

Recomendaciones del grupo GCECGH para el manejo de muestras hematológicas de pacientes COVID-19 positivos con neoplasias hematológicas destinadas a estudios citogenéticos

ANTECEDENTES

La enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) está causada por el virus SARS-CoV-2. El coronavirus SARS-CoV-2 supone el séptimo coronavirus aislado capaz de provocar infecciones en humanos. Son virus esféricos de 100-160 nm de diámetro, con envuelta y que contienen ARN monocatenario de polaridad positiva de entre 26-32 kb.

El mecanismo de transmisión entre humanos es a través de secreciones de personas afectadas, principalmente por contacto con gotas respiratorias de más de 5 micras, con las manos o los fómites contaminados con secreciones de la mucosa de la boca, nariz u ojos. El SARS-Cov-2 se ha detectado en distintos tipos de secreciones, incluyendo la saliva.

Con respecto a la presencia del SARS-CoV-2 en muestras hematológicas, la información a día de hoy es muy limitada. En un primer trabajo Wang *et al* (1) analizaron 307 muestras de sangre periférica (SP) procedentes de 205 pacientes con COVID-19 y detectaron mediante técnicas de RT-PCR la presencia de virus en un 1% de las muestras analizadas. Este resultado estaba en consonancia con el trabajo de Wölfel *et al* (2), en el que analizaron 31 muestras de suero de muestras de SP y no detectaron presencia del SARS-CoV-2 en ninguna de ellas. Sin embargo, este hallazgo contrasta con el descrito recientemente por Zheng *et al* (3) que detecta la presencia del virus hasta en un 41% de los pacientes en muestras de suero. Cabe destacar que todas estas aproximaciones son de muestras de SP. A día de hoy, no existe evidencia de presencia del virus SARS-CoV-2 en muestras de médula ósea y se desconoce la capacidad replicativa del virus en cultivos *in vitro* de muestras hematológicas.

Las recomendaciones contenidas en este documento se han elaborado en respuesta a la situación epidemiológica actual y con el conocimiento disponible hasta la fecha, y podrán ser revisadas ante cambios en el contexto o nuevas evidencias sobre el comportamiento del SARS-CoV-2.

CONSIDERACIONES GENERALES

- Debe evitarse el envío de muestras de pacientes con sospecha/confirmación de infección por COVID-19 por bala neumática.
- Todas las personas que participen en el traslado de las muestras deberán tener la formación suficiente y deberán estar en número suficiente para realizar esta operación minimizando los riesgos.
- Se recomienda poner una etiqueta de riesgo biológico a las muestras de pacientes con confirmación de infección por COVID 19.
- Las muestras de pacientes con infección confirmada se trabajarán de forma individual en los equipos, no utilizando sistemas comunes de entrada de muestras ni de archivos; de forma que se tenga perfectamente localizada la muestra para su gestión de una en una.

NIVEL DE BIOSEGURIDAD EN LABORATORIOS DE CITOGÉNICA HEMATOLÓGICA

Tal y como indica la OMS, todos los laboratorios de diagnóstico deben estar diseñados para cumplir, como mínimo, los requisitos del nivel de bioseguridad 2. Dado que ningún laboratorio puede ejercer un control absoluto sobre las muestras que recibe, el personal puede verse expuesto a organismos de grupos de riesgo más altos de lo previsto (4).

Las guías de laboratorios de bioseguridad (LBS) relacionadas con el nuevo coronavirus SARS-cov2 publicadas por la OMS (5) contemplan dos escenarios, por un lado, las pruebas de diagnóstico no basadas en cultivo (no propagativas), donde incluye la PCR y que deben realizarse en LBS nivel 2, y las técnicas propagativas (cultivos de virus, ensayos de aislamiento y neutralización) que deberían realizarse en LBS nivel 3.

En ambos tipos de laboratorios se requiere de cámaras de seguridad biológica (CSB). Las CSB se utilizarán **(i)** siempre que se manipule material infeccioso; **(ii)** cuando haya un alto riesgo de infección transmitida por vía aérea y **(iii)** cuando se utilicen procedimientos con grandes posibilidades de producir aerosoles, como la centrifugación, trituración, homogeneización, agitaciones o mezcla vigorosa, desintegración ultrasónica, apertura de envases de materiales infecciosos cuya presión interna pueda diferir de la presión ambiental.

Los **aerosoles** se producen en cualquier actividad que transmita energía a un material líquido o semilíquido, por ejemplo, al agitarlo, verterlo a otro recipiente, removerlo o verterlo sobre una superficie o sobre otro líquido. Las actividades como la siembra de placas de agar, la inoculación de frascos de cultivo celular con pipeta, el uso de pipetas múltiples para dispensar suspensiones líquidas de agentes infecciosos en placas de microcultivo, la homogeneización y la agitación vorticial de material infeccioso, y la centrifugación de líquidos infecciosos o el trabajo con animales pueden generar aerosoles infecciosos.

Si las CSB no se usan correctamente, sus efectos protectores pueden verse gravemente disminuidos. Los trabajadores deben tener cuidado de mantener la integridad del flujo de entrada de aire por la abertura frontal al meter y sacar los brazos de la cámara. Los brazos deben moverse con lentitud, perpendicularmente a la abertura frontal. Es conveniente esperar aproximadamente un minuto después de meter las manos y los brazos en la cámara antes de comenzar a manipular el material, con el fin de permitir que la cámara se ajuste y el aire barra las manos y los brazos. El número de movimientos a través de la abertura frontal también debe reducirse al mínimo colocando todo el material necesario en el interior antes de comenzar las manipulaciones. La rejilla frontal de entrada de las CSB no debe estar bloqueada con papeles, instrumental ni otros objetos. La superficie de los materiales que haya que colocar en el interior de la cámara debe descontaminarse con alcohol al 70%.

Las CSB requeridas para el manejo de muestras con SARS-CoV-2 son las CSB clase II. Las cabinas de flujo de aire horizontal y vertical («bancos de trabajo de aire limpio») no son CSB y no deben emplearse como tal. Ya que actualmente no existe evidencia de la capacidad replicativa del virus en los cultivos *in vitro* de muestras hematológicas se recomienda realizar las técnicas en LBS nivel 2 en CSB clase II como mínimo. Las características de los distintos laboratorios de bioseguridad y las CSB se detallan en el Manual de Bioseguridad en el Laboratorio

3ª edición

(https://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf).

EQUIPO DE PROTECCIÓN INDIVIDUAL

Será altamente recomendado que el personal que manipule las muestras destinadas a estudio citogenético lleve los equipos de protección individual que se indican:

- Bata impermeable
- Doble guante
- Mascarilla FFP2 o superior
- Gafas de protección

DESINFECTANTES

Se recomienda el uso de hipoclorito sódico (lejía) desde un rango del 0.1% (superficies) al 10% (material en contacto con la muestra) y de etanol al 70%.

Para descartar los sobrenadantes y el material de laboratorio que entra en contacto con la muestra (puntas de pipeta, pipeta Pasteur) se dispondrá dentro de la CSB de un recipiente con lejía al 10% que podrá cerrarse herméticamente y desecharlo en su cubo correspondiente. Se asegurará que el material entra completamente en contacto con la solución desinfectante al menos 15 minutos para asegurar la inactivación del virus.

PROCEDIMIENTOS ESPECÍFICOS DE CITOGENÉTICA

1. Cultivo de muestras hematológicas

Durante el proceso del cultivo de muestras de hematológicas la generación de aerosoles es constante (pipeteo, vortex, ...) por lo que será altamente recomendable el procesamiento de dichas muestras en CSB clase II.

En el caso de no disponer de la CSB clase II, el espacio destinado al procesamiento de la muestra será un lugar separado y se evitará la circulación de personas alrededor.

Se recomienda trabajar con material de plástico y con tapón de rosca en sustitución de material de vidrio.

En el caso de no disponer de centrífuga dentro de la CSB, deberán cerrarse todos los tubos antes de retirarlos de la misma. Una vez cerrados, se procederá a su centrifugación con normalidad.

Se recomienda descontaminar con etanol 70% todo lo que se vaya a introducir a la CSB y antes de retirar el material de la CSB.

A continuación, se detalla cómo realizar alguno de los procedimientos:

- **Contaje celular en cámara de Neubauer:**
 - Cargar la muestra en CSB clase II.
 - Realizar el contaje en microscopio.
 - Limpiar la cámara en etanol 70%. Cambiar el etanol 70% entre una vez y otra.

- **Siembra:**
 - Se realizará en CSB clase II.
 - Utilizar frascos de cultivo con tapón de rosca y filtro.
 - Desechar las puntas de pipeta en un recipiente con solución desinfectante.

- **Sacrificio:**
 - Se recomienda realizar todo el procedimiento en CSB.
 - La incorporación de la colchicina así como el choque hipotónico debe realizarse en la CSB por la generación de aerosoles durante el procedimiento.
 - Todo el procesamiento posterior a la fijación de la muestra no requiere el uso de CSB.

2. Separación de células plasmáticas CD138+

Método manual

Todo el procesamiento se realizará en la CSB clase II

Método automático (AutoMACs)

Se recomienda ubicar el equipo de separación en la CSB clase II. Si no es posible, el equipo de separación (AutoMACs) se ubicará en un espacio separado y se evitará la circulación de personas alrededor del equipo durante su uso.

Todo el procesamiento previo (Ficoll, añadir el anticuerpo) a la separación inmunomagnética se realizará en la CSB clase II.

3. Técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

La técnica de FISH a partir del material fijado en Carnoy procedente del cultivo de citogenética se podrá realizar sin necesidad de CSB.

En el caso de realizar la técnica de FISH a partir de una muestra fresca (sin realizar cultivo previo), todo el procesamiento previo a la fijación de la muestra se realizará en la CSB clase II.

ALMACENAMIENTO A CORTO Y LARGO PLAZO

Las muestras que sean de interés diagnóstico y hayan sido tratadas, con soluciones lisantes o detergentes no parecen conllevar ningún riesgo y podrán ser almacenadas

REFERENCIAS

1. Wang W, Xu Y, Gao R, *et al.* Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. JAMA 2020 (in press)
2. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, *et al.* Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. Nature 2020 (*in press*)
3. Zheng S, Fan J, Yu F, *et al.* Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January-March 2020: retrospective cohort study
4. Manual de bioseguridad en el laboratorio. – 3a ed. Geneva: Organización Mundial de la Salud; 2004 (<https://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf?ua=1>, accessed 14 February 2020)
5. Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease (COVID-19) Interim guidance 19 March 2020 ([https://www.who.int/publications-detail/laboratory-biosafety-guidance-related-to-coronavirus-disease-2019-\(covid-19\)](https://www.who.int/publications-detail/laboratory-biosafety-guidance-related-to-coronavirus-disease-2019-(covid-19)))