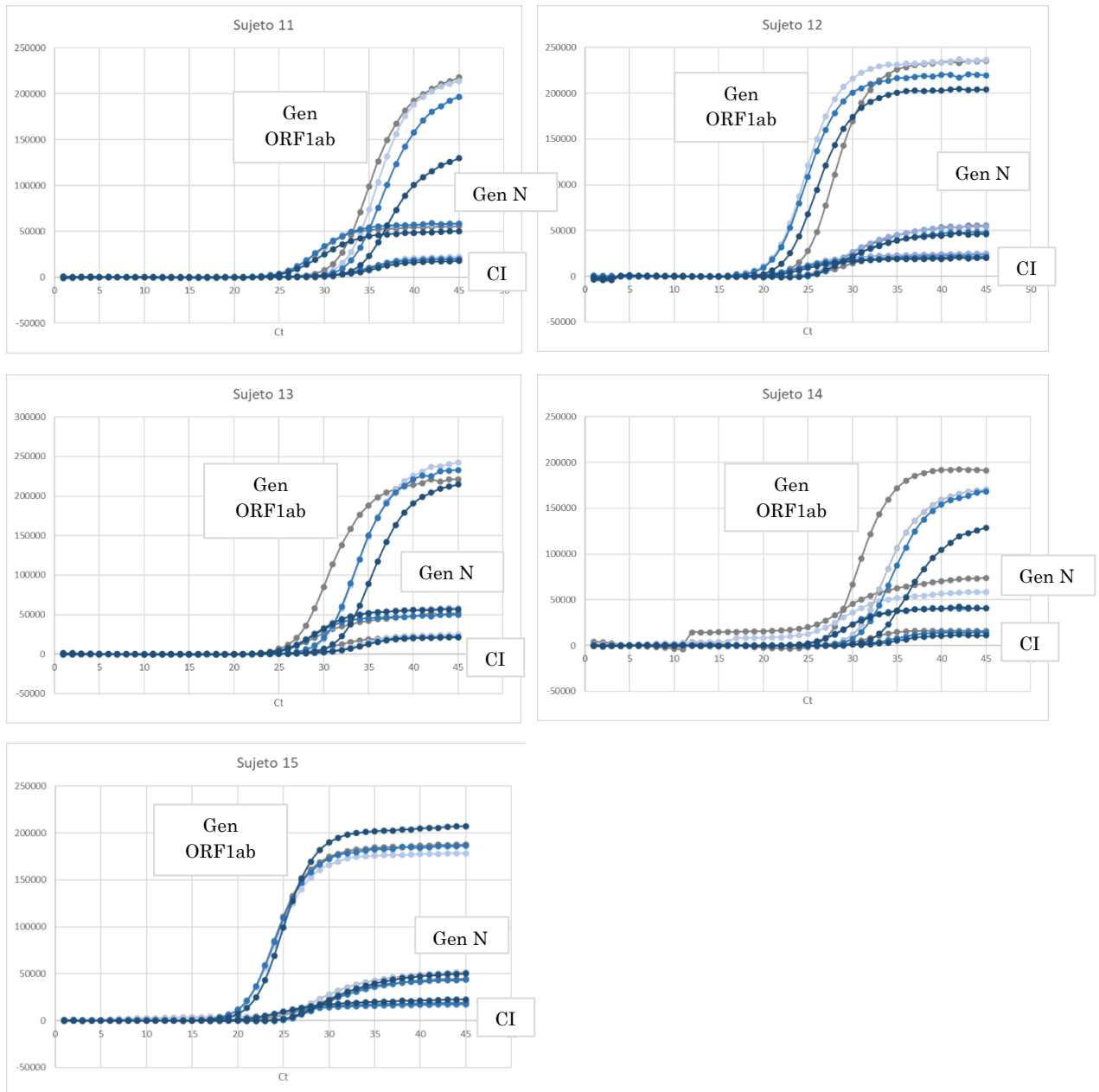
Siguiendo los patrones de colores establecidos en todos los trabajos en gris se observa la curva de amplificación de la muestra A, en lila la muestra B1, en morado claro la muestra B2 y en morado oscuro la muestra B3. En el eje Y se muestran los valores de fluorescencia obtenidos y en el eje X el número de ciclo de amplificación.



Gráficas 8. Se muestran las curvas de amplificación de las muestras en la fórmula 1

Gráficas correspondientes a las muestras en la formulación 2:

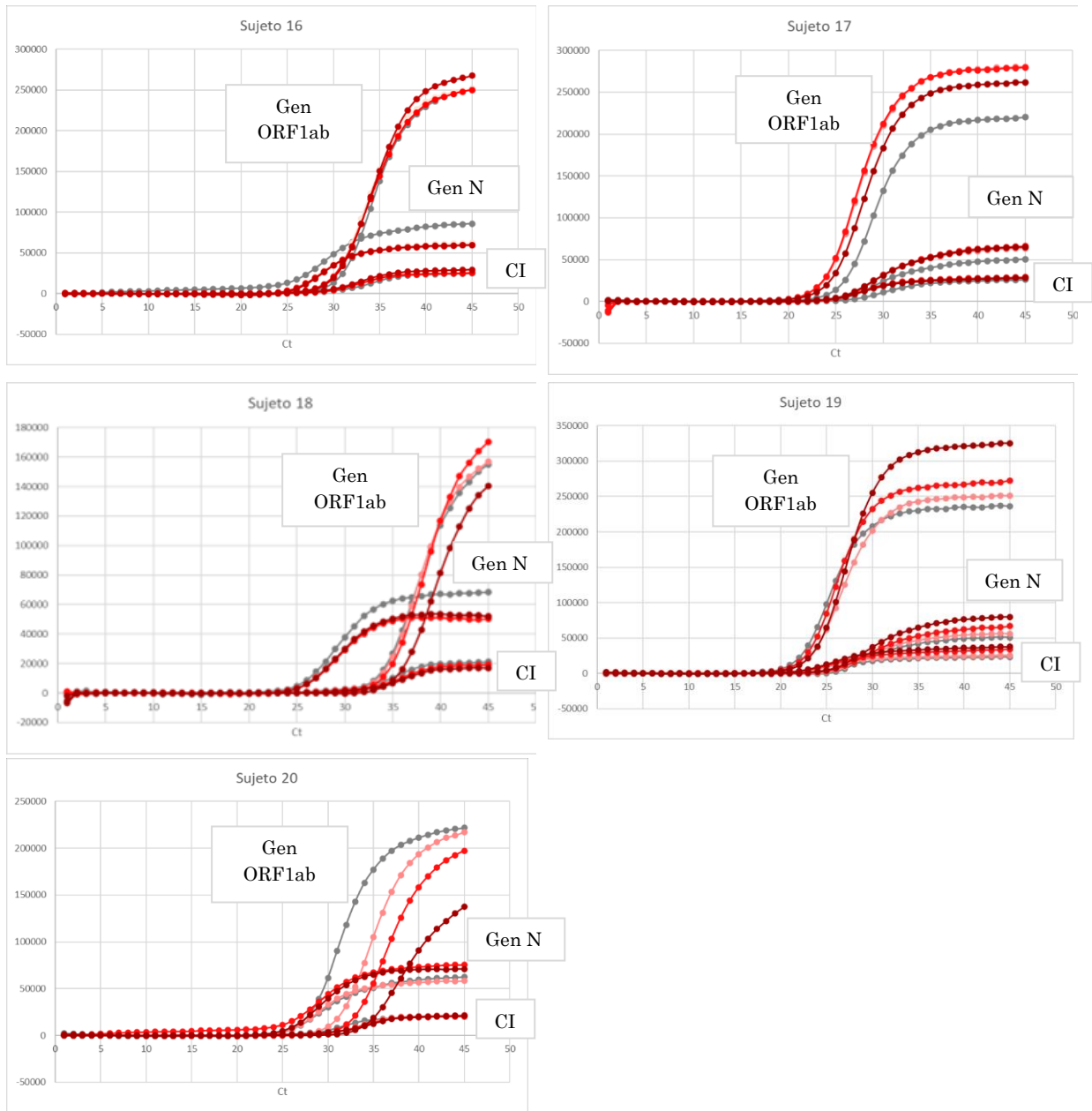
Siguiendo los patrones de colores establecidos en todos los trabajos en gris se observa la curva de amplificación la muestra A, en azul claro la muestra B1, en azul la muestra B2 y en azul oscuro la muestra B3. En el eje Y se muestran los valores de fluorescencia obtenidos y en el eje X el número de ciclo de amplificación.



Gráficas 9 Se muestran las curvas de amplificación de las muestras en la fórmula 2.

Gráficas correspondientes a las muestras en la formulación 3:

Siguiendo los patrones de colores establecidos en todos los trabajos en gris se observa la curva de amplificación de la muestra A, en rosa claro la muestra B1, en rojo la muestra B2 y en granate la muestra B3. En el eje Y se muestran los valores de fluorescencia obtenidos y en el eje X el número de ciclo de amplificación.

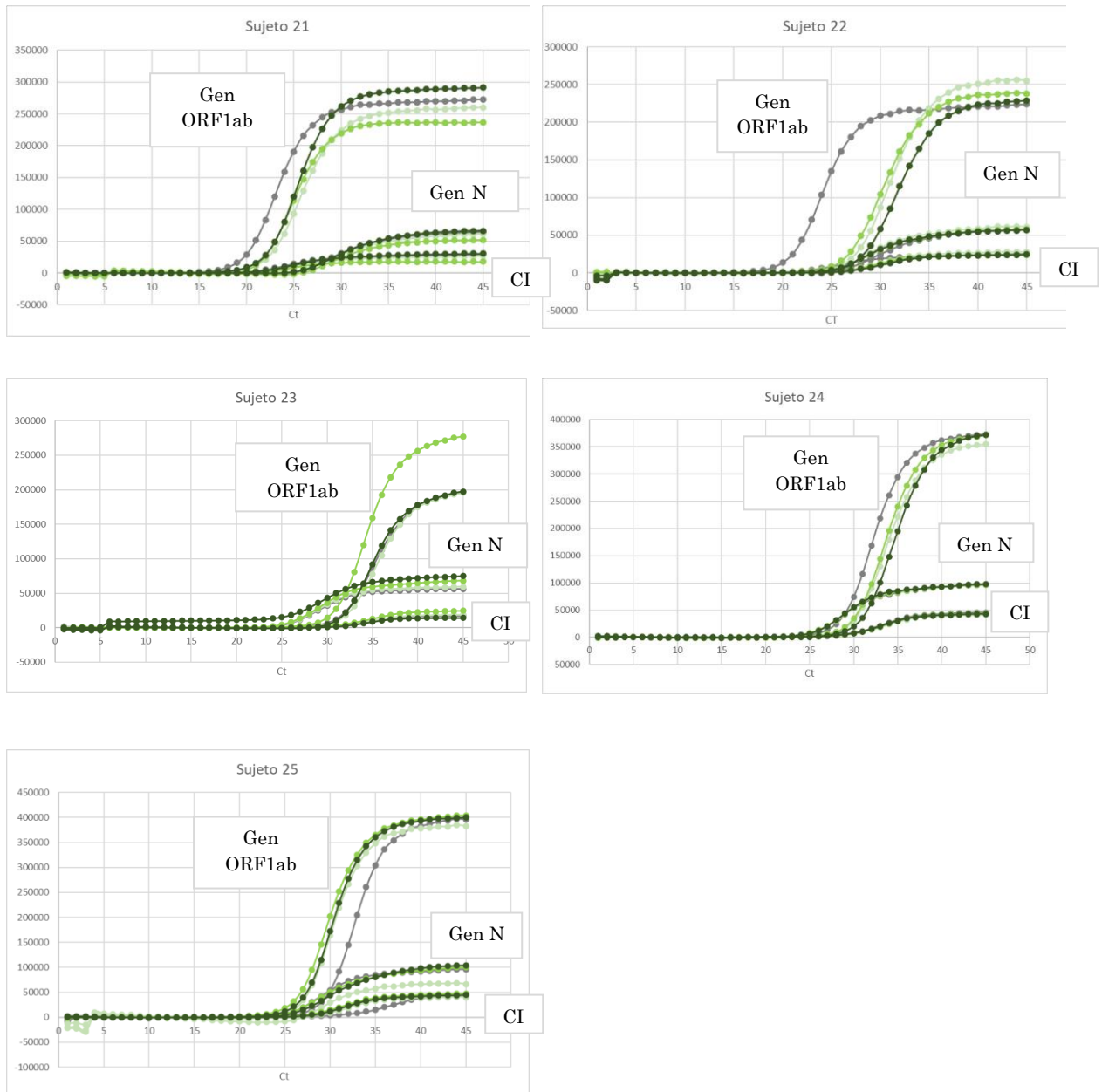


Gráficas 10 Se muestran las curvas de amplificación de las muestras en la fórmula 3.

## Evaluación de diferentes fórmulas de medio de transporte viral para uso en SARS-CoV-2.

### Gráficas correspondientes a las muestras en la formulación 4:

Siguiendo los patrones de colores establecidos en todos los trabajos en gris se observa la curva de amplificación de la muestra A, en verde claro la muestra B1, en verde la muestra B2 y en verde oscuro la muestra B3. En el eje Y se muestran los valores de fluorescencia obtenidos y en el eje X el número de ciclo de amplificación.



Gráficas 11 Se muestran las curvas de amplificación de las muestras en la fórmula 4.

10.2 Anexo II: Datos de CTs

Tipo de extracción	Sujeto 1			Sujeto 2			Sujeto 3			Sujeto 4			Sujeto 5		
	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab
A	25,1	14,1	10,8	25,03	26,04	23,98	25,17	26,02	30,67	25,23	24,82	22,74	25,74	21,02	17,76
B1	26,0	20,0	17,0	25,18	25,35	24,82	25,13	26,29	35,12	25,18	25,35	24,82	25,68	18,74	17,46
B2	26,1	20,0	17,1	25,31	26,08	25,29	25,09	26,79	34,14	25,22	26,41	25,16	25,63	17,97	16,52
B3	25,9	18,9	16,8	25,12	24,76	24,61	25,04	26,90	35,41	25,13	25,60	24,77	25,64	17,27	16,25

\*CI: Control interno

Tipo de extracción	Sujeto 6			Sujeto 7			Sujeto 8			Sujeto 9			Sujeto 10		
	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab
A	25,96	20,03	18,56	25,96	19,84	17,91	26,60	22,01	20,31	26,83	23,96	21,64	13,07	26,05	24,97
B1	25,63	22,34	21,29	26,03	21,27	19,71	26,19	23,17	21,55	24,73	28,19	28,05	25,56	27,07	26,19
B2	26,10	22,05	20,49	25,85	21,35	19,76	26,38	22,48	21,04	24,58	27,59	27,82	25,60	24,89	23,63
B3	25,89	22,14	21,49	25,79	20,97	20,16	26,32	22,27	21,57	24,79	27,70	28,28	24,75	26,37	26,12

\*CI: Control interno

Tipo de extracción	Sujeto 11			Sujeto 12			Sujeto 13			Sujeto 14			Sujeto 15		
	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab
A	24,66	31,13	31,71	25,21	25,86	24,67	24,73	28,10	27,11	10,40	29,80	28,09	25,37	23,24	21,15
B1	24,58	30,92	32,63	25,32	20,88	21,21	24,55	29,76	30,28	11,56	32,05	30,97	12,60	21,57	21,14
B2	24,39	30,75	33,33	26,11	21,03	21,37	24,96	30,45	30,15	25,55	32,07	31,71	26,03	21,43	21,08
B3	25,03	31,66	34,96	25,89	22,18	22,82	24,35	29,94	32,00	25,23	33,44	33,93	25,53	21,70	21,84

\*CI: Control interno

Tipo de extracción	Sujeto 16			Sujeto 17			Sujeto 18			Sujeto 19			Sujeto 20		
	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab
A	8,73	29,19	30,87	25,37	26,75	25,78	24,20	30,20	34,67	26,03	23,79	22,01	24,58	28,20	27,97
B1	24,55	28,72	30,04	24,96	24,55	23,57	24,75	30,68	34,89	25,22	22,38	23,11	25,02	29,76	31,41
B2	24,74	28,94	30,12	24,90	24,45	23,52	24,87	31,62	35,21	24,88	21,90	22,55	7,59	30,00	33,10
B3	25,15	28,41	30,26	24,35	24,38	24,26	24,89	32,21	36,62	24,41	21,70	23,11	24,20	29,28	35,36

\*CI: Control interno

Tipo de extracción	Sujeto 21			Sujeto 22			Sujeto 23			Sujeto 24			Sujeto 25		
	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab	CI	Gen N	ORF1ab
A	25,52	20,78	19,59	26,00	22,24	20,86	24,68	30,66	31,97	23,46	27,34	27,90	23,78	28,56	28,60
B1	25,22	22,10	22,14	24,56	26,67	27,33	24,44	30,76	32,43	23,56	27,74	29,48	27,25	28,14	26,47
B2	26,53	22,80	21,78	24,77	26,38	26,57	24,57	30,00	30,72	23,42	27,64	29,31	23,45	25,98	25,41
B3	25,44	21,38	21,66	24,64	26,85	28,11	4,87	31,87	32,04	23,55	27,59	30,23	23,97	26,87	26,13

En estas tablas se muestran los datos de los Cts. obtenidos. Los colores con los que se representan corresponden a la fórmula que se ha empleado como medio de transporte en cada caso.