

**EVOLUCIÓN DE UNA PANDEMIA. DISEÑO DE MÉTODOS DE DETECCIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DEL SARS-COV2. APLICACIÓN CLÍNICA Y EPIDEMIOLÓGICA**

Dr. Santiago Melón García

Sección de Virología (Servicio de Microbiología)

HUCA, Oviedo.

En diciembre de 2019, China declara varios casos de neumonía graves de etiología desconocida.

El 7 de enero de 2020 el Centro de Control de enfermedades de China (CCDC) y el gobierno chino informan que el patógeno causante de estos casos de neumonía es un Betacoronavirus con una gran homología con otro miembro de la familia Coronaviridae (el SARS-CoV), que había causado una letalidad del 10% entre los 8000 individuos que había infectado en el año 2003. Por ello, el nombre que se le asigna es SARS-CoV-2.

Los Coronavirus fueron el primer grupo taxonómico que se estableció en la Virología. El primer Coronavirus se descubrió en 1965 y fue visto por primera vez al microscopio electrónico por la viróloga escocesa June D Almeida. Estos virus portan como material genético una cadena de ARN monocatenaria positiva que al actuar como un ARN mensajero, permite acelerar la propagación viral al producir proteínas inmediatamente después de la infección sin otros pasos intermedios. Hay que resaltar que son excepcionalmente grandes (29 kb) para ese tipo de genomas y con envuelta, lo que les hace más vulnerables ante las condiciones externas adversas.

En principio, el SARS-CoV-2 no posee ninguna característica especial que lo haga más virulento. El origen de este nuevo virus se encuentra en el murciélago, aunque en la actualidad el animal intermedio que permitió el salto a humanos del SARS-CoV2 es una incógnita.

Como otros virus que provocan infecciones respiratorias, se transmite a través de la vía aérea. Así pues, lugares cerrados, con mala ventilación y con hacinamiento de personas, propicia su diseminación.

Esta transmisión depende del tiempo y del espacio. Se estima que deben pasar una media de quince minutos y estar en un lugar con muy mala ventilación y una persona afectada que expulse gran cantidad de virus para que la transmisión sea efectiva.

Los síntomas de dicha infección, en general no pasan de fiebre, tos, mal estar, resfriado y cierta fatiga. Y dos signos característicos son la anosmia (pérdida del olfato) y la disgeusia (pérdida del gusto).

Sin embargo, la desprotección de la población ante este nuevo virus ha provocado que el número de infectados sea mayor de lo esperado. Y la gravedad de los síntomas en algunos casos ha provocado el caos sanitario y un desenlace fatal.

Desde el primer momento, el virus comenzó a expandirse por el resto del mundo y urgía el desarrollo de técnicas diagnósticas que permitieran conocer los focos de la infección.

La primera vez que se detectó el virus en España fue el 1 de febrero de 2020, y desde esa fecha la detección fue exponencialmente en aumento, lo que puso de manifiesto la facilidad de dispersión de los virus respiratorios sin las medidas de prevención adecuadas.

En el laboratorio de Virología del servicio de Microbiología del HUCA, con el conocimiento de la secuencia del virus, que se había publicado el 13 de enero de 2020 en las bases de datos universales (GISAID o GenBank) se diseñan cebadores específicos y una técnica de RT-PCR para su detección y se comienza muy pronto buscar el SARS-Cov2 (11 febrero de 2020) y a cuantificar la cantidad de virus

infeccioso, como se hacía para otras infecciones virales.

Durante ese mes de febrero se analizaron 250 muestras pertenecientes a pacientes que acudían con infecciones respiratorias y obviando los protocolos que indicaban que sólo se realizasen controles a pacientes procedentes de zonas con infección activa. Finalmente, el 29 de febrero el primer caso se detectó en Asturias.

Una de las incertidumbres que surgieron en el comienzo de la alarma nacional fue la de la posible circulación del virus en China y en el resto del mundo antes de la fecha de la primera detección. Ante esas sospechas y la posibilidad de llevar a cabo estudios con muestras enviadas previamente para un diagnóstico sindrómico, se llevó a cabo un estudio retrospectivo en el que se analizaron 1000 exudados faríngeos recogidos durante los meses de diciembre y enero, no se encontró ningún positivo frente al SARSCoV2.

A partir de marzo de 2020 las solicitudes de detección de SARSCoV2 se disparan en el mundo y los laboratorios de Virología, que no estaban acostumbrados a recibir tantas muestras, comienzan a tener problemas. En menos de seis meses, el laboratorio de Virología del HUCA, pasó de procesar 200 muestras en los días con mayor carga de trabajo antes de la pandemia, a cerca de 5000.

La enorme demanda mundial de las técnicas de detección de origen industrial provocó los problemas de abastecimiento de reactivos por parte de las compañías biotecnológicas que proporcionaban los tests diagnósticos. El nerviosismo en los laboratorios españoles fue general por la falta de reactivos para la preparación de la muestra para la PCR, la mezcla de reacción e incluso de medios para la recogida de las muestras.

A todos estos inconvenientes, había que sumarle la presión para realizar un diagnóstico que permitiera conocer los focos de infección rápidamente y realizar ingresos en zonas “COVID” para evitar transmisión nosocomial o realizar aislamientos a nivel domiciliario en el caso de que el paciente se encontrase clínicamente estable.

Además, el diagnóstico rápido permitía rastrear los contactos estrechos de los individuos infectados, evitando una expansión descontrolada del virus que impediría conseguir el ansiado “aplanamiento de la curva” de infección en la población.

La realización de la técnica de PCR no es complicada, pero requiere de unos pasos que consumen tiempo (no menos de dos horas) incluso con sistemas completamente automatizados. En la actualidad hay sistemas de procesado rápido, que en 25 minutos pueden dar un resultado. Pero son sistemas individuales que, para cubrir una jornada rutinaria de unas 1000 muestras, se necesitarían no menos de 50 robots.

En cualquier caso, incluso los sistemas automatizados de procesado de múltiples muestras tienen unas limitaciones en la cantidad (no más 2400 al día). Y como comentaba anteriormente, la alta demanda mundial colapsó a la industria biotecnológica con la consiguiente escasez de reactivos.

En el laboratorio de Virología del HUCA, depender de tecnología propia permitió no bajar el rendimiento diagnóstico, como ocurrió en otros laboratorios del país.

El protocolo de detección mediante RT-PCR a tiempo real era similar al que se utilizaba en el laboratorio para otros virus y los reactivos eran intercambiables. Esta tecnología permitía cuantificar la cantidad de virus (carga viral) de la muestra. La carga viral es un marcador de gran importancia en el seguimiento de la enfermedad, nos indica si se está resolviendo la infección o está empezando, así como la capacidad infectiva del paciente: a mayor carga viral mayor probabilidad de transmitir la infección. Esta carga viral se normaliza con la detección en paralelo de un gen celular, que permite a su vez valorar la calidad de la muestra.

Un paso importante en la PCR es la preparación de la muestra (extracción de ácidos nucleicos). También en este punto se recuperaron

métodos generales de preparación de la muestra (prePCR) con reactivos comunes.

E incluso se prepararon y se suministraron a los centros de recogida de muestras, medios de transporte de virus con torundas.

En cuanto al sistema organizativo, el laboratorio se reorganizó para realizar 3 turnos y dar respuesta a todas las solicitudes, proporcionando resultados todo el día. En el 95% de los casos los resultados se proporcionaron en menos de 8 horas. Al crecer tanto la demanda de peticiones, el resto de laboratorios de Microbiología de la comunidad se sumaron a la realización de PCR de diagnóstico del SARS-CoV2, bajo la tutela del HUCA.

Con el fin de acelerar y aumentar la capacidad diagnóstica se ensayaron técnicas de detección de antígenos y de anticuerpos, pero la sensibilidad limitada de los primeros y la tardanza en positivizar de los segundos no permitieron su aplicación en el diagnóstico rápido de esta infección aguda.

Uno de los puntos importantes en el control de la infección fue la estrecha relación con otros servicios del Hospital, en especial con el Servicio de Urgencias que se ocupaban de controlar a todos los infectados ambulatorios y definir a los que se hospitalizaban.

También fue importante la transmisión de información al servicio de Vigilancia de la comunidad asturiana.

En junio, en España comenzó el periodo que se definió como “nueva normalidad” por el descenso de casos. En Asturias, el diagnóstico precoz y el seguimiento estrecho de los casos permitieron un control de la infección hasta llegar a no detectar casos en 25 días (junio/julio 2020). Pero la elevada incidencia en otros lugares y la vuelta a la normalidad provocaron una nueva onda epidémica en noviembre de 2021. La transmisión descontrolada del virus permitió la evolución del virus hacia variantes más o menos agresivas.

Uno de los sucesos más importantes en este periodo fue el desarrollo de vacunas. Sin duda, estas vacunas influyeron muy positivamente en el control, no tanto de la transmisión viral sino en la gravedad de la infección y la mortalidad. Sin embargo, estas vacunas estaban diseñadas sobre una cepa viral

determinada y se tenían dudas de cómo actuarían sobre el resto de variantes circulantes.

Esto obligó a los laboratorios a llevar un seguimiento estrecho de las cepas detectadas. El método más extendido para tal fin es la caracterización del genoma parcial o total con métodos de secuenciación, bien por el método de Sanger clásico o el nuevo método de secuenciación masiva (NGS) respectivamente. El problema de estos métodos es que son laboriosos y lentos (resultados en 7-10 días).

Con el fin de tener una idea más clara y exacta de la situación y dada la trascendencia de los datos, el laboratorio volvió a diseñar sistemas de diagnóstico basados en la amplificación genómica (SNP) para caracterizar rápidamente y en el mayor número de muestras posibles la variante circulante.

Esto permitió identificar el virus circulante en el 83% de los casos en menos de 24 horas. Estos datos se confirmaban posteriormente por los sistemas clásicos de secuenciación, los cuales permitían caracterizar un 5-10% de los casos.

Asturias, como el resto de comunidades autónomas sufrió distintas olas epidémicas, pero fue capaz de controlar antes alguna de ellas e incluso saltársela.

Después de algo más de dos años de pandemia y un millón de PCR de diagnóstico, de 60000 de variantes y 1500 estudios de secuenciación, todos los datos generados permitieron observar la evolución del virus en cada individuo con el seguimiento de la carga viral. Con ello, se pudo individualizar la asistencia y actuar en cada ocasión a la hora de liberar o no camas de hospital. Además, se puso interés en los focos de infección para controlar la transmisión. Finalmente, la evaluación del tipo de virus circulante dio una idea de las tasas de transmisión y su gravedad, además de controlar la eficacia de las vacunas que se fueron inoculando a lo largo de todo el año.