

EL ROL DEL LABORATORIO DE VIROLOGIA EN LA PANDEMIA DE COVID-19: DIAGNOSTICO DE SARS-CoV-2

Bioq. Daniela Borgia, Dras. Daniela Ríos, Andrea Mangano

RESUMEN

Desde el inicio de la pandemia de COVID-19, el Laboratorio de Virología del Hospital Garrahan, implementó el diagnóstico molecular de SARS-CoV-2 mediante RT-PCR para dar respuesta rápida y de calidad a la creciente demanda. Al diagnóstico pediátrico se sumó el diagnóstico de los padres / acompañantes y personal de salud con criterio de caso sospechoso. Al inicio del 2021 se incorporó el test rápido de detección de antígeno para pacientes sintomáticos. Hasta junio de 2021 se procesó un total de 58 000 muestras para estudios moleculares.

Palabras clave: COVID-19, diagnóstico molecular, pediatría.

Medicina Infantil 2021; XXVIII: 105 - 109.

ABSTRACT

Since the beginning of the COVID-19 pandemic, the Virology Laboratory of Garrahan Hospital has implemented molecular diagnosis of SARS-CoV-2 using RT-PCR in order to provide a rapid and high-quality response to the growing demand. In addition to the pediatric diagnosis, the diagnosis of parents/companions and healthcare personnel meeting the criteria of a suspected case was also added. At the beginning of 2021, the rapid antigen detection test for symptomatic patients was incorporated. Until June 2021, a total of 58,000 samples were analyzed by molecular studies.

Key words: COVID-19, molecular diagnosis, pediatrics.

Medicina Infantil 2021; XXVIII: 105 - 109.

INTRODUCCION

Desde la notificación de los primeros casos de COVID-19 producidos por el SARS-CoV-2 en Wuhan (China) a fines de diciembre de 2019, el Laboratorio de Virología Clínica comenzó a prepararse para poder realizar los estudios moleculares de diagnóstico

previando la posible llegada del virus a nuestro país. El 3 de marzo se confirmó el primer caso de COVID-19 en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. El 9 de marzo se realizó en el hospital el primer testeo molecular en un caso sospechoso con antecedente de viaje a España y con síndrome gripal de dos días de evolución. El resultado fue "no detectable" y se descartó la infección. Luego de recibir la capacitación nacional por el INEI-ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán y de la Organización Panamericana de la Salud, como integrantes de la Red Nacional de Vi-

Laboratorio de Virología Clínica,
Unidad de Virología y Epidemiología Molecular-CONICET.
Servicio de Microbiología.
Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan.

rus Respiratorios, el laboratorio quedó oficialmente habilitado para el diagnóstico molecular de SARS-CoV-2 según el método de referencia Charité (genes virales *E*, *RdRp* y gen celular *RNAse P*).

A diferencia del diagnóstico de virus respiratorios en pediatría que se realiza habitualmente en nuestro laboratorio, la emergencia de este nuevo coronavirus requirió la incorporación del diagnóstico del padre, madre o acompañante del niño y del agente de salud con criterio de caso sospechoso. Para dar respuesta a esta nueva demanda hospitalaria, el laboratorio se adaptó ampliando el diagnóstico de COVID-19 a distintos grupos etarios. Además, ante la alta demanda y la necesidad de identificar casos positivos para cohortizar y aislar a los pacientes adecuadamente, se reorganizó el diagnóstico molecular de SARS-CoV-2 con entregas de resultados cada 8 horas incorporando la guardia del laboratorio de Virología.

Por otra parte, durante marzo de 2021, se implementó la detección rápida de antígeno de SARS-CoV-2 habilitando un laboratorio periférico cerca del sector de Emergencia y adyacente a los *trailers* de toma de muestra para agilizar el egreso de los pacientes con seguimiento ambulatorio.

El objetivo de este trabajo fue realizar una breve descripción del abordaje del diagnóstico de laboratorio de SARS-CoV-2 en el Hospital Garrahan.

Diagnóstico de SARS-CoV-2

La enfermedad por COVID-19 tiene un período de incubación de alrededor de 2 a 7 días, y se estima que la infectividad comienza 2 a 3 días antes del inicio de los síntomas y decae alrededor del día 7. El pico de carga viral en el tracto respiratorio superior coincide con el inicio de los síntomas y la excreción de virus infectivo es alrededor de los 2 o 3 días del mismo¹⁻⁶. Tanto en pacientes sintomáticos como asintomáticos el pico de carga viral es similar. Sin embargo, en los individuos sintomáticos la excreción de ARN viral se produciría en mayores cantidades y por períodos más prolongados. El genoma viral puede detectarse hasta 6 semanas desde el inicio de los síntomas⁷. La mayoría de los pacientes resuelven la enfermedad de COVID-19 en una a dos semanas, cuyo tiempo coincide con la seroconversión de anticuerpos de tipo IgG.

Dado que la COVID-19 es una enfermedad de denuncia obligatoria ante sospecha; toda muestra que ingresa al laboratorio debe estar acompañada de la correspondiente ficha epidemiológica y debe ser denunciada de inmediato en el Sistema Integrado de Información Sanitaria Argentina (SISA)⁸.

Toma, conservación y transporte de la muestra para diagnóstico molecular

El diagnóstico de SARS-CoV-2 se realiza en **muestras respiratorias altas** (hisopado nasofa-

ríngo, hisopado nasal + faríngeo, hisopado nasal, saliva) en el período agudo de la infección, y en **muestras respiratorias bajas** (aspirado traqueal, lavado broncoalveolar, esputo no inducido) pueden ser útiles en un período posterior o en pacientes ventilados. La muestra de elección es el **hisopado nasofaríngeo** por tener mayor rendimiento en el diagnóstico. El objetivo del procedimiento es obtener células superficiales del epitelio respiratorio que presenten el virus. Si el proceso fue realizado correctamente, no es necesario realizar el procedimiento en ambas narinas. Las muestras de hisopados deben ser tomadas con un hisopo de dacrón, poliéster, rayón o *nylon* con mango plástico o de aluminio. Los hisopos flexibles y de cabeza pequeña son ideales para la toma de este tipo de muestra en general y en especial en pediatría. No pueden utilizarse hisopos de algodón con mango de madera dado que inhiben la reacción de PCR. La adecuada toma de muestra resulta fundamental para minimizar la posibilidad de falsos negativos.

En situaciones clínicas especiales donde no sea posible la toma del hisopado nasofaríngeo (ej. pacientes con plaquetopenia, quemados, anomalías de tabique, etc.) o en pediatría para disminuir las molestias producidas por el procedimiento, pueden obtenerse muestras menos invasivas como el hisopado nasal, hisopado de fauces o muestra de saliva⁹. Cabe mencionar que estas muestras pueden presentar menor rendimiento virológico.

Los operadores deben contar con el equipo de protección personal adecuado, el cual incluye respirador N95, protección ocular y camisolín hidrorrepelente.

La toma de muestra para diagnóstico debe realizarse preferentemente dentro de las primeras 72 hs desde el inicio de los síntomas y en caso de realizarse en forma muy temprana sin rescate viral y existir una elevada sospecha diagnóstica debería solicitarse una nueva muestra a las 48 hs^{9,10}.

Las muestras deben ser transportadas en triple envase para asegurar las condiciones de bioseguridad requeridas por este tipo de agente viral y enviadas de forma inmediata al laboratorio. De lo contrario, se podrá conservar a 4 °C por no más de 24 hs.

Diagnóstico molecular de SARS-CoV-2 mediante RT - PCR en tiempo real

Las muestras deberán ser procesadas en laboratorios de seguridad biológica tipo 2 (BSL2) en cabinas validadas. Los operadores deberán utilizar equipos de protección personal que incluya respirador N95, protección ocular y camisolín hidrorrepelente⁸.

El procesamiento de la muestra contempla diversas etapas: homogeneización y preparación de la muestra, extracción de los ácidos nucleicos virales

(ARN), (métodos manuales, semiautomatizados y totalmente automatizados), equipo de RT-PCR en tiempo real y análisis de los resultados e informe de los mismos al sistema hospitalario y al SISA.

El método de diagnóstico de referencia para la detección de la fase aguda de la enfermedad es la retrotranscripción seguida por la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR). Esta técnica permite identificar el ARN genómico del virus. Esta metodología presenta alta especificidad (100%) y sensibilidad (>95%).

Actualmente, en el mercado local, se dispone de una gran variedad de tests diagnósticos aprobados por la ANMAT con diferentes genes blanco y diversos formatos comerciales. Algunos de ellos detectan un único gen viral (*singleplex*) mientras que otros tienen la capacidad de detectar dos o más genes del virus (en formato *singleplex* o *multiplex*). La mayoría de los ensayos utiliza alguno de los siguientes genes virales: gen *E* de la envoltura (propio del género *Sarbecovirus*), los genes de la *RdRp* de la ARN polimerasa viral, el gen *N* de la nucleocápside y el gen *S* de la proteína "spike". Todos los ensayos incluyen la detección de un gen que permite controlar el proceso y la presencia de inhibidores. Algunos formatos utilizan un control interno sintético, y otros buscan la presencia de un gen celular constitutivo, el cual a su vez permite controlar la calidad de la muestra. Éste último es de gran importancia dado que disminuye la posibilidad de falsos negativos causados por una toma de muestra inadecuada.

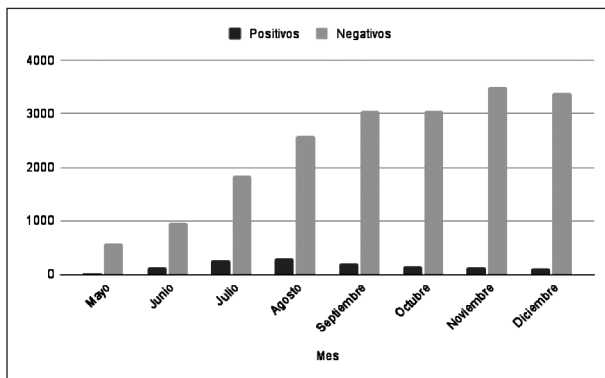


Figura 1: Demanda mensual de diagnóstico molecular de SARS-CoV-2 de pacientes y acompañantes desde el 9 de marzo hasta el 31 de diciembre de 2020 y resultados obtenidos.

Para el análisis de los resultados deberán tenerse en cuenta las especificaciones técnicas recomendadas por cada fabricante, dado que los puntos de corte para cada gen varían según el *kit* utilizado.

El informe de los ensayos moleculares de SARS-CoV-2 es de tipo cualitativo y permite categorizar a la muestra como 'DETECTABLE' o 'NO DETECTABLE', sin brindar información acerca de la carga viral de la misma. Ante la presencia de casos con alta sospecha clínica y resultado NO DETECTABLE es importante realizar la toma de una nueva muestra a las 48 h y repetir el ensayo^{3,11}.

Otro punto para tener en cuenta es que un resultado DETECTABLE de PCR refleja la detección del ARN viral y no indica la severidad ni la presencia de virus viables, es decir, con capacidad infectiva.

Además del diagnóstico molecular de SARS-CoV-2 mediante RT-PCR en tiempo real, se dispone de otros ensayos moleculares como la amplificación isotérmica en varios formatos: con o sin extracción previa de ácidos nucleicos, muestra individual o múltiples muestras en forma simultánea y observación de los resultados en forma visual o por medio de instrumentos. Si bien la sensibilidad puede ser menor que la de la RT-PCR, su especificidad es comparable y son metodologías aceptadas y usadas en distintos escenarios de testeo. Las principales ventajas de estos ensayos consisten en que permiten reducir el tiempo de respuesta y, en algunos casos, se pueden realizar en laboratorios de menor complejidad, incluso sin necesidad de disponer de cabinas de seguridad biológica de tipo 2, porque la muestra se inactiva al inicio del proceso. Estas características son de gran utilidad para su empleo en las estrategias de testeo masivo con el objetivo de realizar una pesquisa temprana para la identificación de casos positivos y una intervención rápida de las medidas epidemiológicas necesarias para evitar la transmisión viral.

Es importante destacar que los resultados de los estudios moleculares, deben ser siempre interpretados teniendo en cuenta el contexto clínico y epidemiológico.

Test de antígeno para SARS-CoV-2

Las pruebas de detección de antígenos del SARS-CoV-2, que determinan la presencia de los dominios S1 y S2 de la de la proteína S, constituyen una alternativa diagnóstica de gran utilidad, sobre todo en lugares que no cuentan con el equipamiento adecuado para el diagnóstico molecular¹²⁻¹⁴. Permiten realizar un diagnóstico confirmatorio rápido (30 min) en casos sospechosos que presenten síntomas leves o moderados durante los primeros 7 días desde el inicio de los mismos⁹. Si bien estos métodos presentan una adecuada especificidad, su sensibilidad es menor a la de los métodos moleculares, por lo que su uso se recomienda en escenarios de transmisión comunitaria con mediana o alta prevalencia de casos. Ante una alta sospecha diagnóstica y un *test* rápido negativo se aconseja la confirmación mediante métodos moleculares.

Experiencia del laboratorio de virología en el diagnóstico de SARS-CoV-2 durante la pandemia

Desde el 9 de marzo al 31 de diciembre de 2020 se realizaron 33 890 determinaciones moleculares totales. De ellas, el 69,4% correspondían a muestras del Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan. Además, durante los meses de abril y mayo este laboratorio colaboró con el Ministerio de Salud de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires realizando 997 (2,9%) determinaciones de pasajeros alojados en hoteles destinados a aislamientos en la Ciudad de Buenos Aires y de julio a noviembre, se realizaron

9383 (27,7%) determinaciones de casos sospechosos del programa Detectar del Ministerio de Salud de la Nación procedentes de La Matanza.

De las 23 510 muestras del Hospital Garrahan estudiadas durante 2020, el 6,8% fueron positivas. Este porcentaje incluye muestras de pacientes pediátricos y sus acompañantes.

En la Figura 1 se muestra la distribución de la demanda mensual indicando el número de pacientes positivos y negativos para SARS-CoV-2. En el mismo se observa el incremento de la demanda durante los primeros meses de pandemia que alcanzó en promedio las 3000 determinaciones mensuales desde septiembre hasta diciembre.

En la Figura 2 se observa el porcentaje de casos confirmados en las diferentes semanas epidemiológicas (SE) del año 2020. Entre las SE 27 y 35 se observan dos picos que alcanzan porcentajes de positividad del 11,9% en la SE 28 y 11,4% en la SE 31.

De las 14 284 determinaciones moleculares de pacientes pediátricos el 45% correspondieron a casos sospechosos y el 55% a pacientes asintomáticos que fueron evaluados por otros motivos (ej. prequirúrgico, contacto estrecho, internación, etc.). El total de casos confirmados fue 616, con un porcentaje de positividad de 7,3% (n=464) en el grupo de sintomáticos y 1,9% (n=152) en el grupo de asintomáticos.

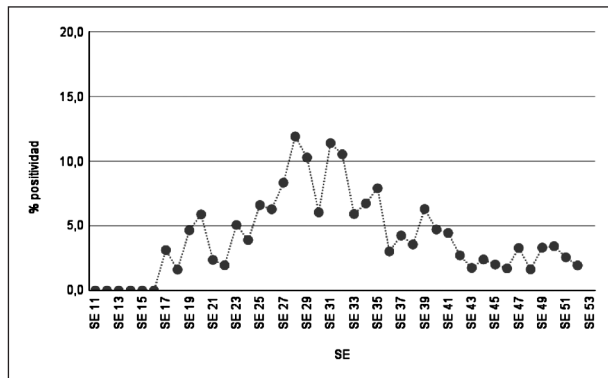


Figura 2: Casos de COVID-19 por semana epidemiológica del año 2020.

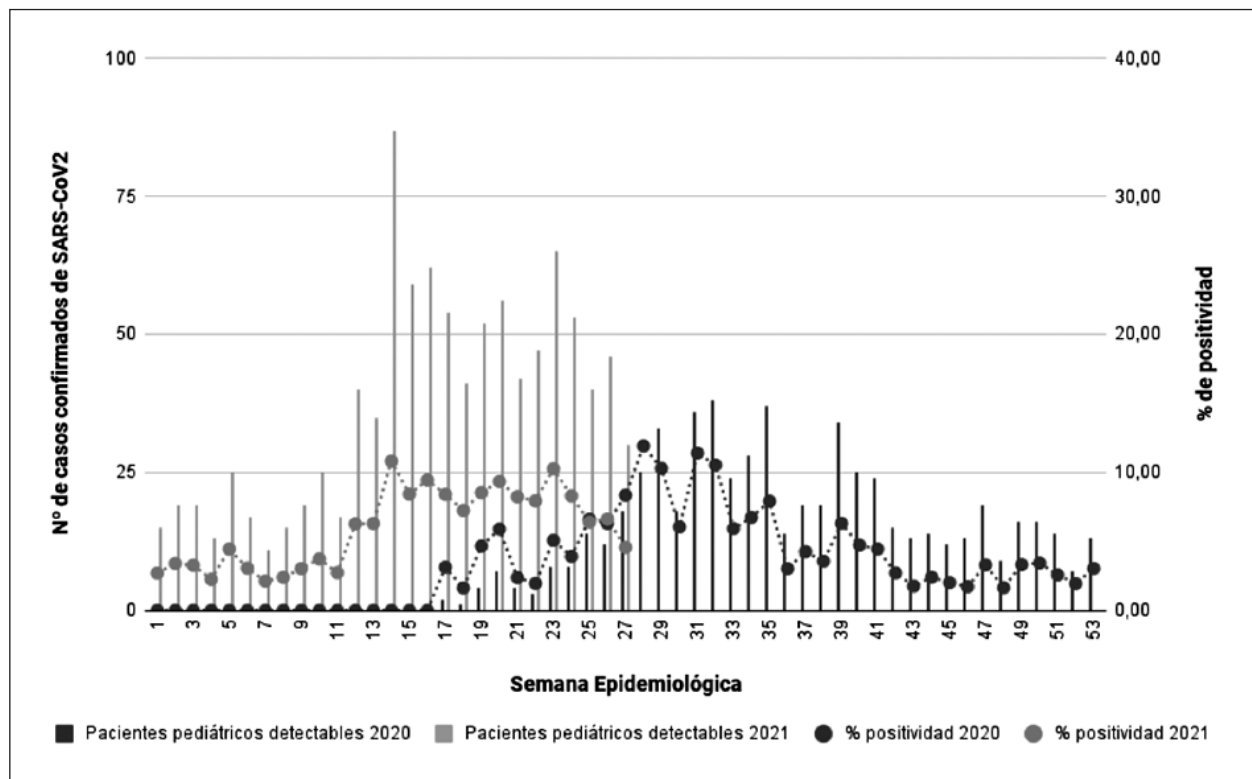


Figura 3: Número de casos confirmados y porcentaje de positividad durante los años 2020 y 2021.

Hasta la SE 27 del año 2021, se realizaron 15998 determinaciones moleculares y 899 tests rápidos y se obtuvo un total de 1004 casos confirmados de COVID-19 lo que representó un 6% del total de pacientes testeados. El porcentaje de pacientes testeados con y sin síntomas fue similar al del año 2020 (sintomáticos 49% y asintomáticos 51%). Sin embargo, se observó un pequeño incremento en el porcentaje de positividad en ambos grupos, 9% en pacientes sintomáticos (n=720) y 3% en asintomáticos (n=284).

En la Figura 3 puede observarse el número de casos confirmados y el porcentaje de positividad a lo largo de las SE durante el año 2020 y hasta la SE 27 del año 2021. Si bien el número de casos confirmados por semana epidemiológica durante algunas semanas del año 2021 ha superado ampliamente los valores del año 2020, el porcentaje de positividad semanal ha sido estable y mostró el aumento en la capacidad de testeo.

REFERENCIAS

1. Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng AC, et al. Pathophysiology, transmission, diagnosis, and treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a review. *JAMA* 2020; 324:782–93.
2. Arons MM, Hatfield KM, Reddy SC, et al. Presymptomatic SARS-CoV-2 infections and transmission in a skilled nursing facility. *N Engl J Med* 2020; 382: 2081-90.
3. He X, Lau EHY, Wu P, et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat Med* 2020; 26:672-5.
4. Long Q-X, Tang X-J, Shi Q-L, et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med* 2020; 26: 1200-4.
5. Lavezzo E, Franchin E, Ciavarella C, et al. Suppression of a SARS-CoV-2 outbreak in the Italian municipality of Vo'. *Nature* 2020; 584: 425-9.
6. Bullard J, Dust K, Funk D, et al. Predicting infectious SARS-CoV-2 from diagnostic samples. *Clin Infect Dis* 2020; 71: 2663-6.
7. Xiao AT, Tong YX, Zhang S. Profile of RT-PCR for SARS-CoV-2: a preliminary study from 56 COVID-19 patients. *Clin Infect Dis* 2020; 71: 2249-51.
8. <https://www.argentina.gob.ar/salud/coronavirus-COVID-19/laboratorio>. Mayo 2021.
9. <file:///E:/usuario/Downloads/covid-19-consenso-sobre-uso-de-pruebas-diagnosticas-para-sars-cov-2.pdf>. Mayo 2021.
10. World Health Organization. Clinical management of severe acute respiratory infection (SARI) when COVID-19 disease is suspected - Interim guidance [Internet]. 2020 [cited 2020 Mar 18]. Available from: <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1272156/retrieve>.
11. Kucirka LM, Lauer SA, Laeyendecker O, et al. Variation in false-negative rate of reverse transcriptase polymerase chain reaction-based SARS-CoV-2 tests by time since exposure. *Ann Intern Med* 2020; 173: 262-7.
12. D'Cruz RJ, Currier AW, Sampson VB. Laboratory testing methods for novel severe acute respiratory syndrome-Coronavirus-2 (SARS-CoV-2). *Front Cell Dev Biol* 2020; 8: 468.
13. Organización Panamericana de la Salud. Directrices de laboratorio para la detección y el diagnóstico de la infección por el virus responsable de la COVID-19 [Internet]. Disponible en: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/52471>. (último acceso: 15 de julio de 2020)
14. Center for Disease Control and Prevention. Interim guidance for rapid antigen testing for SARS-CoV-2. Disponible en: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antigen-tests-guidelines.html>. (último acceso: 1 de junio de 2021).