

Desarrollo y Validación Clínica de un Hisopo Monolítico para Toma de Muestra Nasofaríngea en el diagnóstico de COVID-19

Mag. Ing. Tomás ECHARRI*, Ing. Carlos Luis LLORENTE*, Ing. Juan Manuel ECHARRI*,
 Inga. Leticia Anahí AZPEITIA*, Ing. Facundo URRUTUPI*, Ing. Ángel Joaquín MARTINEZ*,
 Dra. Inga. Kyung Won KANG*, Ing. Juan Manuel LOPEZ**, Farm. Pablo DE ARAQUISTAIN**,
 Dis. Textil María Luz FLORES**, Ing. José Francisco LOPEZ**, Sr. Alejandro SIMONETTI**.

[*] Facultad de Ingeniería - Universidad Nacional de La Plata (FI-UNLP).

[**] PS Anesthesia S.A. (PSA).

1. Introducción

La pandemia de COVID-19 provocó el desabastecimiento de insumos sanitarios a nivel mundial y en particular la cadena de suministros de técnicas de diagnóstico molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), sufrieron una demanda sin precedentes. Si bien los hisopos nasofaríngeos flocados (HNF) son el estándar dorado en la toma de muestras microbiológicas, durante la primera ola se desarrollaron alternativas para suplir la oferta en el corto plazo. A nivel local, por resolución del poder ejecutivo nacional, los hisopos con tubo de transporte fueron declarados insumos sanitarios críticos. En este contexto, la empresa PS Anesthesia S.A. (PSA) solicitó asesoramiento en el desarrollo de un kit para toma de muestra nasofaríngea. En mayo de 2020 comenzaron las actividades de investigación y desarrollo, que se materializaron en un hisopo nasofaríngeo prototipo integrante de un kit que contiene los insumos para la toma, recolección y transporte de muestras microbiológicas. La particularidad del hisopo nasofaríngeo desarrollado es su construcción monolítica (HNM) adaptada al proceso de moldeo por inyección, que prescinde del proceso de adhesión de microfibras para la captura de muestra.

La recolección de muestra nasofaríngea es el procedimiento recomendado por la CDC [1] en el diagnóstico de COVID-19. La lista de hisopos nasofaríngeos (HN) aprobados por la FDA [2] son en su amplia mayoría flocados. A pesar que existe evidencia sobre la capacidad de detección con hisopos de dacrón [3], debido a las dimensiones típicas de la torunda y excesiva rigidez, no son apropiados para la toma de muestra nasofaríngea. Durante la ejecución de los ensayos se utilizó como HNF de control el producto CM-FS915 fabricado por Yancheng Huida Medical Instruments que cuenta con autorización ANMAT [4]. Este HNF es geoméricamente similar al modelo FLOQSwab 503CS01 pero con quiebre a los 80mm, el cuerpo es inyectado en ABS y posee un flocado con fibras de Nylon de 15 μm de diámetro medio.

2. Desarrollo

Para sustituir a los HNF exitosamente es primordial conseguir los niveles de captura y elución de este producto, imitando su adaptación al sitio anatómico para garantizar el confort. El concepto de diseño (Figura 1) es de construcción monolítica, adaptado al proceso de moldeo por inyección. Está compuesto por una región proximal (mango) y una región distal con una transición flexible (cuello), que se extienden a ambos lados de una entalla en V (punto de quiebre). El extremo distal (cabeza) posee canales circunferenciales, con un acabado superficial texturado [5]. La única operación necesaria en la fabricación del HNM es el moldeo por inyección de termoplásticos. En este producto tanto el principio de funcionamiento como la baja tolerancia a los defectos de la pieza, imponen cotas en las tallas características de las formas constructivas que le confieren al proceso de fabricación una dificultad tecnológica similar a la micro-inyección. El producto requiere una resina compatible con la técnica de ensayo, biocompatible de acuerdo con ISO 10993 y apta para el proceso de moldeo por inyección. Las resinas poliméricas preseleccionadas fueron polipropileno (PP) y acrilonitrilo butadieno estireno (ABS). El PP producido en el país se emplea como materia prima para aplicaciones alimenticias, sus ventajas son la buena procesabilidad y bajo costo. El ABS

permite disminuir las secciones transversales estructurales, facilita la separación del cuerpo (fractura) y posee mayor afinidad con geles de base acuosa.



Figura 1. Forma geométrica del hisopo nasofaríngeo monolítico.

Regiones: cabeza (magenta); cuello (rojo); apoyo (amarillo); punto de quiebre (verde); mango (azul)

2.1. Prototipado

De un total de dieciocho (18) variantes geométricas (Protoformas), cuatro (4) fueron preseleccionadas para ejecutar pruebas de mecanización del molde de prototipado (Protomolde). A partir de la composición química y caracterización térmica de las resinas, se efectuó el filtrado de bases de datos para la estimación de los parámetros de procesamiento. Para ejecutar las pruebas de inyección fueron seleccionadas tres (3) resinas, generando para generar un total de doce (12) prototipos, producto de las combinaciones de materiales y protoformas.

El envase primario utilizado está conformado por laminas mixtas de papel grado médico y polímero (PET o PP) termo-sellables aptas para esterilización con óxido de etileno (EO). La esterilización por EO elimina organismos vivos, desnaturaliza ADN y RNAsas [6], pero no impide que sustancias contaminantes como pirogénos u otros, puedan coexistir con el producto.

La presencia de defectos micro geométricos en la región adsorbente, potenciales causantes de incomodidad o daño en el tejido durante la captura de muestra, fue analizada durante la puesta a punto del proceso de fabricación. Los defectos congénitos de los prototipos, originados por las imperfecciones constructivas del protomolde, se cuantificaron dimensionalmente por MO estereoscópica. Para la detección y caracterización de potenciales contaminantes inhibidores de la reacción RT-PCR se utilizó microscopía SEM y microanálisis EDS.



Figura 2. Prototipo esterilizado (EO) en envase *peel pouch*.

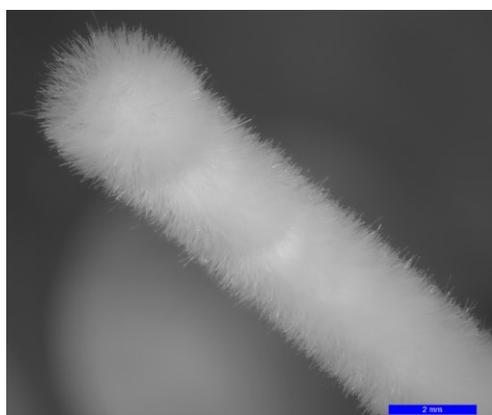


Figura 3. Extremo distal CM-FS915.

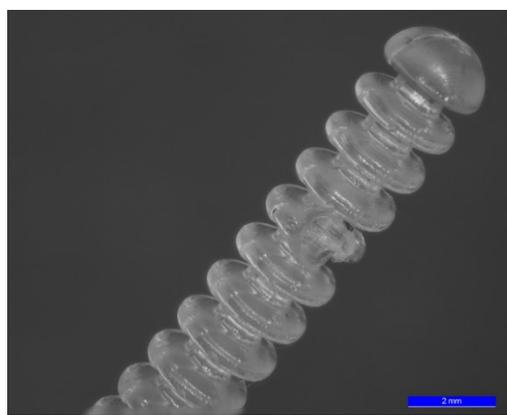


Figura 4. Extremo distal prototipo.

2.2. Ensayos Mecánicos

Para evaluar la respuesta mecánica a la tracción fueron ensayados especímenes prototipo esterilizados y comparados con el HNF de control utilizando como referencia la norma ASTM D638. Para evaluar la respuesta mecánica a la flexión se efectuaron ensayos con deformación controlada por desplazamiento del extremo distal, observando restitución elástica completa. La fuerza transversal de equilibrio en los respectivos estados de deformación se utilizó para comparar la rigidez de los Prototipos respecto al Control. Adicionalmente se efectuó un ensayo de flexión pura con deformación controlada por un radio de curvatura de 15mm, a partir del cual se observó la magnitud del estado de deformación permanente. Para evaluar la respuesta de los prototipos ante un estado de torsión flexión-alternativa se utilizó una configuración de viga rotante con deformación controlada por la pendiente en el extremo distal. La capacidad de carga a compresión se evaluó permitiendo solo la rotación de uno de los extremos, simulando las restricciones durante el acceso y tránsito hacia la nasofaringe. La magnitud de la fuerza de compresión fue adquirida mientras se controla el desplazamiento, el primer máximo registrado se asocia con la bifurcación al modo de flexión (pandeo). En los prototipos inyectados con PP (protoformas 1, 2 y 3) se obtuvieron fuerzas críticas de hasta un 33% por debajo del control.

2.3. Ensayos Preclínicos

En los ensayos preclínicos se realizó la evaluación in vitro de la cantidad de muestra capturada, su elución en el medio de transporte microbiológico y la no inhibición de las pruebas RT-PCR. La capacidad de adsorción in vitro fue utilizada como indicador de la eficacia en la captura de muestra biológica y permitió evaluar el desempeño de los HN prototipos en relación con el control, sin la variabilidad introducida por sitio anatómico. Los ensayos de compatibilidad RT-PCR permiten la detección de inhibidores presentes en la MP o incorporados durante el proceso de fabricación.

La capacidad de adsorción fue calculada a partir de la diferencia entre la tara y el peso bruto de cada HN, luego de estar en contacto con una sustancia de comportamiento efectivo similar a la muestra biológica simulada [7]. Debido a que el diseño experimental in vitro no reproduce las restricciones de espacio del sitio anatómico, la capacidad determinada mediante este procedimiento no es representativa del desempeño de los HN ensayados. El análisis comparativo de la capacidad de recolección relativa de los HNM prototipos se muestra en la Figura 5.

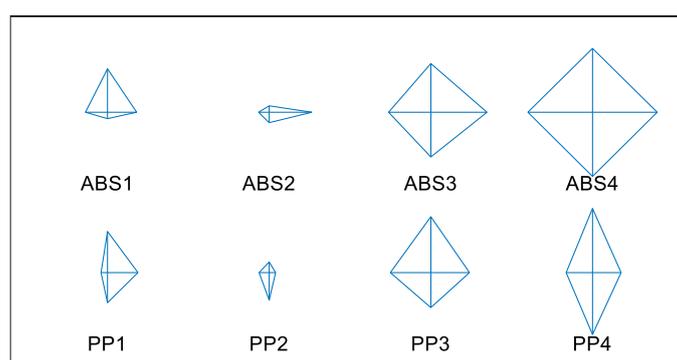


Figura 5. Comparación de la masa capturada por prototipo.
Dimensiones: izq. Gel 75%; der. Agua; sup. Sol. Abuff.; inf.: Gel.

3. Discusión

En los ensayos clínicos de fase cero se evaluó comparativamente el desempeño del HNM prototipo y el HNF de control CM-FS915 (ANMAT: PM-1292-34) en términos de uso, adaptación al sitio anatómico, eficacia en la captura de muestra y compatibilidad con la técnica utilizada en el diagnóstico de COVID-19. En el diseño experimental se realizaron

hisopados apareados siguiendo el protocolo usual en la toma de muestras, en los cuales cada paciente es intervenido exclusivamente con un (1) HN control en una de las fosas nasales y un (1) HN prototipo en la restante (Tabla 1), minimizando la sobre representación de las poblaciones por HN prototipo y fosa nasal. A partir de los resultados obtenidos se realizó la evaluación del desempeño de los HNM en términos de uso, adaptación al sitio anatómico, eficacia en la captura de muestra y compatibilidad con la técnica RT-PCR utilizada en el diagnóstico de COVID-19.

Para la ejecución de las pruebas se realizó una convocatoria pública con un total de sesenta y un (61) voluntarios participantes. El total de los voluntarios participaron en el ensayo de confort, diecisiete (17) de los cuales fueron seleccionados para realizar la prueba RT-PCR SARS-CoV-2 y por lo tanto excluidos del ensayo de captura in vivo.

Tabla 1. Hisopos nasofaríngeos empleados en las pruebas clínicas.

Hisopo	Especificaciones
Prototipo	Protoforma 3 cPP/hPP
Control	CM-FS915, ANMAT: PM-1292-34

3.1. Ensayo de Confort

El nivel de confort del prototipo fue evaluado a partir de la percepción del dolor por parte del paciente en la fosa nasal intervenida. En las encuestas la percepción de dolor fue calificada en orden creciente según: leve, moderado e intenso. La frecuencia de percepción de dolor fue similar en ambos HN (control 41 – prototipo 34), mayormente de nivel leve (control 36 - prototipo 30) sin casos de dolor intenso y favorable al prototipo en todos los niveles. La concordancia del confort por paciente se muestra en la matriz (C) de la Figura 6, allí se observa que el acuerdo observado entre hisopos es bajo ($30/61= 0.49$) con un acuerdo aleatorio de similar magnitud (0.44, bajo κ), atribuible al carácter excluyente de la fosa nasal intervenida con el Prototipo y el Control (izquierda o derecha).

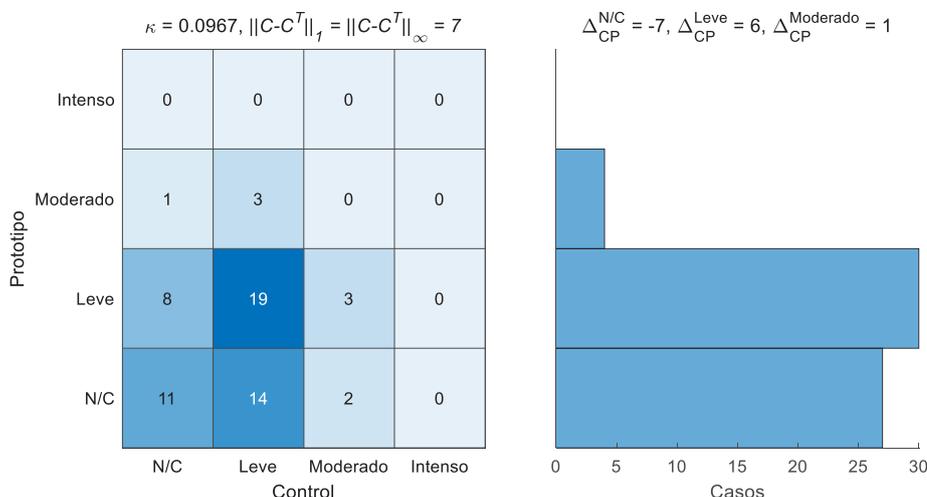


Figura 6. Nivel de dolor: concordancia (izq), histograma (der.).

3.2. Ensayo de Captura *in Vivo*

En el ensayo de captura in vivo se realizó la medición de la masa capturada mediante diferencia de pesada luego de la intervención. Los resultados muestran que en promedio el Prototipo obtiene aproximadamente un 50% de la masa capturada por el Control (Figura 7). En particular se observa la baja correlación ($r^2= 0.01$) entre la masa capturada por el Control y Prototipo (Figura 7 izq.).

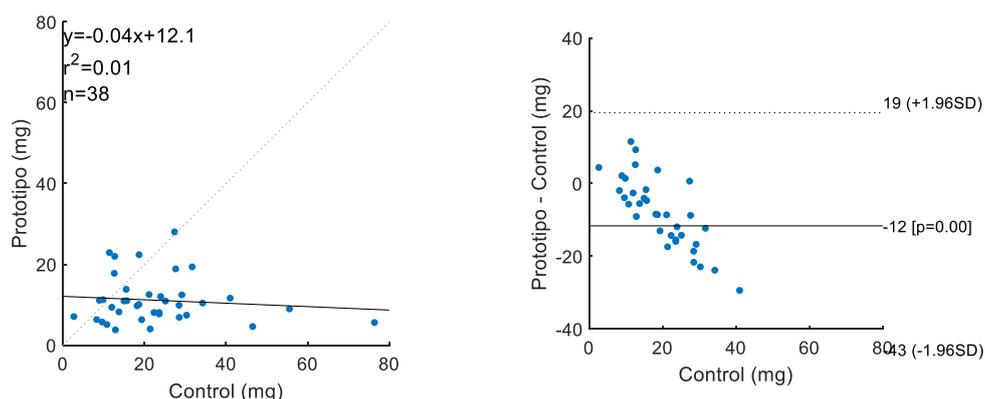


Figura 7. Masa capturada in vivo: correlación (izq.); Bland-Altman (der.).

3.3. Prueba RT-PCR

En la ejecución de las pruebas apareadas RT-PCR, tanto el extremo distal del prototipo esterilizado (EO) como el control fueron sumergidos en 2mL de solución fisiológica 0.9% y mantenidos por debajo de 8°C hasta el envío al laboratorio responsable de las pruebas. Las muestras apareadas fueron analizadas dentro de las 24hs. de realizada la intervención empleando la prueba cobas® SARS-CoV-2 para su uso en Roche cobas® 6800 Systems (Tabla 2). En este sistema tanto la preparación de muestras, extracción y purificación de ácidos nucleicos, como el proceso de amplificación y detección se encuentran automatizados.

Los resultados de las pruebas RT-PCR sobre las muestras clínicas obtenidas con ambos hisopos, mostraron completo acuerdo en los ensayos cualitativos para la detección del SARS-CoV-2 empleados por el sistema Roche cobas® 6800 (Tabla 3). La amplificación (Ct) del IC en las muestras obtenidas no presenta una diferencia estadísticamente significativa entre prototipo y control, ni un corrimiento respecto de [+]Ctrl y [-]Ctrl, indicando la no inhibición de la prueba cobas® SARS-CoV-2. El análisis estadístico de los casos positivos muestra correlación significativa en la amplificación (Ct) de las regiones objetivo para la detección específica de SARS-CoV-2 (Figura 8) y de pan-Sarbecovirus (Figura 9).

Tabla 2. Estimación de la sensibilidad media de la prueba cobas® SARS-CoV-2.

LoD (NDU/mL)*	Desarrollador	Prueba autorizada**
1800	Roche Molecular Systems, Inc. (RMS)	cobas SARS-CoV-2

(* Limit of detection of nucleic acid amplification testing detectable units. (**) FDA: EUA200009/A001.

Tabla 3. Concordancia de la prueba cobas® SARS-CoV-2.

ORF1ab /Gen-E		Prototipo	
		Detectable [+]	No detectable [-]
Control	Detectable [+]	7*	0
	No detectable [-]	0	10*

(* Completo acuerdo por paciente.

Tabla 4. Amplificación (Ct) de targets cobas® SARS-CoV-2.

Target	Control Ct		Prototipo Ct	
	Media muestral	95% CI	Media muestral	95% CI
ORF1ab*	27.98	[23.41, 32.55]	28.99	[23.01, 34.98]
Gen-E**	28.78	[23.83, 33.73]	30.12	[23.37, 36.87]
IC***	33.86	[33.37, 34.35]	33.63	[33.35, 33.91]

(* N=7; [+]Ctrl Ct = 33.34. (**) N=7; [+]Ctrl Ct = 35.08. (***) N = 17; [+/-]Ctrl Ct = 33.38/33.60.

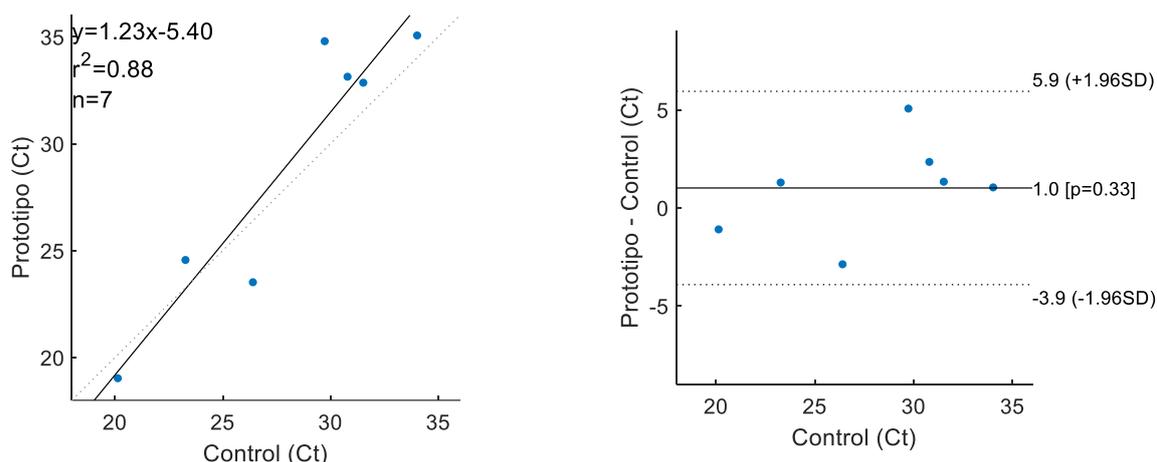


Figura 8. ORF1 ab Ct: correlación (izq.); Bland-Altman (der.).

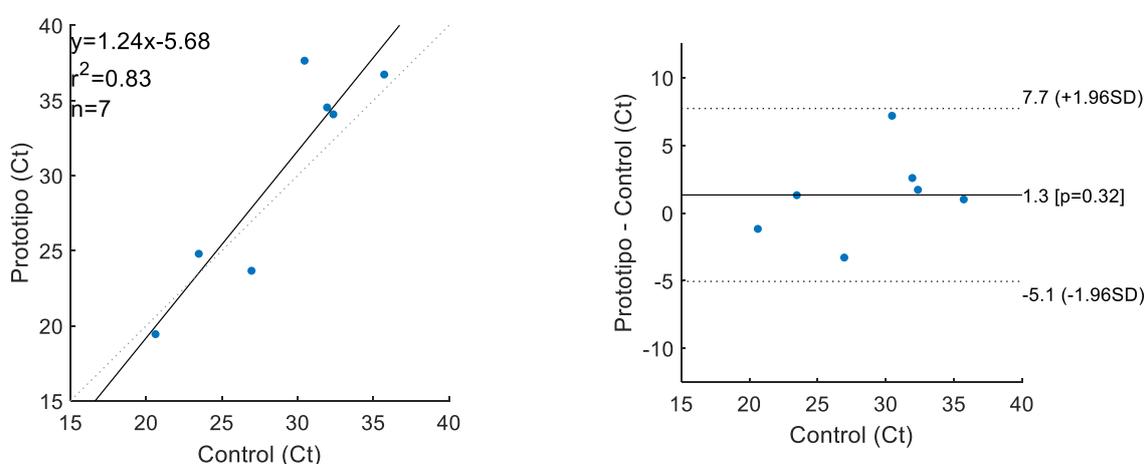


Figura 9. Gen-E Ct: correlación (izq.); Bland-Altman (der.).

4. Conclusiones

El producto desarrollado posibilita la fabricación nacional de un insumo crítico, desvinculando al país de la oferta externa ante una situación que presenta, en simultáneo, una demanda interna extraordinaria y debilidad de las cadenas de suministro a escala mundial. PSA ha iniciado el trámite de registro del producto HNM en la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). El mismo se ha inscripto bajo emergencia sanitaria COVID-19 como producto clase I-II y actualmente se encuentra en revisión. Las actividades desarrolladas contaron con el apoyo del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de la Nación (MinCyT) y motivaron la creación del consorcio PSA-UNLP

La FDA [11] provee recomendaciones para la validación de hisopos no tradicionales, en particular orientadas a hisopos monolíticos obtenidos por manufactura aditiva [12]. Respecto a las pruebas clínicas la NIH [13], recomienda incluir un mínimo de 30 muestras positivas y un mínimo de 30 muestras negativas. Agrega que la prueba podría llevarse a cabo en un diseño de experimento apareado molecular (PCR) o detección de antígeno y debe cumplir con una efectividad mínima del 95% tanto en los casos positivos como negativos.

5. Referencias

- [1] “Interim Guidelines for Clinical Specimens for COVID-19 | CDC.” <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/guidelines-clinical-specimens.html> (accessed Feb. 21, 2021).
- [2] FDA, “Establishment Registration & Device Listing,” pp. 12–13, 2013, Accessed: Feb. 21, 2021. [Online]. Available: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfRL/rl.cfm>.
- [3] A. Kline *et al.*, “Dacron swab and PBS are acceptable alternatives to flocculated swab and viral transport media for SARS-CoV-2,” *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 99, no. 1, p. 115209, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2020.115209.
- [4] ANMAT, “Helena - Productos Médicos v2.0.0.0.” <https://helena.anmat.gob.ar/Boletin/> (accessed Feb. 21, 2021).
- [5] R. Novak, “Wyss Institute Injection Molded Nasopharyngeal Swab Summary.” Correspondencia privada sin publicar, 2020.
- [6] K. Shaw *et al.*, “Comparison of the effects of sterilisation techniques on subsequent DNA profiling,” *Int. J. Legal Med.*, vol. 122, no. 1, pp. 29–33, 2008, doi: 10.1007/s00414-007-0159-5.
- [7] S. K. Lai, Y. Y. Wang, D. Wirtz, and J. Hanes, “Micro- and macrorheology of mucus,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 61, no. 2. Adv Drug Deliv Rev, pp. 86–100, Feb. 27, 2009, doi: 10.1016/j.addr.2008.09.012.
- [8] N. Gallup, A. M. Pringle, S. Oberloier, N. G. Tanikella, and J. M. Pearce, “Parametric nasopharyngeal swab for sampling COVID-19 and other respiratory viruses: Open source design, SLA 3-D printing and UV curing system,” *HardwareX*, vol. 8, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.ohx.2020.e00135.
- [9] O. Lafforgue, N. Bouguerra, S. Poncet, I. Seyssiecq, J. Favier, and S. Elkoun, “Thermophysical properties of synthetic mucus for the study of airway clearance,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 105, no. 11, pp. 3025–3033, Nov. 2017, doi: 10.1002/jbm.a.36161.
- [10] S. A. I. Global, F. Iso, and C. License, “Biological evaluation of medical devices - Part 1: Evaluation and testing within a risk management process (ISO 10993-1:2009),” vol. 44, 2000, Accessed: Feb. 20, 2021. [Online]. Available: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:10993:-1:ed-5:v2:en>.
- [11] United States Food and Drug Administration, “COVID-19 Test Settings: FAQs on Testing for SARS-CoV-2,” 2020. <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-covid-19-and-medical-devices/faqs-testing-sars-cov-2#swab> (accessed Feb. 20, 2021).
- [12] Food and Drug Administration, *Technical Considerations for Additive Manufactured Medical Devices: Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff Document*. 2017.
- [13] “COVID-19 | NIH 3D Print Exchange.” <https://3dprint.nih.gov/collections/covid-19-response/nasal-swabs> (accessed Feb. 20, 2021).