

PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA TOMA Y TRANSPORTE DE MUESTRAS PARA LA DETECCIÓN DE SARS-COV-2

La calidad de la muestra que recibe el laboratorio es crucial para realizar el proceso de detección, pero tres variables en particular son cruciales para garantizar calidad de los procesos de detección viral: (i) obtener una cantidad adecuada de muestra desde el lugar recomendado por los expertos; (ii) recolectar la muestra en el momento adecuado con respecto al desarrollo de los síntomas; y (iii) transportar y almacenar las muestras de tal manera que se pueda mantener la cadena de frío y minimizar el tiempo entre la toma y el análisis (1).

Según el consenso colombiano de atención, diagnóstico y manejo de la infección por SARS-COV-2 en establecimientos de atención de la salud del Grupo ACIN-IETS se recomienda el uso de RT-PCR con muestras de hisopado nasofaríngeo u orofaríngeo o de aspirado traqueal, nasofaríngeo u orofaríngeo, los cuales brindan una sensibilidad del 60-70% y reducen el riesgo de contaminación por formación de aerosoles (2).

Para la detección de virus respiratorios usando hisopado nasofaríngeo u orofaríngeo se recomienda que los hisopos esterilizados tengan un eje plástico de 10cm de largo (con una incisión que permite corte fácil a 8cm) ya que estos deben ser insertados a una distancia entre el orificio nasal y el oído (3,4).

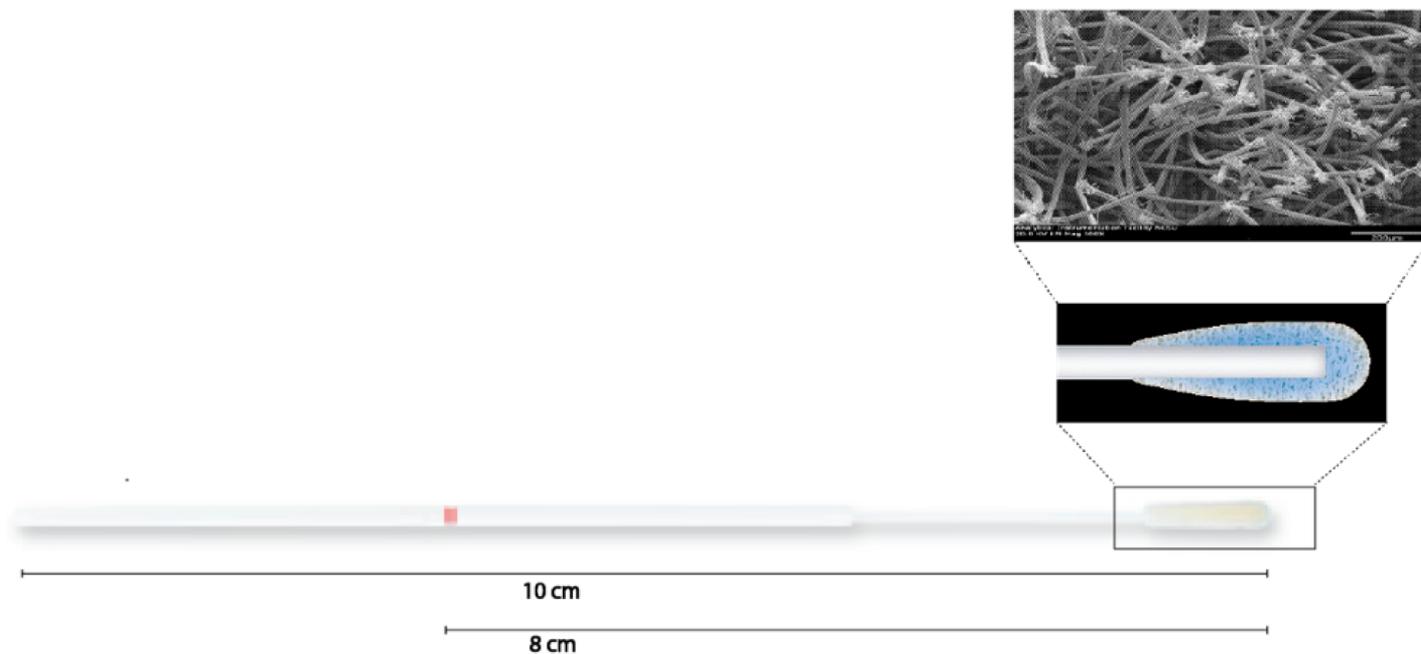


Figura 1. Ilustración del hisopo con fibras que tienen extremos terminales extendidos al azar (flocked) desarrollado por COPAN© para maximizar la detección de virus respiratorios (4)

Un estudio comparativo entre el hisopado nasal y el hisopado nasofaríngeo usando hisopos regulares de rayon en contraste con hisopos de nylon o dracon donde por lo menos el 85% de las fibras tienen extremos terminales extendidos al azar (flocked), demostró que el hisopado nasofaríngeo con hisopos de nylon flocked que permiten recolectar más células epiteliales y facilitan la dilución de éstas en el medio de transporte (4).

TABLE 1.

Mean respiratory epithelial cell yield among volunteers sampled by collecting NPS and NS using flocked or rayon swabs^a

Swab type (<i>n</i>)	Geometric mean no. of respiratory epithelial cells/hpf (95% CI)		<i>P</i>
	Flocked swab (<i>P</i> = 0.03)	Rayon swab (<i>P</i> = 0.38)	
NPS (15)	58.6 (45.7-75.1)	23.9 (13.2-43.5)	0.02
NS (16)	31.3 (20.1-48.6)	15.2 (9.1-25.5)	0.03

^a*P* values were determined by using a paired *t* test on log-transformed values. *n*, number of volunteers swabbed.

Tabla 1- Promedio de células epiteliales recolectadas usando hisopado nasofaríngeo (NPS) e hisopado nasal (NS) con hisopos tradicionales de rayón o hisopos flocked de nylon (4)

En términos de la colección de la muestra para la detección del SARS-CoV-2, se estima que la carga viral llega a su punto máximo 5-6 días después del inicio de los síntomas (Figura 2), en contraste con los 7-10 días para el SARS-CoV (5,6).

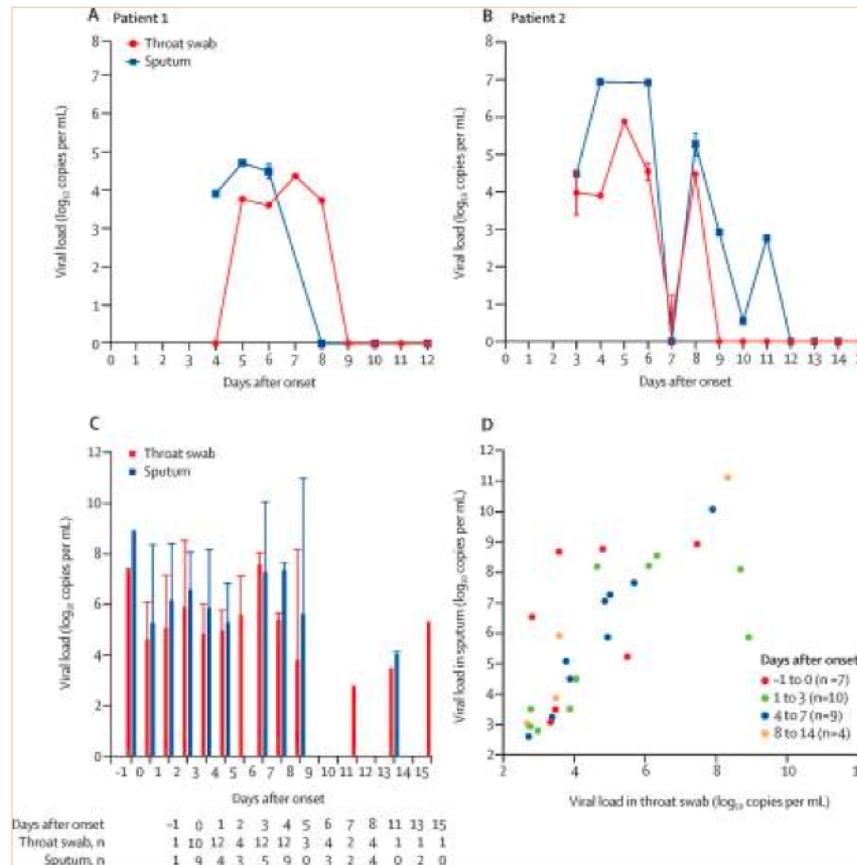


Figura 2. Dinámicas de la carga viral en pacientes infectados con SARS-CoV-2 (6). (A) y (B) Carga viral promedio de muestras tomadas de hisopado nasofaríngeo y esputo de dos pacientes. (C) Carga viral promedio tomadas de hisopado orofaríngeo y esputo de 80 pacientes en diferentes estados de enfermedad después del comienzo de los síntomas. (D) Correlación entre la carga viral de las muestras tomadas con hisopado orofaríngeo y las muestras de esputo.

Sin embargo, un estudio realizado en el hospital de Guangzhou Eighth People en China con 94 pacientes confirmados como portadores del SARS-CoV-2, usó aproximadamente 400 muestras de hisopados analizados por RT-PCR para demostrar que, al igual que otros coronavirus, la carga viral del SARS-CoV-2 aumenta significativamente una vez que empiezan los síntomas y disminuye gradualmente hasta llegar al límite de detección cerca del día 21 después del inicio de los síntomas (7). Ya que el SARS CoV-2 también puede ser transmitido por personas pre-sintomáticas o por personas que no presentan sintomatología, el proyecto COVIDA se enfoca principalmente en población asintomática que es parte de sectores económicos con alto riesgo de contagio.

En términos del transporte y almacenamiento de las muestras para detección de SARS-CoV-2, el éxito de la detección depende de dos variables: la temperatura de almacenamiento desde la toma hasta el análisis de la muestra y la compatibilidad del medio de transporte viral con los reactivos que se usan en el proceso de detección.

Por un lado, durante la toma de muestra nasofaríngea, las células y virus que son recolectados en el hisopo deben ser suspendidos en un medio de transporte viral. Este medio de transporte viral, además de ser compatible con los reactivos que se usan en la detección del virus por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), debe prevenir procesos oxidativos y la destrucción enzimática del material genético del virus (3). En el caso de detección por ácidos nucleicos, se recomienda que el medio de transporte viral sea un medio líquido isotónico –y no tóxico– que contenga un indicador de pH; sales de sodio, calcio, y magnesio; alguna forma de carbohidratos en la forma de azúcar, como la glucosa o la sacarosa; aminoácidos y agentes proteínicos estabilizantes, como la albúmina de suero de bovino (BSA por sus siglas en inglés); moléculas antimicrobianas para minimizar la contaminación bacteriana; moléculas que ayudan a estabilizar los ácidos nucleicos; y agentes de reducción que ayudan a prevenir los procesos de oxidación (8-10).

El medio de transporte viral que contiene la muestra a analizar debe ser almacenado a una temperatura estable con el fin de preservar la integridad de los ácidos nucleicos desde el momento de la toma hasta el inicio del análisis de la muestra.

Acorde a los lineamientos para la gestión de muestras durante la pandemia del SARS-CoV-2 en Colombia, todas las muestras que no sean de sangre deben mantenerse a una temperatura de entre 2-8°C durante el transporte - en especial si el transporte requiere más de una hora- para evitar la degradación de las partículas virales y disminuir la posibilidad de obtener falsos negativos (11). Aunque Druce et al demostraron en el 2011 que el material genético de diferentes tipos virus de ARN con y sin envoltura podían ser detectado por PCR hasta 7 días después de la toma de muestra manteniendo las muestras a temperatura ambiente, los cambios de temperatura de la muestra pueden causar la activación de procesos oxidativos y la degradación de ácidos nucleicos (12). Por ende, se recomienda que las muestras de hisopado nasofaríngeo para detección de SARS CoV-2 sean almacenadas entre 2-4°C desde el momento de la toma de la muestra para optimizar las condiciones de recuperación de ácidos nucleicos virales.

En términos de almacenamiento a largo plazo, es probable que diferentes familias de virus puedan ser almacenados a diferentes temperaturas. Por ejemplo, un estudio que usó hisopados nasofaríngeos en un virus de ARN sin envoltura que infecta a humanos, la muestra original fue separada en dos partes: en una de ellas los ácidos nucleicos fueron extraídos inmediatamente después de la toma de muestra para ser analizados por PCR en tiempo real; la segunda parte de la muestra fue almacenada sin extracción a -20°C por la misma cantidad de tiempo. Las muestras almacenadas a -20°C fueron analizadas después de 16 meses por PCR en tiempo real y los resultados fueron casi iguales a la muestra original (13). Sin embargo, en casos donde la muestra sea utilizada para detectar la presencia del virus, el almacenamiento de virus a -20°C se asocia con la pérdida de infectividad de la muestra.

REFERENCIAS

1. Boivin G., et al. Diagnosis of Viral Infections, Chapter 15, Clinical Virology. Editado por Richman D.D., Whitley R.J., Hayden F.G., Fourth edition. ASM Press. 2017. 291-319.
2. Grupo de la Asociación Colombiana de Infectología y del Instituto de Evaluación Tecnológica de la Salud. Consenso Colombiano de atención, diagnóstico y manejo de la infección por SARS-COV-2/COVID-19 en establecimientos de atención de la salud. 51-53 (2020)
3. Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos (U.S. Department of Health & Human Services). Real-Time RT-PCR Panel for Detection Novel Coronavirus (2020)
4. Daley P, et al. Comparison of flocked and rayon swabs for collection of respiratory epithelial cells from uninfected volunteers and symptomatic patients. J Clin Microbiol 44:2265–2267 (2006)
5. Peiris, J. S. et al. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. Lancet 361, 1767–1772 (2003)
6. Pan Y., et al. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. Lancet Infect Dis. 20(4): 411–412 (2020)
7. He X., et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. Nature Medicine 26:672–675 (2020)
8. Stuart, R. D. et al. The problem of transport of specimens for culture of Gonococci. Can. J. Publ. Health 45:73-83. (1954)
9. Amies C.R., et al. A modified formula for the preparation of Stuart's Transport Medium. Can. J. Public Health 58:296-300 (1967)
10. Bailey et al. Specimen Containers and their Transport in Diagnostic Microbiology. U.S. Pat. No. 4,529,702 pp.29-32; (1978)
11. Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia. Lineamientos para la gestión de muestras durante la pandemia del SARS-CoV-2 en Colombia (2020)
12. Druce, J. Evaluation of Swabs, Transport Media, and Specimen Transport Conditions for Optimal Detection of Viruses by PCR, Journal of Clinical Microbiology p. 1064 – 1065 (2011)
13. Bankowski M.J. Quality Assurance and Quality Control in Clinical and Molecular Virology. Clinical Virology Manual. Editado por Loefflholz, Michael , Hodnika Richard, Young Stephen A. Fifth Edition, ASM press (2016)