



CONSIDERACIONES SOBRE EL EMPLEO DE *POOLING* DE MUESTRAS RESPIRATORIAS PARA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 MEDIANTE RT-PCR

Mercedes Pérez-Ruiz, Luis Martínez Martínez, Federico García García, en representación de la Sociedad Andaluza de Microbiología y Parasitología Clínica (SAMPAC).

Antecedentes

La actual pandemia por SARS-CoV-2 está generando una situación, cambiante cada día, pero en ningún momento exenta de sobrecarga para los Servicios/Unidades de Microbiología, en las que en ocasiones no se ha podido dar respuesta en el tiempo deseado por problemas ajenos a los profesionales de la Microbiología Clínica.

La mejor herramienta para el diagnóstico de confirmación de la COVID-19 es la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa (RT-PCR). Existen múltiples sistemas comerciales de RT-PCR, más o menos automatizados, que se han ido implementando desde el principio de la pandemia. Sin embargo, casi ninguno de ellos ha estado exento de problemas de suministro por rotura de *stock*. Esto ha obligado a los servicios de Microbiología a proveerse de diferentes sistemas, cada uno con su particular protocolo y, por tanto, al continuo entrenamiento del personal del laboratorio, que incluye FEA, EIR, TEL, y personal administrativo.

En la situación actual de la pandemia debe abordarse: diagnóstico de la infección de población sintomática, comunitaria y hospitalizada, cribado previo de personas que van a someterse a intervención quirúrgica, cribado para establecer las medidas de control adecuadas en centros y unidades socio-sanitarias con personas especialmente vulnerables, rastreo de contactos de casos confirmados y cribado de personal sanitario. Esto ha aumentado aún más la demanda en Microbiología y especialmente del diagnóstico por PCR.

Existen ya numerosos trabajos que evidencian que el uso del *pooling* podría ayudar a mejorar el flujo de trabajo de los laboratorios clínicos, contribuyendo a una reducción en el consumo de material y reactivos.

Este documento recoge las consideraciones más relevantes acerca del *pooling* para detección de SARS-CoV-2 mediante RT-PCR, en base a la evidencia científica hasta la fecha (18 de septiembre de 2020).

Definición y antecedentes

Pooling (también referido en inglés como *pool testing*, *pooled testing* o *batch testing*) se refiere a la mezcla (*pool*) de muestras respiratorias para detección de ARN de SARS-CoV-2 mediante RT-PCR. Si un *pool* es negativo, significa que todas las muestras del mismo son negativas. Si un *pool* es positivo, hay que confirmar cuál o cuáles de las muestras del mismo son positivas.

Este procedimiento se ha utilizado previamente para detección de agentes infecciosos mediante serología y PCR. Se remonta a los años 40 del siglo pasado, en que Dorfman propuso el empleo del *pooling* en el cribado de sífilis en soldados durante la segunda guerra mundial. Se viene

usando también en los centros de transfusiones para el cribado en donantes de sangre de hepatitis B, hepatitis C, VIH, virus del Nilo Occidental y, recientemente, SARS-CoV-2.

Métodos de *pooling*

Se han descrito varios métodos de *pooling* para detección de ARN de SARS-CoV-:

Método 1. Se basa en un primer paso de *pooling* con un número determinado de muestras en cada *pool* y posterior confirmación individual de los *pools* positivos.

Método 2. Utiliza un *pooling* en dos pasos, un primer paso con *pools* con mayor número de muestras y un segundo paso con *pools* más pequeños de los *pools* positivos del primer paso, con lo que, finalmente, quedan menos muestras por confirmar individualmente.

Los métodos 1 y 2 serían los más simples y fáciles de llevar a cabo en poblaciones con baja prevalencia de infección (<1%).

Método 3. Es un método similar al método 2, pero en el segundo paso se usa una matriz multi-dimensional para diseñar el *pooling*. Los *pools* son solapantes y se disponen en filas y columnas, de forma que una misma muestra está incluida en los *pools* de las filas y columnas que la contienen. Este método permite extrapolar el resultado individual positivo, en función de los *pools* positivos en este segundo paso, por cruce de resultados de filas y columnas.

Método 4. Es una matriz en un único paso, donde las filas serían el número de determinaciones y las columnas, el número de muestras. Este método es probablemente el más eficiente, pero el más difícil de llevar a cabo porque requiere evaluación previa de las dimensiones de la matriz para que se tenga que repetir el menor número posible de muestras de forma individual. Ghosh y cols. han diseñado un método para la realización de *pooling* en matrices cuyas dimensiones están en función del número esperado de positivos, y proporcionan una aplicación para Android que permite el cálculo del *pooling* y la interpretación de los resultados.

Sensibilidad, especificidad y eficiencia del *pooling*

Existen numerosos trabajos que han evaluado el *pooling* en comparación con la técnica realizada en muestras individuales, con diferentes estrategias: *pooling* desde la muestra original (previa extracción del ARN viral) vs desde la RT-PCR (con ARN extraído y purificado), varios métodos de *pooling* como el método en dos pasos o *pooling* en matriz, diferente número de muestras en los *pools*, que va de 2 a 64, varios genes de SARS-CoV-2 vs un solo gen, etc.

En general, los mejores resultados se obtienen con muestras agrupadas en *pools* de no más de 5-10 muestras, en función de la prevalencia o grupo de población que se esté estudiando. En estos casos, los valores de sensibilidad y valor predictivo negativo son superiores al 95% y la especificidad y valor predictivo positivo se mantienen en el 100%.

Para determinar el número óptimo de muestras a incluir en un *pool*, se han descrito modelos matemáticos y aplicaciones informáticas, que realizan este cálculo basados en la prevalencia de la infección y sensibilidad y especificidad del test a emplear.

El uso del *pooling* se demuestra también como eficiente para reducir los costes asociados al material y reactivos necesarios. Cuando la prevalencia de la infección es baja, el empleo de técnicas de *pooling* permite reducir estos gastos en más de un 70%. A medida que aumenta la prevalencia, para un método simple de *pooling* en dos pasos, el ahorro va disminuyendo y la carga de trabajo aumenta al hacerlo el número de *pools* positivos que requieren confirmación individual. En el peor de los escenarios, se ha demostrado que con una prevalencia del 20%, el ahorro en material es del 17%.

En condiciones idóneas de toma de muestra, el valor de Ct de la PCR en tiempo real puede ser inversamente proporcional a la cantidad de ARN viral en la muestra y por ello, se ha usado para

semi-cuantificar la carga viral y para comparar el método individual con el *pooling*. Se ha demostrado que el *pooling* con un número pequeño de muestras no aumenta el valor de Ct en más de 2, variación aceptable y dentro del error inter-ensayo intrínseco a la RT-PCR. Sin embargo, *pools* con más de 10 muestras muestran un aumento de >4 Ct, lo cual puede conllevar la obtención de falsos resultados negativos en muestras con baja carga viral. Algunos autores han demostrado que muestras con valores de Ct>35 en la determinación individual pueden ser negativas dentro de un *pool* cuando el resto de muestras en el mismo son negativas. Este patrón es típico de fases convalecientes de la infección, en las que es frecuente la detección del ARN viral en cantidades *borderline* y en muchas ocasiones, de uno solo de los genes.

Además, diferentes trabajos muestran variaciones en el rendimiento del *pooling* que puede estar asociado a la técnica usada, a los genes diana, al grupo de población estudiado, etc.

Por tanto, cada laboratorio debería realizar una validación previa del *pooling* con sus reactivos y equipos específicos, seleccionando la población diana que se podría beneficiar mejor del método en función también de la prevalencia local, para garantizar un resultado fiable.

Ámbito y aplicaciones del *pooling*

Los resultados de los diferentes trabajos que han evaluado la utilidad del *pooling* de muestras para RT-PCR de SARS-CoV-2 han llevado a proponer su aplicación para determinados fines:

- Estimación de la prevalencia de la infección. El ECDC propone un método de *pooling* para analizar la prevalencia aplicable en sistemas de vigilancia.
- Cribado de grupos de población: podría ser útil para identificar casos positivos en grupos específicos asintomáticos, en los que actualmente se está empleando la PCR mediante cribados masivos, como trabajadores sanitarios a la vuelta de vacaciones y pacientes que van a ser sometidos a intervención quirúrgica y otras intervenciones invasivas.
- Vigilancia de infección nosocomial, en pacientes hospitalizados y trabajadores de hospital asintomáticos.
- Diagnóstico de infección en situaciones de epidemiología favorable de la infección, es decir, cuando la prevalencia es baja.
- Para el estudio de contactos estrechos de casos confirmados de COVID-19 en los que la prevalencia de positivos supere valores del 10% (como en brotes en residencias, centros de internamiento, etc...en los que ya se han identificado un nº importante de casos) el *pooling* no parece aconsejable. En el resto de las situaciones de contactos estrechos, cuando la prevalencia de positivos no supera el 10% en la mayoría de los casos, el *pooling* podría ser una herramienta a utilizar.

Limitaciones:

- Un factor que ningún trabajo ha tenido en cuenta es la trazabilidad de las muestras. Actualmente ni las aplicaciones de los sistemas comerciales de RT-PCR ni los sistemas informáticos de los laboratorios de Microbiología poseen una herramienta para garantizar la trazabilidad de las muestras cuando se emplea el *pooling*, en especial para la emisión de resultados.
- La automatización de la realización de *pools* (desde la mezcla de muestras hasta la transmisión de resultados al SIL) no está disponible en todos los laboratorios.
- Si alguna de las etapas se debe ejecutar de forma manual, existe la posibilidad de que se produzcan errores (transcripción de resultados, mezcla de muestras, etc.).

Debe eliminarse el riesgo de contaminaciones cruzadas, que disminuirán si los robots están bien diseñados, no forman aerosoles al pipetear y tienen un adecuado protocolo de descontaminación de equipos.

- Los métodos basados en matrices suponen una alta carga de trabajo por su complejidad.
- Por todas las consideraciones anteriores, los tiempos de respuesta pueden aumentar según el escenario que se presente en cada situación.

Conclusiones

El empleo del *pooling* puede reducir los costes de reactivos de PCR, siendo mayor esta reducción a medida que disminuye la prevalencia de infección en la población de estudio. Por tanto, su utilidad en sistemas de vigilancia, especialmente en periodos de circulación baja del virus podría ser de gran utilidad.

Sin embargo, cada laboratorio debe estudiar detalladamente si sería rentable el empleo del *pooling*, dado que para ello, tendría que tener conocimiento previo de la prevalencia estimada de la población a estudiar, evaluar el efecto del *pooling* en la sensibilidad y especificidad de la técnica mediante validación interna y de la sobrecarga de trabajo que podría implicar realizar confirmación de muchos *pools* positivos, También tiene que tenerse en cuenta la capacidad de cada laboratorio de garantizar la trazabilidad de las muestras sin herramientas informáticas para tal fin.

Bibliografía

Abdalhamid B, Bilder CR, McCutchen EL, Hinrichs SH, Koepsell SA, Iwen PC. Assessment of Specimen Pooling to Conserve SARS CoV-2 Testing Resources. *Am J Clin Pathol*. 2020 May 5;153(6):715-718. doi:10.1093/ajcp/aqaa064.

Abid S, Ferjani S, El Moussi A, Ferjani A, Nasr M, Landolsi I, Saidi K, Gharbi H, Letaief H, Hechaichi A, Safer M, Ben Alaya NBE, Boubaker IB. Assessment of sample pooling for SARS-CoV-2 molecular testing for screening of asymptomatic persons in Tunisia. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2020 Jul 5;98(3):115125. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2020.115125.

Aragón-Caqueo D, Fernández-Salinas J, Laroze D. Optimization of group size in pool testing strategy for SARS-CoV-2: A simple mathematical model. *J Med Virol*. 2020 Apr 24;10.1002/jmv.25929. doi: 10.1002/jmv.25929.

Ben-Ami R, Klochendler A, Seidel M, Sido T, Gurel-Gurevich O, Yassour M, Meshorer E, Benedek G, Fogel I, Oiknine-Djian E, Gertler A, Rotstein Z, Lavi B, Dor Y, Wolf DG, Salton M, Drier Y; Hebrew University-Hadassah COVID-19 Diagnosis Team. Large-scale implementation of pooled RNA extraction and RT-PCR for SARS-CoV-2 detection. *Clin Microbiol Infect*. 2020 Jun 23;26(9):1248–53. doi:10.1016/j.cmi.2020.06.009.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Interim guidance for use of pooling procedures in SARS-CoV-2 diagnostic, screening, and surveillance testing. Disponible en: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/pooling-procedures.html> (fecha de acceso: 31/08/20).

Chang L, Yan Y, Zhao L, et al. No evidence of SARS-CoV-2 RNA among blood donors: A multicenter study in Hubei, China. *Transfusion*. 2020;1–9. 10.1111/trf.15943.

de Salazar A, Aguilera A, Trastoy R, Fuentes A, Alados JC, Causse M, Galán JC, Moreno A, Trigo M, Pérez-Ruiz M, Roldán C, José Pena M, Bernal S, Serrano-Conde E, Barbeito G, Torres E, Riazco C, Cortes-Cuevas JL, Chueca N, Coira A, Sanchez-Calvo JM, Marfil E, Becerra F, Gude MJ, Pallarés

Á, Pérez Del Molino ML, García F. Sample pooling for SARS-COV-2 RT-PCR screening. *Clin Microbiol Infect.* 2020 Sep 9:S1198-743X(20)30537-1. doi: 10.1016/j.cmi.2020.09.008.

Dorfman R. The detection of defective members of large populations. *Annals of Mathematical Statistics.* 1943;14:436–440.

Ghosh S, Rajwade A, Krishna S, Gopalkrishnan N, Schaus TE, Chakravarthy A, Varahan S, Appu V, Ramakrishnan R, Shashank Ch, Jindal M, Bhupathi V, Gupta A, Jain A, Agarwal R, Pathak S, Rehan MA, Consul S, Gupta Y, Gupta N, Agarwal P, Goyal R, Sagar V, Ramakrishnan U, Krishna S, Yin P, Palakodeti D, Gopalkrishnan M. Tapestry: A Single-Round Smart Pooling Technique for COVID-19 Testing. *medRxiv* 2020.04.23.20077727; doi:<https://doi.org/10.1101/2020.04.23.20077727>.

Gupta E, Padhi A, Khodare A, Agarwal R, Ramachandran K, Mehta V, Kilikdar M, Dubey S, Kumar G, Sarin SK. Pooled RNA sample reverse transcriptase real time PCR assay for SARS CoV-2 infection: A reliable, faster and economical method. *PLoS One.* 2020 Jul 30;15(7):e0236859. doi: 10.1371/journal.pone.0236859.

Hogan CA, Sahoo MK, Pinsky BA. Sample Pooling as a Strategy to Detect Community Transmission of SARS-CoV-2. *JAMA.* 2020 Apr 6;323(19):1967–9. doi:10.1001/jama.2020.5445.

Lim KL, Johari NA, Wong ST, Khaw LT, Tan BK, Chan KK, Wong SF, Chan WLE, Ramzi NH, Lim PKC, Hakim SL, Voon K. A novel strategy for community screening of SARS-CoV-2 (COVID-19): Sample pooling method. *PLoS One.* 2020 Aug 28;15(8):e0238417. doi:10.1371/journal.pone.0238417.

Lohse S, Pfuhl T, Berkó-Göttel B, Rissland J, Geißler T, Gärtner B, Becker SL, Schneitler S, Smola S. Pooling of samples for testing for SARS-CoV-2 in asymptomatic people. *Lancet Infect Dis.* 2020 Apr 28:S1473-3099(20)30362-5. doi:10.1016/S1473-3099(20)30362-5.

Mallapaty S. The mathematical strategy that could transform coronavirus testing. *Nature.* 2020 Jul;583(7817):504-505. doi: 10.1038/d41586-020-02053-6.

Nalbantoglu OU. Group testing performance evaluation for SARS-CoV-2 massive scale screening and testing. *BMC Med Res Methodol.* 2020 Jul 2;20(1):176. doi:10.1186/s12874-020-01048-1.

Perchetti GA, Sullivan KW, Pepper G, Huang ML, Breit N, Mathias P, Jerome KR, Greninger AL. Pooling of SARS-CoV-2 samples to increase molecular testing throughput. *J Clin Virol.* 2020 Aug 2;131:104570. doi:10.1016/j.jcv.2020.104570.

Petrucca A, Borro M, Lionetto L, Gentile G, Alari A, Simmaco M, Santino I. Validation of a small-size pooling approach targeting hospital surveillance of SARS-CoV-2 infection. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2020 Jul 30:1-2. doi:10.1017/ice.2020.380.

Täufer M. Rapid, large-scale, and effective detection of COVID-19 via non-adaptive testing. *J Theor Biol.* 2020 Aug 16;506:110450. doi:10.1016/j.jtbi.2020.110450.

Torres I, Albert E, Navarro D. Pooling of nasopharyngeal swab specimens for SARS-CoV-2 detection by RT-PCR. *J Med Virol.* 2020 May 5:10.1002/jmv.25971. doi:10.1002/jmv.25971.

Yelin I, Aharony N, Shaer Tamar E, Argoetti A, Messer E, Berenbaum D, Shafran E, Kuzli A, Gandali N, Shkedi O, Hashimshony T, Mandel-Gutfreund Y, Halberthal M, Geffen Y, Szwarcwort-Cohen M, Kishony R. Evaluation of COVID-19 RT-qPCR test in multi-sample pools. *Clin Infect Dis.* 2020 May 2:ciaa531. doi:10.1093/cid/ciaa531.