

Guía Operativa

Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudio de la Salud

Realizado por:

Mgter. Danilo Franco, Dra. Sandra López, Mgter. Yamitzel Zaldivar

Revisado por:

**Mgter. Brechla Moreno, Mgter. Dalis Mojica, Dr. Juan Miguel Pascale, Dpto. de
Investigación en Virología del ICGES**

Introducción

El Nuevo coronavirus (SARS-CoV-2) denotado así por Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), es un virus que pertenece a la familia *Coronaviridae*, subfamilia *Orthocoronavirinae*. El genoma del virus está formado por una sola cadena de ARN, por lo que se clasifica como ARN monocatenario positivo. Causa la enfermedad conocida oficialmente como COVID-19. Inicialmente el virus fue llamado 2019-nCoV del inglés 2019-novel coronavirus, o informalmente coronavirus de Wuhan por haberse aislado en diciembre de 2019 a partir de una muestra obtenida de un paciente afectado por neumonía en la ciudad de Wuhan (China). Se ha secuenciado su genoma completo. No se conoce el mecanismo exacto de transmisión, pero se cree que puede producirse el contagio de una persona a otra mediante las gotas de saliva expulsadas a través de la tos y el estornudo. Puede provocar enfermedad respiratoria aguda y neumonía grave en humanos (1,2). Secuencias de SARS-CoV-2 muestran semejanzas con los betacoronavirus encontrados en murciélagos, pero son genéticamente distintos de otros coronavirus como el SARS-CoV y el MERS-CoV. Al igual que el SARS-CoV, este coronavirus es un miembro del linaje B de los betacoronavirus (3).

Muestras Clínicas: Toda muestra clínica para Estudio de Coronavirus debe ir acompañada de la ficha epidemiológica correctamente llenada y con letra legible (ver tabla 1). Las muestras de Hisopado Nasofaríngeo y Orofaringeo deben ser tomadas en los 7 primeros días de síntomas. Todavía hay información limitada sobre el riesgo que representa el SARS-CoV-2, a pesar que la letalidad es baja, la transmisión humano-humano es buena y puede comportarse como una infección nosocomial, por ende se detallan las medidas de bioseguridad y el equipo de protección personal a utilizar durante la toma de muestra y el envío.

Tabla 1. Muestras que deben ser colectadas en pacientes que cumplen con la definición de caso

Espécimen	Días de inicio de síntomas (fiebre)	Material o medio colector	Temperatura de transporte	Almacenamiento	Comentario
Hisopado Nasofaríngeo y Orofaríngeo	< 7 días para casos ambulatorios; < 10 días y si no mejora y tiene cultivo bacteriano negativo	Hisopo flexible/rígido de Dacron o polyester	2 - 8°C	≤5 días: 2 - 8°C >5 días: -65 a -80 °C	Ambos hisopos deben ser colocados en el mismo Medio de Transporte Viral (MTV)
Lavado Broncoalveolar	< 10 días y a los 15 días si no mejora y tiene cultivo bacteriano negativo	Contenedor estéril	2 - 8°C	≤48 horas: 2 - 8°C >48 horas: -65 a -80 °C	Puede haber cierta dilución del patógeno, pero aún así es una muestra valiosa

Aspirado Nasofaríngeo o Endotraqueal	< 10 días y a los 15 días si no mejora y tiene cultivo bacteriano negativo	Contenedor estéril	2 - 8°C	≤48 horas: 2 - 8°C >48 horas: -65 a -80 °C	
Espujo	< 10 días y a los 15 días si no mejora y tiene cultivo bacteriano negativo	Contenedor estéril	2 - 8°C	≤48 horas: 2 - 8°C >48 horas: -65 a -80 °C	Asegúrese de que el material sea del tracto respiratorio inferior
Tejido (Pulmón) de biopsia o autopsia	< 10 días y a los 15 días si no mejora y tiene cultivo bacteriano negativo	Contenedor estéril	2 - 8°C	≤24 horas: 2 - 8°C >24 horas: -65 a -80 °C	
Suero (2 muestras aguda y convaleciente posiblemente de 2-4 semanas después de la fase aguda)	< 10 días y a los 15 días si no mejora y tiene cultivo bacteriano negativo	Sangre en Tubo serológico (adultos: coleccionar de 3 a 5 ml de sangre completa)	2 - 8°C	≤5 días: 2 - 8°C >5 días: -65 a -80 °C	Colecte muestras pareadas: Aguda – primera semana de enfermedad • Convaleciente – 2 a 3 semanas posterior

EPP para la toma de muestras de suero: guantes, bata, mascarilla, gafas de bioseguridad.

EPP para la toma de muestras de hisopado y de pacientes hospitalizados: guantes, bata, mascarilla N95, gafas de bioseguridad.

La muestra debe ser tomada por el primer contacto con el paciente, generalmente el médico tratante.

TOMA Y EMBALAJE DE MUESTRA

Materiales y equipo para la toma de la muestra clínica por sospecha de COVID-19:

Verifique la presencia en el área de la toma de muestra de los siguientes insumos:

1. Formulario para vigilancia del síndrome gripal y las neumonías virales y bacterianas o Formulario de notificación obligatoria.
2. Equipo de Protección Personal (EPP: Bata, respirador N95, gafas y dos pares de guantes).
3. Medio de Transporte Viral (MTV) con hisopos con punta de dacrón o rayón (flexible/rígido o flexible/flexible). Este es el contenedor primario.
4. Depresor de lengua.
5. Papel absorbente.
6. Contenedor secundario: bolsa plástica con cierre hermético (tipo ziploc) o contenedor rígido de cierre hermético (tipo botella de tiras reactivas de urinalisis).
7. Contenedor terciario o cooler.

8. Paquetes o pads congelados:
 - a. Un pad congelado si el envío tarda menos de 2 hora.
 - b. Dos pads congelados si el envío tarda entre 2 a 6 horas.
 - c. Colocar 4 pads congelados si el envío es superior a las 6 horas.

Nota: Colocar exceso de pads congelados puede afectar la calidad de la muestra.
9. Solución desinfectante: Solución fresca de Hipoclorito al 0.5%.
10. Gel antiséptico para la higiene de manos o agua y jabón líquido.
11. Contenedor con bolsa de basura para los desechos peligrosos. Asegúrese que el contenedor que sostiene la bolsa roja para los desechos infecciosos tenga suficiente espacio para el EPP que se desechará posterior a la toma de la muestra. Igualmente, verifique que el contenedor rígido para desechos biológicos no esté lleno.

Pasos para ponerse el Equipo de Protección Personal

1. Quítese todas las prendas personales (joyas, reloj, teléfono móvil, bolígrafos, etc.).
2. Inicie el procedimiento para ponerse el equipo de protección personal bajo la orientación y supervisión de un observador capacitado.
3. Higienice las manos (agua y jabón, o gel alcoholado)
4. Póngase un primer par de guantes.
5. Póngase la bata desechable.
6. Póngase el respirador N95. Ajuste el respirador al tabique nasal presionando la banda de metálica sobre el mismo. Además asegure que no hay espacios entre la quijada y el respirador.
7. Póngase las gafas protectoras o equipo de protección ocular disponible.
8. Póngase otro par de guantes (preferentemente de puño largo) sobre el puño de la bata.

Toma de la Muestra Clínica

Hisopado nasofaríngeo/Orofaringeo

1. Sobre una superficie fija, amplia y limpia; tenga el MTV preparado y rotulado con la información del paciente, junto a los dos hisopos para tomar la muestra.
2. Retire la mascarilla quirúrgica del paciente y ofrecer un paño desechable por si siente la necesidad de toser o estornudar durante el procedimiento.
3. Coloque al paciente con la cabeza ligeramente inclinada hacia atrás e inmovilizar en esta posición.
4. Inserte un hisopo flexible en la fosa nasal hasta llegar a la nasofaringe sin forzarlo y realice un escobillado (frotado), girando el hisopo con movimientos circulares por 5 segundos, y luego retírelo lentamente.
5. Inserte el hisopo en el recipiente que contiene el MTV y quiebre el extremo del hisopo que sobresale.
6. Tome la muestra de la Orofaringe con un nuevo hisopo estéril, preferiblemente rígido. Con la ayuda de un depresor de lengua, se frota el hisopo con firmeza en la pared posterior de la garganta. Se debe tener cuidado de no tocar la lengua, ni la epiglotis con el hisopo.
7. **Deposite este hisopo en el mismo recipiente MTV** y quiebre el extremo del hisopo que sobresale.
8. Cierre el recipiente herméticamente.
9. Revuelva de manera circular para que se dispersen las partículas.
10. Limpie el contenedor primario (MTV) con una solución de hipoclorito 0.5% sobre la superficie externa.

11. Envuelva el contenedor primario en papel absorbente.
12. Coloque el recipiente primario dentro de una bolsa plástica o contenedor rígido con cierre hermético (contenedor secundario). Límpiela con solución de hipoclorito 0.5%.
13. Coloque el contenedor secundario dentro del cooler (contenedor terciario). Limpie la superficie externa del cooler con solución de hipoclorito 0.5%.
14. Informe al Dpto. de Epidemiología de su institución de que tiene una muestras sospechosa por COVID-19 para que se coordine el envío de la muestra embalada al ICGES.

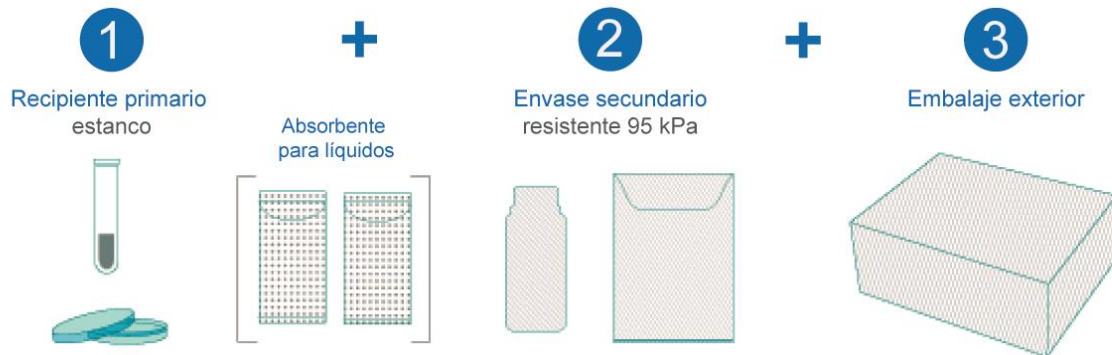


Figura 1. Materiales necesarios para el embalaje de las muestras clínicas: El recipiente primario UTM, deberá colocarse material absorbente (polímero, papel toalla), entre este y el envase secundario, con capacidad suficiente para absorber la totalidad del contenido en caso de rotura. El envase secundario contiene y protege cualquier recipiente primario con muestras y debe soportar una presión interna de 95kPa. Estos envases pueden ser flexibles o rígidos y cuentan con cierres de seguridad. En el caso de los flexibles son termosellados y acompañados de una bolsa canguro exterior para incluir la documentación. Es un embalaje rígido y robusto para proteger los envases secundarios y los recipientes primarios ante posibles daños durante el transporte, los materiales de fabricación deben proporcionarle una larga vida útil y que permitan su limpieza y mantenimiento.

Pasos para quitarse del Equipo de Protección Personal

1. Quítese el EPP siempre bajo la orientación y supervisión de un observador capacitado. Asegúrese de que haya recipientes para desechos infecciosos en el área para quitarse el equipo a fin de que el EPP pueda desecharse de manera segura. Debe haber recipientes separados para los componentes reutilizables.
2. Higienice las manos con los guantes puestos utilizando un gel alcoholado. Espere 30 segundos para continuar.
3. Quítese los guantes externos y deséchelos de una manera segura.
4. Higienice las manos con los guantes puestos utilizando un gel alcoholado. Espere 30 segundos para continuar.
5. Para sacarse la bata, primero desate el nudo y después tire de atrás hacia adelante lentamente, enrollándola de adentro hacia afuera, y deséchela de una manera segura. Si es una bata con cierre frontal, desabroche lentamente y tire hacia atrás enrollándola de forma similar.
6. Higienice las manos con los guantes puestos utilizando un gel alcoholado. Espere 30 segundos para continuar.

7. Sáquese el equipo de protección ocular. ¡No haga contacto en ningún momento con la parte frontal!. Tire de la cuerda detrás de la cabeza y deséchelo de una manera segura en el envase correspondiente para su descontaminación posterior.
8. Higienice las manos con los guantes puestos utilizando un gel alcoholado. Espere 30 segundos para continuar.
9. Para quitarse el respirador N95, ¡No haga contacto en ningún momento con la parte frontal! En la parte de atrás de la cabeza primero tire la cuerda de abajo y déjela colgando delante. Después utilizando ambas manos tire la cuerda de arriba, y deseche el respirador N95 de una manera segura.
10. Higienice las manos con los guantes puestos utilizando un gel alcoholado. Espere 30 segundos para continuar.
11. Quítese los guantes cuidadosamente con la técnica apropiada y deséchelos de una manera segura.

Almacenamiento y estabilidad de las muestras: En condiciones ideales, las muestras deberían mantenerse y enviarse refrigeradas a 2-8°C al laboratorio (sin congelación previa), en medio de transporte viral (MTV) o en un contenedor estéril (ver tabla 1), junto con los formularios de recolección y dentro de las primeras 24 a 48 horas de colección. El tiempo máximo de almacenamiento a 2-8°C es 5 días. Si las muestras no pueden procesarse dentro de los primeros 5 días, deben mantenerse (en lo posible) congeladas a -70°C (-65 a -80 °C). Se deben evitar los ciclos repetidos de congelación/descongelación que puedan generar pérdida de la viabilidad viral y daño en la integridad del ARN. No almacene las muestras en congeladores domésticos (-20°C) con ciclos de congelación-descongelación (defrost).

Recibo de la muestra:

Las muestras de todas las vigilancias serán recibidas en el ICGES de 9:00 am a 1:30 pm de lunes a viernes. Se recibirán muestras fuera de horas laborables durante la Alerta Sanitaria y estas serán procesadas inmediatamente. Al 22 de febrero 2020, las muestras de pacientes por sospecha de SARS-CoV-2 serán recibidas en el ICGES de 9:00 am a 6:00 pm de lunes a domingo.

Para obtener los horarios más actualizados, por favor, ver circulares actualizadas en el sitio web del ICGES.

El mensajero se dirige a la garita de seguridad y se anuncia. Es llevado a la recepción, y se comunica al personal de toma de muestra para su recibo.

EPP para transporte de las muestras (mensajero, seguridad, recepción): Como se reciben solo muestras y este personal no tiene contacto con las mismas, no necesita EPP.

El personal de recepción de muestras debe tener el siguiente equipo de protección personal al momento de recibir cualquier muestra potencialmente infecciosa:

- Guantes desechables,
- Bata de laboratorio debidamente abrochada,
- Gafas
- Mascarilla quirúrgica

Antes de desembalar la muestra, se debe limpiar la superficie del embalaje exterior (cooler) con una toallita empapada con cloro 10% (Hipoclorito al 0.5%) (preparado del día). También se debe limpiar

el envase primario (el que contiene la muestra) en el exterior con otra toallita empapada con cloro al 10% u otro desinfectante que no borre la información de la etiqueta del envase primario. Esto se realiza para garantizar que los envases han sido descontaminados en su superficie exterior.

Al terminar la verificación y recibo de la muestra; se debe limpiar el área de recibo de muestra, el contenedor terciario que lleva el mensajero, desechar el EPP de la forma adecuada y lavarse las manos con agua y jabón, para después comunicarse con el departamento de Virología para el retiro de la muestra. El personal de toma de muestras debe anotar la llegada de la muestra en el registro correspondiente.

El Departamento de Virología debe llevar un contenedor a prueba de fugas para el transporte seguro de la muestra potencialmente infecciosa. A su llegada a la toma de muestra, debe ponerse guantes, bata, y luego colocar la muestra (si es posible nuevamente dentro de segundo embalaje) en el envase terciario, cerrarlo y finalmente descontaminar el envase con Cavicide. Una vez colocada la muestra en el envase, debe retirarse el EPP y lavarse cuidadosamente las manos. El transporte del envase terciario desde Recibo de Muestras del LCRSP hasta el Dpto. de Virología debe hacerse sin EPP.

Fuera de horas laborables, el mensajero debe informar al seguridad que lleva una muestra sospechosa por coronavirus y llamar al personal del Dpto. de Virología o guardar el envase directamente dentro del refrigerador de 2 - 8°C. El tercer embalaje será llevado directamente al laboratorio de virología, y si la muestra cumple con los requisitos será formalmente recibida. El tercer embalaje aportado por la institución será descontaminado antes de su entrega.

El envase que contiene las muestras debe abierto en el laboratorio del Dpto. de Virología y no en el área de Recibo de muestras. Estas muestras sospechosas tendrán prioridad durante la alerta epidemiológica.

Causas de Rechazo de la Muestra:

- Mala conservación (por ejemplo muestra a temperatura ambiente por el potencial de obtener resultados con falsos negativos).
- Muestras tomadas en hisopo con punta de alginato de calcio o palillo de madera (pueden contener sustancias que inactiven el virus).
- Muestra sin rótulo, con letra ilegible o incongruencia con el formulario.
- Muestras derramadas o con cantidad insuficiente.
- Medio de Transporte inadecuado.
- Tejidos que lleguen con algún tipo de preservante.
- Formularios incompletos.

Análisis de la muestra Los avances tecnológicos han permitido obtener en un corto tiempo el diagnóstico molecular para SARS-CoV-2, siendo una herramienta útil debido principalmente a la rapidez en la obtención de resultados, además de poseer una sensibilidad superior al aislamiento viral, considerada esta última con la prueba de oro para todos los virus respiratorios. Actualmente, la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real, conocida por sus siglas como rRT-PCR, se encuentra reconocida por la OMS y es utilizada por laboratorios de referencia como la herramienta principal en la vigilancia o en respuesta rápida ante brote o epidemias.

Laboratorios BSL2 del ICGES

En el laboratorio, recordar que cualquier procedimiento con potencial de generar aerosoles (sonicación, vortex) debe realizarse en una cabina de bioseguridad (CBS) de clase II. Es requerido el uso de dispositivos de contención física apropiados, como: rotores sellados, cubetas de centrífuga con tapa a prueba de aerosoles para la centrifugación. Las cubetas de las centrífugas con tapa a prueba de aerosoles deben ser abiertas dentro de las CBS.

Como se pueden crear aerosoles, el personal debe utilizar guantes, bata, mascarilla N95, gafas de bioseguridad durante estos procedimientos.

La extracción de ARN viral se realiza en cabinas de bioseguridad II utilizando guantes y bata, pero no es necesario las gafas ni la mascarilla. Los procedimientos moleculares no se realizan en el laboratorio BSL2 con presión negativa, pero dentro de los otros laboratorios BSL2 del Dpto. de Virología.

Después del procesamiento de las muestras, descontamine el área de trabajo con Cavicide o Cloro 10% y luego elimine el excedente del primero con agua o del cloro con alcohol al 70%. (Siga las recomendaciones del fabricante para el uso-dilución, es decir concentración, tiempo de contacto y cuidado en el manejo). Retírese el EPP cuidadosamente en bolsa rojas de bioseguridad y finalmente lávese las manos con agua y jabón. Todos los desechos infecciosos generados deben esterilizarse en autoclave.

Los intentos de cultivar el virus SARS-CoV-2 requieren medidas más estrictas de control de bioseguridad y por el momento, deben realizarse en un *laboratorio de biocontención BSL3*.

Se presenta el flujograma propuesto para el diagnóstico molecular de SARS-CoV-2 de Panamá.



CADENA DE ACONTECIMIENTOS DESDE LA COLECTA DE LA MUESTRA HASTA EL REPORTE

1. Comunicarse con el ICGES (527-4815) para alertar sobre el envío de muestras.
2. Embalaje adecuado de la muestra junto a su formulario completo, el formulario no debe estar en contacto con la muestra (ver embalaje y transporte).
3. Muestra recibida en toma de muestras del ICGES.
4. Llamada al Departamento de Virología para su retiro.
5. Procesamiento de muestra por RT-PCR (Técnica Molecular).
6. Reporte de resultado.
7. Informe a MINSA y a Epidemiología de la instalación.

Tiempo de Respuesta:

- En Contingencia y Alerta Epidemiológica: 24 horas.
- Respuesta de rutina en la vigilancia virológica: 3 días hábiles.

Contactos

- ICGES - Laboratorio de Virología y Biotecnología
 - Teléfono 527-4815 en horas laborables.
 - Correo electrónico: virologiagorgas@gorgas.gob.pa

Bibliografía

1. WHO Director-General's remarks at the media briefing on 2019-nCoV on 11 February 2020. [who.int](https://www.who.int) Organización Mundial de la Salud (en inglés). 11 de febrero de 2020. Consultado el 22 de febrero de 2020.
2. Novel coronavirus (2019-nCoV), Wuhan, China. [Cdc.gov](https://www.cdc.gov). 10 de enero de 2020. Consultado el 22 de febrero de 2020.
3. Phylogeny of SARS-like betacoronaviruses. [nextstrain](https://nextstrain.org). Link: nextstrain.org. Consultado el 22 de enero de 2020.