

Agrupamento de amostras eficiente e prático para grandes volumes de diagnóstico por PCR da COVID-19

Haran Shani-Narkiss, Omri David Gilday, Nadav Yayon, Itamar Daniel Landau*

Center for Brain Sciences, Hebrew University of Jerusalem

* itamar.landau@mail.huji.ac.il

Palavras-chave

SARS-CoV-2, PCR, qPCR, RT-PCR, COVID-19, Coronavirus, Pooling.

Abstract

No esforço global de combate à pandemia da COVID-19, governantes e agências de saúde pública vêm lutando para aumentar o volume e a velocidade das testagens diagnósticas. A forma mais comum de testagem hoje faz uso da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para identificar a presença de RNA viral em amostras individuais dos pacientes, uma a uma. Esse processo se tornou um dos mais significativos gargalos no aumento das testagens, especialmente devido à falta de reagentes químicos necessários na PCR.

Avanços técnicos recentes permitem a PCR de Alto Rendimento, na qual múltiplas amostras são agrupadas [*pooled*] no mesmo tubo. Esse tipo de método pode ser altamente eficaz, poupando grandes quantidades de tempo e reagentes. Sua eficácia, porém, é altamente dependente da frequência de amostrar positivas, que varia significativamente entre regiões e até dentro de uma mesma região conforme mudam as condições e critérios para testagem.

Aqui, são apresentadas duas possíveis estratégias otimizadas de agrupamento para testes diagnósticos em larga escala da SARS-CoV-2, ambas lidando com condições dinâmicas. Na primeira, empregamos uma heurística simples de teoria da informação para derivar um protocolo de reagrupamento altamente eficiente: uma estimativa da frequência-alvo determina o tamanho do agrupamento inicial, e agrupamentos que testarem positivo são reagrupados em agrupamentos com metade do tamanho anterior e testados novamente. Em áreas onde os casos são raros ($<0,05$) essa abordagem diminui dramaticamente a quantidade de testes necessários, chegando a, por exemplo, uma redução de 50 vezes quando a frequência-alvo é de 0,001. O segundo método é uma abordagem mais simples, com otimização do teste de um agrupamento único, seguido de testes em cada amostra individual presente nos grupos que testaram positivo. Nós demonstramos que essa abordagem é tão eficiente quanto a primeira para frequências-alvo moderadas ($0,05 < 0,2$), por exemplo, chegando a reduções de dois dígitos quando a frequência de amostras positivas é 0,07.

Essas estratégias requerem baixo investimento e oferecem redução significativa na quantidade de material, equipamento e tempo necessários para testar um grande número de amostras. Nós demonstramos que ambas as estratégias de agrupamento são aproximadamente comparáveis ao limite superior de eficiência dado pelo teorema de Codificação de Fonte de Shannon. Nós comparamos nossas estratégias com o método ingênuo de testagem e com métodos alternativos de agrupamento matricial. E, principalmente, nós oferecemos instruções práticas e diretas de agrupamento para laboratórios que executam testagens de larga escala por PCR para diagnóstico de partículas virais do SARS-CoV-2. Essas duas estratégias de agrupamento podem aliviar

o gargalo que atualmente impede a expansão de testagens para o SARS-CoV-2 ao redor do mundo.

Introdução

No esforço global de luta contra a pandemia do novo coronavírus, equipes médicas e laboratoriais se confrontaram com a necessidade de diagnosticar um número de amostras sem precedentes, enquanto simultaneamente enfrentam falta de pessoal, material e equipamentos de laboratório.

A necessidade de aumentar a escala da emissão de diagnósticos para amostras de milhares de pacientes foi respondida com ferramentas de vanguarda da biologia molecular, como sequenciamento de RNA com multiplex de “código-de-barras”, e os testes sorológicos podem, em breve ser capazes de verificar o status de imunidade de pacientes. Em vários lugares, porém, essas ferramentas podem estar indisponíveis para implementação imediata, e comumente exigem mais conhecimento especializado e são menos precisas que os testes de PCR normais já usados. Uma forma mais simples de conseguir aumentar a emissão de diagnósticos seria o método de PCR de alto volume via agrupamento de amostras, usado em pesquisas genéticas como forma de redução de custo de estudos de larga escala.

O procedimento mais comum de diagnóstico da presença do SARS-CoV-1 começa com uma coleta de amostra viral com swab naso-faríngeo e/ou buco-faríngeo do paciente. Após a lise, a desintegração das membranas das células/vírus da amostra, o procedimento de detecção envolve dois estágios:

Extração de RNA: contém RNA viral e também RNA humano (posteriormente usado no controle da extração) obtidos usando os procedimentos padrão de extração de RNA.

Transcriptase Reversa em Uma Etapa (Single Step RT): Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (RT-qPCR) é efetuada sobre os RNA viral e humano de controle. Então, na reação RT-qPCR, o RNA extraído por transcriptase reversa para um *template* de fita dupla de cDNA. Em seguida, a reação é repetida em ciclos, aumentando o fragmento-alvo de cDNA exponencialmente, dobrando a quantidade do fragmento a cada ciclo. Em uma reação qPCR típica, essa amplificação se repete por 42 ciclos. O ciclo em que o sinal fluorescente ultrapassa o limite determinado está ligado à concentração inicial cDNA alvo. Na prática, se a presença de cDNA viral ampliado é detectada significativamente antes de um dado número de ciclos (por exemplo 30), o paciente é declarado positivo. Se o cDNA ampliado não é detectado, ou só é detectado nos ciclos finais (por exemplo no 40º), o paciente é declarado negativo.

A reação RT-qPCR é a etapa do processo que mais consome tempo e reagentes. Relatos vindos de diversas partes do mundo identificam a reação RT-qPCR como um dos gargalos primários da testagem de COVID-19 – cada tubo de amostra testado requerendo reagentes progressivamente escassos à medida que mais e mais reações PCR são feitas globalmente. Laboratórios começaram a demonstrar que a SARS-Cov_2 pode ser detectada em RT-qPCR feito com agrupamento de amostras, apesar da possível diluição. O material utilizado pelos métodos de agrupamento é RNA extraído de amostras individuais, mesmo que também possam ser usadas combinações de amostras “cruas” dos pacientes, antes mesmo da lise e da extração. Seu objetivo é identificar a presença de RNA viral sem precisar fazer a reação RT-qPCR em cada amostra individualmente.

Para entender as vantagens de uma abordagem por agrupamento, considere um laboratório que tenha recebido $N=1000$ amostras, com uma frequência de casos positivo $p = 1/1000$. Usando uma abordagem ingênua, de testar cada amostra, 1000 testes serão feitos. Porém, se as amostras forem agrupadas, por exemplo, em 10 remessas de $r = 100$ amostras cada, é provável que 9 das 10 remessas tenham resultado negativo. Cada resultado negativo obtido por uma única reação RT-qPCR foi então capaz de determinar o resultado negativo de 100 amostras individuais, sem que fosse necessário testar cada uma das amostras. As amostras das remessas que derem resultado positivo podem então ser processadas individualmente, ou divididas em remessas menores. Ambas as abordagens aumentam significativamente a eficiência das testagens.