

XII.-CORONAVIRUS

Dra. Clara Savón Valdés, Prof. Angel Goyenechea Hernández, Dra. Belsy Acosta Herrera, Lic. Odalys Valdés Ramírez MsC, Dra Suset Oropesa Fernández, Lic. Lídice Palerm Caraballo, Lic. Alexander Piñón Ramos.

INTRODUCCION:

Los Coronavirus pertenecen a la familia Coronaviridae, género Coronavirus. Son partículas pleomórficas de 80-160 nm, envueltos con proyecciones superficiales en forma de pétalo que le dan el aspecto de una corona solar. Estos virus son ARN de cadena simple no segmentado, pero sin embargo poseen una frecuencia de recombinación relativamente alta. Esta familia comprende una serie de virus que producen infecciones en los humanos y los animales. Los Coronavirus humanos conocidos son los 299E y OC43, que constituyen los agentes etiológicos del resfriado común. Se ha descrito que su periodo de incubación es de 2 a 5 días, y por lo general los síntomas desaparecen a la semana. Las vías respiratorias inferiores rara vez son afectadas, aunque ocasionalmente se ha observado neumonía en el recién nacido, adulto mayor, pacientes inmunodeprimidos y en reclutas (1, 2).

Los Coronavirus son cosmopolitas, siendo más frecuentes en invierno y primavera. Pueden llegar a constituir el 35% del total de las infecciones respiratorias altas en épocas de alza, la reinfección es común y puede ocurrir a cualquier edad, aunque es más frecuente en los niños.

Actualmente se aplican métodos de detección de antígenos por inmunofluorescencia y ELISA y PCR (3).

El aislamiento es muy difícil en cultivos celulares y se realiza en cultivos de células embrionarias, en las últimas décadas se han logrado adaptar su crecimiento en algunas líneas celulares. El diagnóstico serológico más utilizado hasta el momento es por fijación del complemento y ELISA en sueros pareados.

I.-CORONAVIRUS COMO AGENTE ETIOLOGICO DEL "SARS "

Dentro de las infecciones respiratorias agudas (IRA) los cuadros más importantes son producidos por el virus de Influenza, pues son los que causan el mayor número de casos y fallecidos. No obstante recientemente han aparecido cuadros de infección respiratoria aguda emergentes causados por nuevos agentes. Albert Osterhaus en el 2001 (4) reporta una infección respiratoria severa en lactantes, ancianos e inmunocomprometidos con un cuadro clínico-epidemiológico

compatible con el producido por el Virus Respiratorio Sincitial, pero se llega a la conclusión de que constituye un nuevo agente etiológico el Metapneumovirus humano.

Desde el pasado mes de noviembre del 2002 comienza a presentarse en China en la Provincia de Guangdong un brote de enfermedad respiratoria aguda caracterizada, por fiebre de 38⁰ C, asociada a tos seca y disnea progresiva, demostrándose en los Rx de Tórax una Neumonía Atípica llevando al paciente a un Distress Respiratorio y la muerte. Otros síntomas asociados son la cefalea, mialgia, anorexia, debilidad, confusión, rash cutáneo y diarrea y su período de incubación ha sido descrito entre los 2-10 días. Este cuadro clínico no respondió al tratamiento con antibióticos, este síndrome respiratorio agudo severo fue nombrada como SARS por primera vez el 12 de Marzo 2003 después que comenzaran a aparecer brotes con similares características en Vietnam, Canadá y Hong Kong, activándose un sistema de Vigilancia Global por la OMS, (5). El aislamiento de un agente infeccioso en pacientes con SARS y su posterior identificación llevaron a la comunidad científica internacional a concluir de que el agente etiológico del SARS lo constituye un Coronavirus nuevo que no está relacionado con los Coronavirus humanos conocidos o animal hasta el momento (6).

Se plantea que el Coronavirus SARS se transmite a través de los aerosoles que se producen al toser o estornudar el paciente, pero también la infección puede diseminarse por vial fecal oral y superficies contaminadas. Este virus es estable en orina a temperatura ambiente por 24 a 48 horas, en las heces fecales por un espacio de 1-4 días a pH básicos en pacientes con diarrea, en saliva a temperatura ambiente por cinco días pero se inactiva en 5 minutos con acetona, formaldehído y paraformaldehído al 10%, etanol al 75%, fenol al 2% y desinfectantes comerciales como el chlorax al 10%. (7).

La mortalidad de este virus emergente fluctúa con la edad de acuerdo con los criterios emitidos recientemente por la Organización Mundial de la Salud, así se ha observado una mortalidad de 1% en los niños de 1 a 14 años de edad, 6% en las edades comprendidas entre 15 a 44 años, 15% en las edades de 45 a 64 y 50% en los pacientes de 65 años ó más (8).

II.-CRITERIOS DE DEFINICION E INCLUSIÓN DE CASO DE SARS

Caso sospechoso

1. Toda persona que **después del 1 de noviembre de 2002**¹ haya presentado fiebre (temperatura >38°C) y uno o más de los siguientes signos y síntomas:

- tos o dificultad respiratoria
- y se ha expuesto a una o más de las siguientes situaciones durante los 10 días anteriores a la aparición de síntomas:
- **contacto directo**² con un caso sospechoso o probable de SARS;
 - antecedente de viaje internacional, a un **área afectada**³ en la cual se ha informado foco de de SARS;
 - residencia en **el área afectada**.³

2. Toda persona que fallece a causa de una enfermedad respiratoria aguda de etiología desconocida **después del 1 de Noviembre de 2002**¹ en la que no se ha podido realizar ninguna autopsia y que se ha expuesto a una o más de las siguientes situaciones durante los 10 días anteriores a la aparición de síntomas:

- **contacto directo**² con un caso sospechoso o probable de SARS;
- antecedente de viaje internacional, a una **área afectada**³ en la cual se ha informado foco de transmisión de SARS;
- residencia en **el área afectada**.²

Caso probable

1. Caso sospechoso con radiografía de tórax que presenta evidencia de infiltrados compatibles con neumonía o síndrome de dificultad respiratoria.
2. Casos sospechoso con hallazgos anatomopatológicos consistentes con un síndrome de dificultad respiratoria de etiología desconocida.

Criterios de exclusión: El caso puede ser excluido cuando método (s) de diagnóstico (s) determine (n) la causa de la enfermedad.

El periodo de vigilancia se inicia el 1 de noviembre de 2002 para que abarque los casos de neumonía atípica registrados en China que ahora se consideran como casos de SARS. La transmisión internacional del SARS se notificó por primera vez en marzo de 2003 (se trataba de casos aparecidos en febrero de 2003).

² **Contacto directo:** Se refiere a cualquier acercamiento cercano o exposición a fluidos corporales o secreción respiratoria que el paciente pudo tener con un caso sospechoso o probable de SARS.

³ **Área afectada:** Se define como un área en la cual se notificó transmisión local. Para información actualizada sobre las Áreas afectadas, consulte la siguiente página Web: <http://www.who.int/csr/sars/en/>.

II.1.-Reclasificación de casos:

El SARS actualmente se diagnostica por exclusión. La clasificación del caso está sujeta a constantes cambios a medida que nuevas informaciones se van acumulando. No obstante, el manejo terapéutico del paciente se realizará de acuerdo a la presentación clínica del mismo.

En cuanto a la reclasificación de casos se pueden presentar las siguientes situaciones:

- Un caso inicialmente clasificado como sospechoso o probable se considera descartado cuando a través de un diagnóstico alternativo se explica la causa de su enfermedad.

- Un caso inicialmente clasificado como sospechoso es reclasificado como probable cuando después de una exhaustiva investigación cumple con la definición de caso probable.
- Un caso sospechoso en el cual la recuperación es adecuada pero en el que la causa de su enfermedad no ha sido suficientemente explicada por un diagnóstico alternativo debe seguir siendo considerado como sospechoso.
- Un caso sospechoso que fallece a causa de su enfermedad debe seguir siendo considerado como sospechoso cuando no ha podido realizarse la autopsia. Sin embargo, si el caso es identificado como parte de la cadena de transmisión del SARS, el caso debe ser reclasificado como probable.
- Cuando la autopsia determine que no existe evidencia anatopatológica de SDR el caso debe ser descartado.
- Un caso sospechoso con radiografía de tórax (RX) normal debe ser tratado y se le debe hacer un seguimiento de por lo menos siete días. Aquellos en los que la recuperación no es total deben ser re evaluados por RX.

Fuente: Organización Mundial de la Salud (OMS), 1 de abril de 2003.

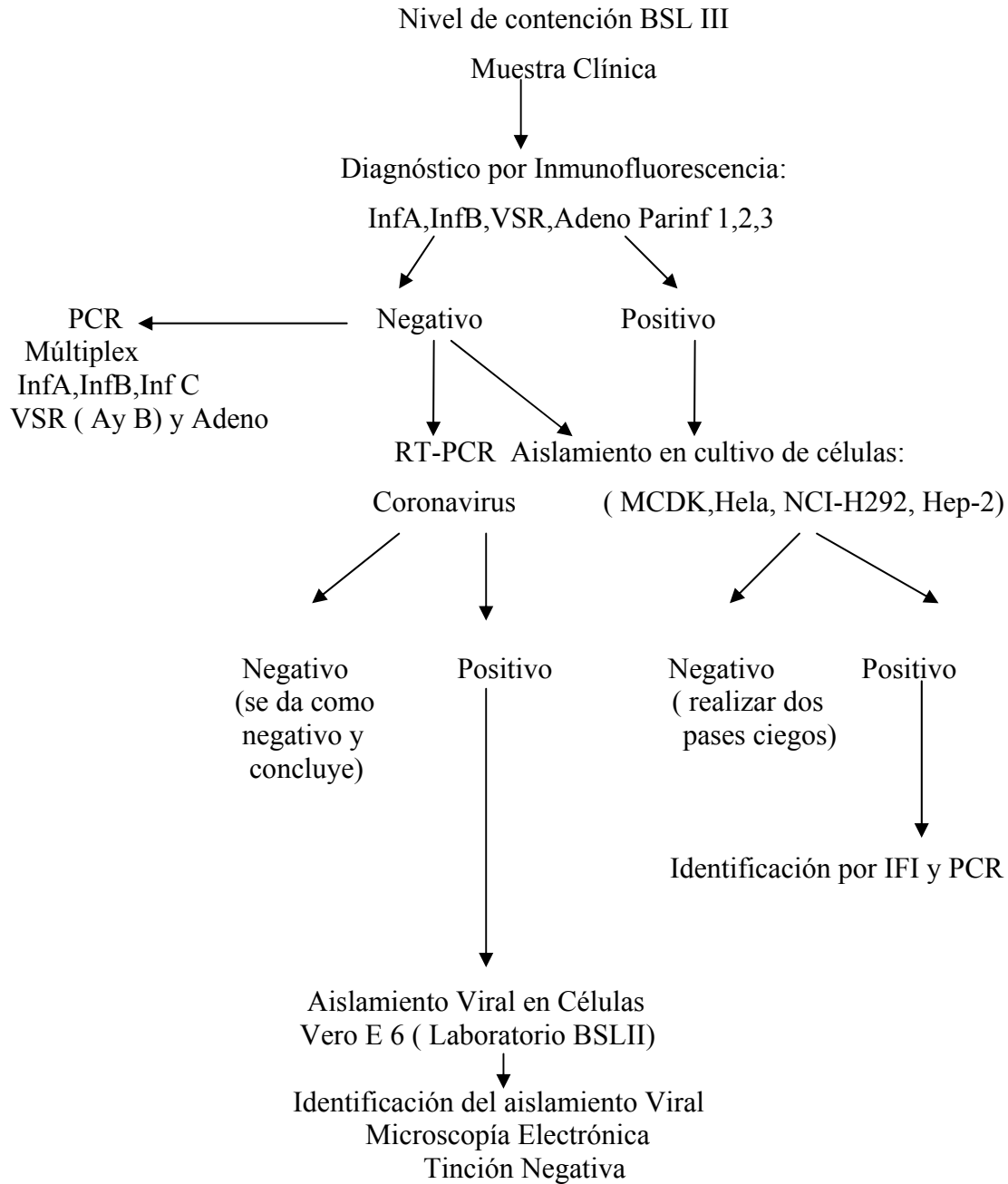
II.2.-RECOMENDACIONES ESPECIALES:

Todo caso sospechoso de SARS deberá obligatoriamente ser reportado por las autoridades de Salud Nacionales a la Organización Mundial de la Salud de forma sistemática.

REFERENCIAS:

- 1.- El Sahly; Aumar RL,; Glezen WP, Greenberg SB. Spectrum of clinical illness in hospitalized patients with Common Cold virus infections. Clin Infect Dis 2000;31:96-100.
- 2.- Wenzel RP, Hendley JO; Davis JA; Gwaltney JM. Coronavirus infections in military recruits: three years study with coronavirus strain OC43 and 229E. Am Rev Resp Dis 1984;109:621-24.
- 3.- Pitkaranta A; Virolainen; Jero J; Arruda E; Hayden FG. Detection of Rhinovirus, Respiratory Syncytial Virus, and Coronavirus infections in Acute Otitis Media by Polymerase Chain Reaction. Pediatrics 1998;102(2):290-294.
- 4.- Van der Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, De Groot R, Fouchier RA, Osterhaus AD. A Newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. 2001
- 5.- Severe Acute respiratory syndrome (SARS). Wkly Epidemiol Rec 2003;78:81-3.
- 6.- World Health Organization. SARS Laboratory Network. Conference April 16 2003.
- 7.- Seto WH; Tsang D; Yung RWH; Ching TY; Ng TK; Ho M et al. Effectiveness of precautions against droplets and contact prevention of nosocomial transmission of severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) The Lancet May 3, 2003; 361(9368).
- 8.- OMS EURO MED SARS May 5 2003.

III.-FLUJO DE TRABAJO DEL CORONAVIRUS SARS



IV.-DIAGNOSTICO DE LABORATORIO:

Debido a la naturaleza de esta entidad y teniendo en cuenta que su vía de transmisión es de persona a persona se recomienda que toda muestra clínica de paciente sospechoso de SARS deben ser manipuladas con un nivel de bioseguridad III. Las muestras deberán ser alicuotadas en cabinas de seguridad dentro de los laboratorios BSL-III. Los sueros que serán testados deberán

irradiarse con radiaciones ganma 2×10^6 rad mientras se congelan en hielo seco antes de ser trasladados a otra área de trabajo fuera del BSL III. La extracción de ácido nucleicos se debe realizar por columnas ya que es un método más rápido y con menores posibilidades de producirse aerosoles que pudieran contaminar al personal de laboratorio.

IV.1.-Muestras Clínicas útiles para el diagnóstico de SARS:

Las muestras clínicas para el diagnóstico de SARS son las ya descritas para la toma de muestra de cualquier entidad respiratoria (Acápites de toma de muestras). Debe cumplirse estrictamente para su traslado el Sistema de Triple Empaque propuesto por la OMS para el traslado de muestras peligrosas.

IV.2.-DIAGNÓSTICO DE CORONAVIRUS SARS MEDIANTE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERSA (PCR).

La emergencia del Coronavirus SARS y la creación de una red de laboratorios para encontrar métodos diagnósticos eficaces ha dado como resultado que se hayan desarrollado diferentes protocolos de trabajo que permitan el diagnóstico mediante la reacción en cadena de la polimerasa. (1) Entre los científicos más destacados en esta labor se encuentra Drosten (2) el cual desarrolló un protocolo de PCR utilizando iniciadores a partir del gen de la polimerasa para el diagnóstico de muestras clínicas de pacientes sospechosos de SARS que a continuación detallaremos.


Equipos:

- Laboratorio BSL III
- Gabinete de Seguridad Clase II
- Centrifuga de viales con rotor con protección para muestras de alto riesgo
- Congelador $-70^{\circ}C$
- Refrigerador $4^{\circ}C$
- Autoclave
- Termocilador
- Transiluminador
- Camara de electroforesis submarina
- Vortex


Materiales y Reactivos:

- Tapa bocas tipo NP -96
- Piyamas de laboratorio
- Sobrebatas desechables
- Guantes.
- Gorros
- Botas desechables
- Micropipetas de 0.2,10-20,50-100,100-1000 μ L
- Puntas con filtro de algodón para micropipetas
- Viales de 0.5 mL
- Viales 1.5mL
- Kit de RT PCR -Access Promega
- TBE 1X
- Estuche de Extracción de ARN (QIA Amp Viral ARN mini Kit Qiagen)
- Iniciadores (ver tabla)
- Amplitaq Pol (Perkin Elmer)
- Buffer Amplitaq Pol (Perkin Elmer)

IV.2.1.-Oligonucleótidos de la Primera Reacción de Amplificación

Oligonucleotidos	Posición	Secuencia (5'  3')
BNI extremo (+)	18153-18176	ATGAATTACCAAGTCAATGGTTAC
BNIextremo (-)	18321-18342	CATAACCAGTCGGTACAGCTAC

IV.2.2.- Oligonucleótidos de la Segunda Reacción de Amplificación

Oligonucleotidos	Posición	Secuencia (5'  3')
BNI interno(+)	18201-18220	GAAGCTATTCGTACGTTTCG
BNIinterno (-)	18288-18309	CTGTAGAAAATCCTAGCTGGAG

IV.3- Extracción de ARN Viral (QIA Amp Viral RNA mini Kit Qiagen)

IV.3.1-PROCEDIMIENTO:

Este se realiza de acuerdo con las instrucciones propuesta por el fabricante

- Tomar un vial de 1.5 mL y añadir 140µL de muestra clínica más 560 µL de Buffer AVL 1 y 3.5µL de β mercaptoetanol.
- Dar vortex durante 15´ segundos.
- Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Dar un golpe de centrifuga.
- Adicionar 560µL de etanol absoluto mezclar en vortex durante 15 segundos y luego dar un golpe de centrifuga.
- Tomar 630 µL y aplicar en toda la membrana de la columna.
- Centrifugar a 8 000 r.p.m. durante 1 minuto a temperatura ambiente (TA).
- Descartar filtrado.
- Añadir 500µL de buffer AW1 y centrifugar a 8000 r.p.m. a TA durante un minuto.
- Descartar el filtrado.
- Adicionar 500µL de buffer AW2 y centrifugar a 13 000 r.p.m. durante 3 minutos a TA.
- Descartar el filtrado.
- Colocar la columna en vial eppendorf de 1.5mL y añadir 60 µL de AVE e incubar un minuto a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 8000 r.p.m. durante un minuto a TA, el filtrado así obtenido constituye el ARN Viral extraído.

IV.4.-Primera Reacción de Amplificación o RT-PCR

- Preparar tubos eppendorf de 500µL con la mezcla de reacción que se muestra a continuación:

Reactivos de la mezcla	Cantidad por tubo
Buffer AMV 5X	10µL
MgSO ₄ 50mM	6µL
BNI extremo (+)10µm	1µL
BNIextremo (-)10µm	1µL
dNTP(A, C, G, T) 100mM	1µL
AMVRT 5u /µL	1µL
TFL 5u/µL	1µL
H ₂ O	19µL
Cantidad total de mezcla	40µL

- Añadir 10µL del ARN extraído al tubo con la mezcla de reacción para completar un volumen final de 50µL.
- Dar un golpe de centrifuga para que se mezcle bien el ARN con la mezcla de reacción.
- Colocar los tubos en el termociclador bajo las siguientes condiciones.

Ciclos	Temperatura	Tiempo(minutos)
RT	45 ⁰ C	30min
	95 ⁰ C	3min
PCR x 10 ciclos	95 ⁰ C	10segundos
	60 ⁰ C	10segundos
	72 ⁰ C	20segundos
PCR x 40 ciclos	95 ⁰ C	10segundos
	56 ⁰ C	20segundos
	72 ⁰ C	20segundos

IV.5.- Segunda reacción de amplificación o PCR Anidada

- Preparar tubos eppendorf de 500µL con la mezcla de reacción que se muestra a continuación:

Reactivos de la mezcla	Cantidad por tubo
Buffer AmpliTaqPol 10X	5µL
MgCl ₂ 50mM	2.5µL
dNTP(A, T, G, C) 200µM	4µL
BNI interno(+) 10µM	1µL
BNIinterno (-) 10µM	1µL
Ampli Taq Pol	0.25µL
H ₂ O	24.25µL
Cantidad total de mezcla	48µL

- Añadir 2µL del producto de la primera reacción de amplificación al tubo con la mezcla de reacción para completar un volumen final de 50µL.
- Dar un golpe de centrifuga para que se mezcle bien el ADN con la mezcla de reacción.
- Colocar los tubos en el termociclador bajo las siguientes condiciones:

Ciclos	Temperatura	Tiempo
PCR	95 ^o C	3minutos
PCR x 10 ciclos	95 ^o C	10segundos
	60 ^o C	10segundos
	72 ^o C	20segundos
PCR x 25 ciclos	95 ^o C	10segundos
	56 ^o C	10segundos
	72 ^o C	20segundos

IV.6.-Detección del producto amplificado.

- Tomar 8µL de cada uno de los productos de la segunda reacción de amplificación, así como, del marcador de peso molecular (Marker V Bioscience) y mezclar con 2µL de tampón de muestra para electroforesis 6X.
- Aplicar en un gel de agarosa al 2% en TBE 1X.
- Realizar la corrida a 90V durante 1hora.
- Exponer el gel a la luz ultravioleta en un transiluminador.
- Realizar la lectura.

* Se consideran positivas aquellas muestras cuyo tamaño de banda sea de 110 pb.

SOLUCIONES :

Tampón de electroforesis. TBE 5X pH 8.0

TRIS	54g
ACIDO BORICO	27.5g
EDTA	20mL *
H2O C.S.P.	1000 mL

*20mL de EDTA 0.5M

Nota :para preparar TBE 1X tomar 200mL de TBE 5X y completar con 800 mL de agua.

Tampón muestra 6X

EDTA	500mM
Glicerol	10%
Azul de Bromofenol	0.01%

Gel de Agarosa al 2%

Agarosa	2gr
TBE IX	100 mL
Bromuro de etidio	0.1µg/mL

Referencias:

- 1.- Peiris J S M ;Lai S T; Poon L IM, Guan Y, Yam L Y C, Nichols J et al . Coronavirus as possible of severe acute respiratory syndrome. The Lancet online April 8, 2003.
- 2.-Drosten C; Gunther S, Preiser W; van der Werf S; Brodt H R;Becker S et al. Identification of a Novel Coronavirus in patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. New England JouARNI of Medicine online April 23 ,2003.

V.-AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL CORANAVIRUS SARS.

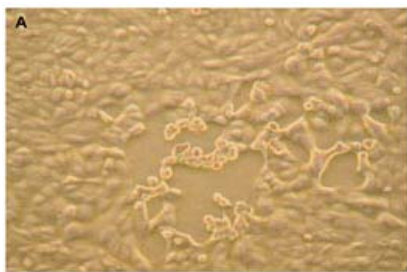
Como ya ha sido descrito en epígrafes anteriores toda muestra clínica de un paciente sospechoso o probable de SARS se debe trabajar en un laboratorio de contención tipo BSL -III.

El aislamiento del Coronavirus asociado al SARS se puede obtener a partir de muestras de sangre, suero, exudados nasofaríngeos, esputo y fragmentos de órganos de pacientes fallecidos. Estas muestras pueden ser inoculadas en una gran variedad de líneas celulares continuas tales como; Vero E 6, NCI-H292, MDCK, LLC-MK2, esta diversidad de líneas celulares permite obtener el aislamiento de cualquier Virus Respiratorio, ya que la presentación clínica inicial de la enfermedad es perfectamente compatible con el cuadro clínico producido por otros virus respiratorios.

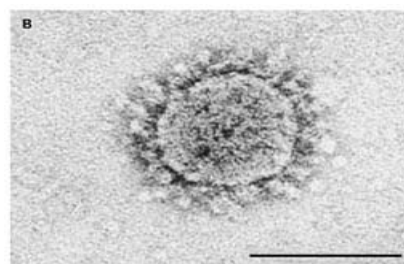
Sin embargo los estudios realizados por Ksiazek y cols en el 2003 corroboran que la línea celular de elección es la Vero E 6, donde se reporta un efecto citopático al quinto día después de la inoculación. ECP inicialmente se manifiesta como un efecto focal de redondeamiento celular, refringencia, que más tarde se extiende afectando toda la monocapa celular y entre las 24 a 48 horas después de la aparición del foco se observa un desprendimiento de la misma. Una vez

logrado el aislamiento viral, al realizar pases sucesivos el ECP total se observa entre 24 a 48 horas. (1, 2).

La identificación del agente aislado puede realizarse por Microscopía Electrónica empleando la técnica de tinción negativa. La observación de partículas virales de 80 a 140nm de diámetro, con proyecciones que la rodean y le confieren un aspecto de corona nos permite plantear que estamos en presencia de un Coronavirus.(3).



A



B

A. Efecto citopático en células VERO E6

B. Imagen de microscopía electrónica por tinción negativa del Coronavirus SARS.

Equipos:

Laboratorio BSL-III

Gabinete de seguridad Clase II

Incubadora de 37⁰ C

Centrífuga de tubos de cultivos con rotor protegido

Microscopio óptico invertido

Materiales y Reactivos:

Batas

Tapa bocas con filtro NP 96

Guantes

Piyamas

Sobrebatas desechables

Gorros

Botas

Pipetas 2 y 5 mL

Micropipetas 200 y 1000 μ L

Puntas de Micropipetas

Rotuladores

Medio 199 ó Parker

Antibiótico

Suero Bovino Fetal

Tubos de cultivo 12 x 75 sembrados con 150,000 cel/mL con Células Vero E 6

Gradillas de tubos de cultivo

V.1.-PROCEDIMIENTO:

Observar los tubos para ver si la monocapa celular tiene el 75% de confluencias.

A los tubos sembrados con células Vero E 6. Descartar el medio de cultivo.

Inocular por duplicado 200 μ L de la muestras clínica (ver acápite de muestras clínicas). En cada gradilla se dejan dos controles de células permiten que comparar los cambios morfológicos que se observan en los tubos inoculados (células redondas). Y que pueden ser utilizados como control negativo en la prueba de identificación.

- Centrifugar los tubos inoculados a 2000 r.p.m. durante 45 minutos a 33⁰ C.
- Adicionar el medio de cultivo de mantenimiento para el aislamiento viral e incubar a 37⁰ C.
- Pasadas las primeras 24 horas se realiza un cambio de medio. Esto se hace con el objetivo de proporcionar nutrientes frescos a las células y favorecer el aislamiento viral e incubar a 37⁰ C.
- Siguiendo día. Observar los tubos detenidamente buscando algún cambio morfológico (focos) e incubar nuevamente. Es importante estar atentos a los cambios de pH.
- Continuar la observación diaria y si fuera necesario cambiar el medio.
- Si el ECP no ha aparecido al día 14, es aconsejable, desprender el cultivo celular de forma aséptica (con una pipeta de cristal estéril o policia de goma estéril) e inocular de nuevo repitiendo los pasos anteriores.
- Cada muestra clínica debe tener al menos 3 pases (una siembra o inoculación primaria y dos pases ciegos) antes de informar el caso como negativo.

- Si el ECP característico de Coronavirus aparece en algún caso, debe tomarse un tubo para realizar la identificación por Microscopía Electrónica y el duplicado se guardará a -70° C para pases sucesivos.
- De cada aislamiento viral debe tenerse, al menos 5 réplicas de 1mL para trabajos posteriores de caracterización genómica.

REFERENCIAS:

- 1.-Ksiazek T G; Erdman D; Goldsmith C; Zaki S; Peret T; Emery S et al . A novel coronavirus associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. New JouARNl of Medicine May 2003 ;348(20):19531965.
- 2.- Drosten C; Gunther S, Preiser W; van der Werf S; Brodt H R;Becker S et al. Identification of a Novel Coronavirus in patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. New England Jouarnl of Medicine online April 23 ,2003.
- 3.. Peiris J S M ;Lai S T; Poon L IM, Guan Y, Yam L Y C, Nichols J et al . Coronavirus as possible of severe acute respiratory syndrome. The Lancet online April 8, 2003.