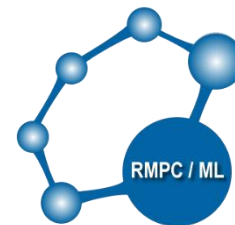


El laboratorio clínico en el diagnóstico de COVID-19: El impacto de la rotación de residentes en la toma de muestras; experiencia en un hospital pediátrico de tercer nivel.



ARTÍCULO ORIGINAL

Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio - FEMPAC

Rev Mex Patol Clin Med Lab. 2022; Volumen 69, Número 3

doi.

The clinical laboratory in the diagnosis of COVID-19: The impact of resident rotation in sample collection; experience in a tertiary pediatric hospital.

Israel Parra-Ortega¹, Brenda Nieto-Rivera², Ebzadrel Carbajal-Franco², Stephania Galaviz Hernández², Irma López-Martínez³, Gisela Barrera Badillo⁴, Fernando Ortega Riosvelasco⁵, Víctor Olivar López⁶, Benjamín Romero Navarro⁷

RESUMEN

Introducción: A lo largo de la actual pandemia hemos publicado nuestra experiencia en el diagnóstico, manejo e intervenciones del laboratorio clínico y su impacto en la práctica médica para lo cual, en esta ocasión, estamos presentando la experiencia obtenida con el cambio de residentes y la calidad de las muestras, basados en los diferentes puntos de control de las pruebas moleculares.

Objetivo específico: Describir la experiencia obtenida con el cambio de residentes y la calidad de las muestras para la identificación del virus SARS CoV-2.

Material y métodos: En el periodo comprendido de enero-marzo de 2022 se incluyeron las muestras de todos los pacientes pediátricos con síntomas de infección por COVID-19 tomadas por médicos residentes del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Se analizaron las características de los ensayos y nos basamos en los resultados obtenidos en el control interno de la prueba.

Resultados: Se identificaron 731/3,391 (21.55%) pacientes que resultaron positivos para el virus SARS COV-2 en la prueba. Con respecto a resultados indeterminados o no concluyentes posterior a un análisis multivariado se identificó que la distribución de los datos del control interno, no afectan o compromete el resultado o calidad del resultado.

Conclusiones: Nosotros nos atrevemos a decir que el cambio o rotación de residentes no ha afectado la calidad de muestra (cantidad de material genético a utilizar) para la realización de pruebas moleculares en la identificación del virus SARS CoV-2.

¹ Jefe de Departamento de Laboratorio Clínico, Hospital Infantil de México Federico Gómez.

² Adscrito al Departamento de Laboratorio Clínico, Hospital Infantil de México Federico Gómez.

³ Directora de diagnóstico y referencia, Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.

⁴ Jefa del Laboratorio de virus respiratorios, Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.

⁵ Jefe del Departamento de Epidemiología hospitalaria, Hospital Infantil de México Federico Gómez.

⁶ Jefe del Departamento de Urgencias, Hospital Infantil de México Federico Gómez.

⁷ Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico, Hospital Infantil de México Federico Gómez.

CONTACTO

Dr. en C. Ebzadrel Carbajal-Franco

Dr. Márquez 162, Col Doctores,
Alc. Cuauhtémoc, CDMX

ebzadrel@gmail.com

Fecha de recepción:

14 de marzo de 2023

Fecha de aceptación:

7 de octubre de 2023

The clinical laboratory in the diagnosis of COVID-19: The impact of resident rotation in sample collection; experience in a tertiary pediatric hospital.

Israel Parra-Ortega¹, Brenda Nieto-Rivera², Ebzadrel Carbajal-Franco², Stephania Galaviz Hernández², Irma López-Martínez³, Gisela Barrera Badillo⁴, Fernando Ortega Riosvelasco⁵, Víctor Olivar López⁶, Benjamín Romero Navarro⁷

Abstract

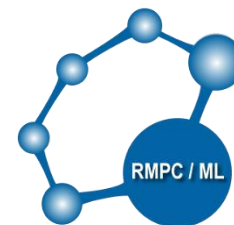
Introduction: Throughout the current pandemic we have published our experience in the diagnosis, management and interventions of the clinical laboratory and its impact on medical practice, for which on this occasion we are presenting the experience obtained with the change of residents and the quality of the samples, based on the different control points of the molecular tests.

Specific goal: Describe the experience obtained with the change of residents and the quality of the samples for the identification of the SARS CoV-2 virus.

Material and methods: In the period from January to March 2022, samples from all pediatric patients with symptoms of COVID-19 infection taken by resident physicians of the Hospital Infantil de México Federico Gómez were included. The characteristics of the trials were analyzed and we based ourselves on the results obtained in the internal control of the test.

Results: 731/3,391 (21.55%) patients were identified who tested positive for the SARS COV-2 virus. Regarding indeterminate or inconclusive results after a multivariate analysis, it was identified that the distribution of the internal control data does not affect or compromise the result or quality of the result.

Conclusions: We dare to say that the change or rotation of residents has not affected the quality of the sample (amount of genetic material to be used) for carrying out molecular tests to identify the SARS CoV-2 virus.



ARTÍCULO ORIGINAL

PALABRAS CLAVE

Diagnóstico, COVID-19, toma de muestras, control de calidad.

KEYWORDS

Diagnosis, COVID-19, sampling, quality control.



INTRODUCCIÓN

El pasado 31 de diciembre de 2019 fue notificada por primera vez en Wuhan (China) la presencia del virus SARS-CoV-2 el cual es un virus de ARN monocatenario con un genoma de 29,903 nucleótidos, lo cual lo hace el segundo genoma de ARN más grande que se conoce. Éste consta de dos regiones no traducidas (UTR) en los extremos 5' y 3', así como 11 marcos de lectura abiertos (ORF), los cuales codifican 27 proteínas, mismo que es causante de la actual pandemia. (1-4).

La identificación de SARS-CoV-2 se realiza mediante en la detección del ARN del virus usando pruebas de biología molecular, principalmente las basadas en la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), en los cuales se lleva a cabo la detección y amplificación de los diferentes genes blancos o diana de acuerdo al kit o prueba utilizada, siendo las regiones más utilizadas las ubicadas en los genes N, S, RdRp y Orf 1ab (5-6).

A lo largo de la actual pandemia hemos publicado nuestra experiencia en el diagnóstico, manejo e intervenciones del laboratorio clínico y su impacto en la práctica médica (6-7), para lo cual en esta ocasión estamos presentando la experiencia obtenida con el cambio de residentes y la calidad de las muestras, basados en los diferentes puntos de control de las pruebas moleculares.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el periodo comprendido de Enero-Marzo de 2022 se incluyeron las muestras de todos los pacientes pediátricos con síntomas de infección por COVID-19 del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Las muestras de hisopado nasofaríngeo fueron tomadas por los médicos residentes. Los hisopados se colectaron durante la primera semana del inicio de los síntomas, mediante un procedimiento estándar de toma de muestra (6-7). Las muestras se colocaron en los medios de transporte viral preparados con anterioridad.

Purificación de ácidos nucleicos y RT-PCR

Los ácidos nucleicos totales fueron extraídos y purificados empleando el equipo Exiprep 96TM y el kit Exiprep 96TM viral DNA/RNA kit (K-4614), ambos de Bioneer, siguiendo las instrucciones del fabricante. La detección de los genes virales E (envoltura), N (nucleocápside), RdRp (RNA polimerasa dependiente de RNA) y del control Interno (gen humano) se realizó mediante RT-PCR en tiempo real con el kit GeneFinderTM COVID-19 Plus RealAmp Kit (GeneFinderTM). El programa de PCR y el análisis de datos se realizó empleando el termociclador QuantStudio 5 System equipado con el QuantStudio Design & Analysis Software versión 2.3.3 (ABI/Life Technologies).

Se utilizaron para la amplificación y detección del material genético siguiendo las recomendaciones de los fabricantes y los lineamientos operativos vigentes establecidos por el InDRE (6-7). En todos los casos se registraron los valores del *cycle threshold* (Ct) de los genes virales y el control interno.

Para fines de este estudio, se utilizó únicamente el valor del Ct del gen humano RNAasa P (control interno) para evaluar la presencia de material genético obtenido en la toma de muestras.

En los casos en los que se detectó la presencia del virus SARS-CoV-2, se realizó el análisis de la distribución de la carga viral relativa, además de un análisis estadístico descriptivo con los datos obtenidos a partir de los ensayos de laboratorio, utilizando el sistema informático GraphPad Prism 6.0 para Windows.

RESULTADOS

Se documentó información de 3,391 muestras de pacientes pediátricos (edad de 0 a 18 años, con una media de edad de 6.9 años), tomadas por los médicos residentes de nuestro instituto. Dentro de las características de estos pacientes, el 70% se atendieron por consulta externa y dentro de los hospitalizados coexistieron con comorbilidades, siendo las enfermedades más frecuentes las neoplasias, enfermedades cardiovasculares y enfermedades pulmonares.

Se identificaron 731/3,391 (21.55%) pacientes que resultaron positivos para el virus SARS COV-2 en la prueba. Con respecto a resultados indeterminados o no

concluyentes (que nosotros definimos al tener solo la expresión de un gen viral en Ct's igual o mayor a 38 o dos genes posterior al corte en los CT,s o mayor a 40) se observaron en 35 muestras los cuales fueron también incluidos en el análisis.

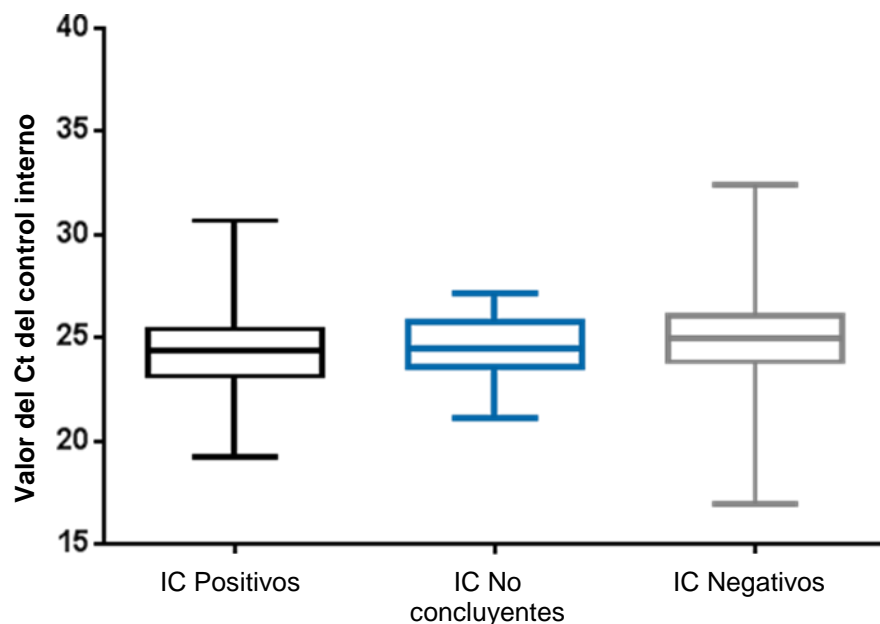
Los valores del control interno de la prueba se describen en la Tabla 1.

TABLA 1: Valores del control interno de la prueba.

	IC Positivos	IC No concluyentes	IC Negativos
Número de determinaciones	731	35	2,625
Valor mínimo	19.26	21.08	16.94
Percentil 25%	23.13	23.62	23.84
Mediana	24.35	24.47	24.99
Percentil 75%	25.42	25.73	26.07
Valor máximo	30.67	27.16	32.43
Media	24.34	24.65	24.99
Desviación estándar	1.798	1.449	1.778
Error en la DS	0.06650	0.2450	0.03470
IC 95% valor mínimo	24.21	24.15	24.93
IC 95% valor máximo	24.47	25.15	25.06

Los valores obtenidos en las diferentes categorías se muestran en la Gráfica 1.

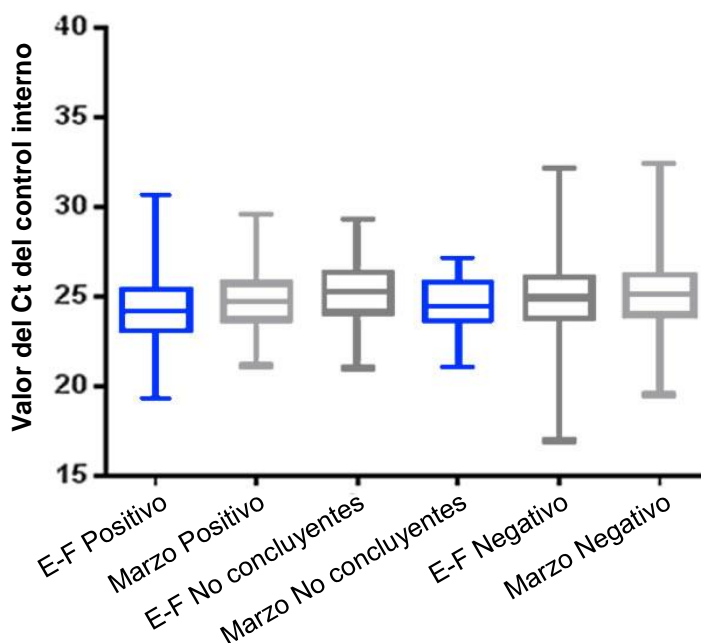
GRÁFICA 1:
Distribución del valor del Ct del control interno en los diferentes grupos de resultados.



El impacto del cambio de residentes se evaluó comparando los valores del Ct obtenido del control interno en los diferentes grupos de resultados, en diferentes momentos (enero y febrero versus marzo del 2022) se graficaron los resultados con respecto a los meses de enero-febrero 2022 (E-F) y marzo 2022, para su comparación en las diferentes categorías, esto se visualiza en la Gráfica 2.

GRÁFICA 2:

Distribución del valor del Ct del control interno en los diferentes grupos de resultados y tiempo.



En la Tabla 2 se muestra la distribución de los datos en los diferentes meses del estudio.

TABLA 2: Distribución de los datos en los diferentes meses del estudio.

	E-F Positivo	Marzo Positivo	E-F No concluyentes	Marzo No concluyentes	E-F Negativo	Marzo Negativo
Número de determinaciones	595	136	63	34	1,653	972
Valor mínimo	19.26	21.12	21.01	21.08	16.94	19.51
Percentil 25%	23.08	23.70	24.11	23.64	23.76	23.97
Mediana	24.23	24.70	25.24	24.48	24.93	25.09
Percentil 75%	25.38	25.73	26.30	25.75	26.04	26.15
Valor máximo	30.67	29.55	29.26	27.16	32.15	32.43
Media	24.27	24.66	25.25	24.72	24.94	25.09
Desviación estándar	1.827	1.635	1.693	1.410	1.774	1.781
Error en la DS	0.07488	0.1402	0.2133	0.2419	0.04363	0.05713
IC 95% valor mínimo	24.12	24.39	24.83	24.23	24.85	24.98
IC 95% valor máximo	24.42	24.94	25.68	25.21	25.02	25.20

Para finalizar el análisis se realizó la prueba de comparación múltiple en las diferentes categorías de resultado y en los diferentes meses.

TABLA 3: Prueba de comparación múltiple.

Periodos de comparación con base en el Ct del gen humano RNAasa P (control interno)	¿Significancia estadística?	Prueba de comparación múltiple (Holm-Sidak's) Valor de P
Marzo Positivo vs. E-F Positivo	No	0.1989
E-F No concluyentes vs. E-F Positivo	Si	0.0004
Marzo No concluyentes vs. E-F Positivo	No	0.6865
E-F Negativo vs. E-F Positivo	Si	< 0.0001
Marzo Negativo vs. E-F Positivo	Si	< 0.0001
E-F No concluyentes vs. Marzo Positivo	No	0.2543
Marzo No concluyentes vs. Marzo Positivo	No	0.8718
E-F Negativo vs. Marzo Positivo	No	0.4963
Marzo Negativo vs. Marzo Positivo	No	0.0994
Marzo No concluyentes vs. E-F No concluyentes	No	0.6865
E-F Negativo vs. E-F No concluyentes	No	0.6865
Marzo Negativo vs. E-F No concluyentes	No	0.8541
E-F Negativo vs. Marzo No concluyentes	No	0.8541
Marzo Negativo vs. Marzo No concluyentes	No	0.6865
Marzo Negativo vs. E-F Negativo	No	0.2739

DISCUSIÓN

Dentro de las recomendaciones que se han establecido al momento de la toma de muestras para la identificación del virus SARS CoV-2, se ha enfatizado la calidad del hisopado (8-9), sin embargo, algunos factores importantes como lo son: 1) tiempo de proceso entre la toma de muestra y la extracción de RNA, 2) la temperatura de almacenamiento y transporte y 3) la estabilidad de la muestra en los diferentes viales o medios de transporte, hace imperativo generar información con respecto a estos puntos, es por ello que haber realizado las diferentes comparaciones con las herramientas estadísticas que las variables analíticas nos permiten (10-14).

En nuestro laboratorio a lo largo de esta pandemia hemos generado información importante que puede ser útil para la estandarización de los procesos. Con base en los resultados estadísticos podemos decir que no se observaron diferencias significativas en los valores obtenidos, pues las medias, medianas y desviaciones estándar en los diferentes viales resultan muy similares, por lo que basados en las pruebas estadísticas realizadas no encontramos diferencias que hagan inferir afectación en los resultados.

En el caso de los valores de pacientes negativos a la detección de SARS CoV-2, se observó una distribución heterogénea en el gráfico, sin embargo, considerando otros criterios y puntos clave en la interpretación de los resultados como lo es el ciclo de PCR utilizado como corte o límite (ciclo 35 para el control interno), ningún valor obtenido se encuentra cerca de dicho valor.

Los resultados indeterminados o no concluyentes observados pueden atribuirse a varias causas, dentro de las diversas fases del proceso, siendo las más significativas y mencionadas con anterioridad: (12-14)

- 1) el momento de la toma de la muestra a partir del inicio de signos y síntomas de la enfermedad,
- 2) la calidad de la muestra al momento de la toma,
- 3) el tiempo y temperatura de transporte desde la toma de muestra hasta su proceso,
- 4) la eficiencia del proceso de extracción de ácidos nucleicos,
- 5) la sensibilidad analítica del método o plataforma analítica utilizada

Tener un monitoreo de la calidad de la muestra en los hisopados nasofaríngeos que se utilizan para la detección del virus SARS CoV-2 contribuye a fortalecer el proceso de detección del virus, en nuestro caso por tener médicos residentes como responsables de la toma de muestra es muy importante tener la mayor certeza del proceso, ya que se pueden establecer acciones o medidas que fortalezcan la etapa preanalítica en esta prueba.

En esta publicación nosotros estamos utilizando como fuente de información el Ct del gen humano RNAasa P (control interno) para monitorear la calidad de la muestra, sin embargo este valor se puede ver afectado por el rendimiento en la extracción de ácidos nucleicos totales por el método utilizado o por la eficiencia del proceso entre analistas, corridas, lotes de reactivo y otras variables que pueden afectar el proceso, es por ello que se debe generar más evidencia que ayude a controlar los procesos analíticos en las pruebas moleculares.

En conclusión; nosotros nos atrevemos a decir que el cambio o rotación de residentes no ha afectado la calidad de muestra (cantidad de material genético a utilizar) para la realización de pruebas moleculares en la identificación del virus SARS CoV-2.

REFERENCIAS

1. Xu Z, Shi L, Wang Y, et al. Pathological findings of COVID-9 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med.* 2020 Feb 18. doi:10.1016/S2213-2600(20)30076-X.
2. Colaneri M, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease (COVID-19) early findings from a teaching hospital in Pavia, North Italy, 21 to 28 February 2020. *Euro Surveill.* 2020;25(16).
3. Yosra A. Helmy, et al. The COVID-19 Pandemic: A comprehensive review of taxonomy, genetics, epidemiology, diagnosis, treatment, and control. *J. Clin. Med.* 2020, 9, 1225.
4. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020;395 (10223):514–23.
5. Hilgenfeld R, Peiris M. From SARS to MERS: 10 years of research on highly pathogenic human coronaviruses. *Antiviral Res.* 2013 Oct;100(1):286-95. doi:

- 10.1016/j.antiviral.2013.08.015. Epub 2013 Sep 6. PMID: 24012996; PMCID: PMC7113673.
6. Parra-Ortega I, Carbajal-Franco E, Vilchis-Ordoñez A, Ángeles-Floriano T, Nieto-Rivera B, López-Martínez I et al. Distribución de los valores del Ct en la RT-PCR para SARS-CoV-2 al momento del diagnóstico en pacientes pediátricos mexicanos. *Rev Mex Patol Clin Med Lab.* 2020; 67 (4): 176-182. doi.org/10.35366/99463
 7. Parra-Ortega I, Vilchis-Ordoñez A, López-Martínez B, Angeles-Floriano T. Analytical recommendations for SARS-CoV-2 identification by RT-PCR in pediatric patients. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2021;78(3):171-180. doi:10.24875/BMHIM.20000210. PMID: 33938901
 8. Heald-Sargent T, Muller WJ, Zheng X, Rippe J, Patel AB, Kocielek LK. Age-Related Differences in Nasopharyngeal Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Levels in Patients With Mild to Moderate Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) [published online ahead of print, 2020 Jul 30]. *JAMA Pediatr.* 2020;e203651. doi:10.1001/jamapediatrics.2020.3651
 9. Perchetti GA, Huang ML, Peddu V, Jerome KR, Greninger AL. Stability of SARS-CoV-2 in Phosphate-Buffered Saline for Molecular Detection. *J Clin Microbiol.* 2020; 23;58(8):e01094-20. doi: 10.1128/JCM.01094-20.
 10. Liu M, Li Q, Zhou J, Ai W, Zheng X, Zeng J, et al. Value of swab types and collection time on SARS-COV-2 detection using RT-PCR assay. *J Virol Methods.* 2020; 286: 113974. doi: 10.1016/j.jviromet.2020.113974
 11. Smith KP, Cheng A, Chopelas A, DuBois-Coyne S, Mezghani I, Rodriguez S, Talay M, Kirby JE. Large-Scale, In-House Production of Viral Transport Media To Support SARS-CoV-2 PCR Testing in a Multihospital Health Care Network during the COVID-19 Pandemic. *J Clin Microbiol.* 2020; 58(8):e00913-20. doi: 10.1128/JCM.00913-20.
 12. Rogers AA, Baumann RE, Borillo GA, Kagan RM, Batterman HJ, Galdzicka MM, Marlowe EM. Evaluation of Transport Media and Specimen Transport Conditions for the Detection of SARS-CoV-2 by Use of Real-Time Reverse Transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 2020; 58(8):e00708-20. doi: 10.1128/JCM.00708-20
 13. Radbel J, Jagpal S, Roy J, Brooks A, Tischfield J, Sheldon M, Bixby C, Witt D, Gennaro ML, Horton DB, Barrett ES, Carson JL, Panettieri RA Jr, Blaser MJ. Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Is Comparable in Clinical Samples Preserved in Saline or Viral Transport Medium. *J Mol Diagn.* 2020 Jul;22(7):871-875. doi: 10.1016/j.jmoldx.2020.04.209.
 14. Rodino KG, Espy MJ, Buckwalter SP, Walchak RC, Germer JJ, Fernholz E, Boerger A, Schuetz AN, Yao JD, Binnicker MJ. Evaluation of Saline, Phosphate-Buffered Saline, and Minimum Essential Medium as Potential Alternatives to Viral Transport Media for SARS-CoV-2 Testing. *J Clin Microbiol.* 2020; 26;58(6):e00590-20. doi:10.1128/JCM.00590-20.