

Hisopado endocervical en mujeres con síntomas de COVID-19 provenientes de departamentos del Paraguay

Endocervical swabbing in women with COVID-19 symptoms from departments of Paraguay

Ana Soilán¹, Beatriz Soilán², Graciela Russomando³, Graciela Riera³, Andrea Fernández², Eliza Navarro², Lida Sosa⁴, Lujan Britez², Andrea Zorrilla⁵, Gilberto Sosa⁶, Griselda Mora⁷, Daniel Dávalos⁷, Marcelo Alborn Jover³, Lorena Lagrave³, Fanny Paiva², Pamela C. Richard⁷ y Leticia Corbalán⁸

¹ACSA Posgrado.

²Curso de Posgrado TGI y Coloscopia.

³Servicio Nacional de Salud Animal-SENACSA.

⁴Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social.

⁵Hospital Regional de Villarrica.

⁶Hospital Regional de Ciudad del Este.

⁷Hospital Nacional.

⁸Hospital Regional de San Lorenzo.

Conflictos de interés: ninguno.

Financiamiento: ACSA SRL.

Recibido: 1 de julio de 2021 / Aceptado: 19 de agosto de 2021

Resumen

Introducción: El COVID-19 es eminentemente una infección de transmisión e inicio respiratorio, se discute la existencia de otras fuentes de contagio. El receptor viral ACE2 también ha sido detectado en el útero y en la vagina; de allí se ha planteado el compromiso del virus SARS-CoV-2 sobre el sistema genitourinario y sus posibles repercusiones en el embarazo. **Objetivo:** Determinar la presencia de SARS-CoV-2 en muestras endocervicales de mujeres con COVID-19 en departamentos del Paraguay. **Pacientes y Métodos:** Diseño observacional prospectivo, de corte transversal. Se reclutaron 200 mujeres desde agosto 2020 hasta febrero 2021, con no más de 48/72 h de un resultado previo positivo de hisopado nasofaríngeo para SARS-CoV-2 por retrotranscriptasa reversa-reacción en cadena de la polimerasa (en inglés rt-RT-PCR) y que aceptaron ingresar al estudio. Se llenó un cuestionario clínico epidemiológico. Las tomas de muestras se realizaron en servicios de salud del Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social (MSP y BS), domicilios y albergues de los distintos departamentos de Paraguay. Cada paciente fue sometida a un hisopado con hisopos de dacron o *citobrush* endocervical para la detección de SARS-CoV-2 por rt RT-PCR. **Resultados:** Las mujeres estudiadas tenían una edad media de 46,5 años (IC 95% 31,5-62,5). Refirieron

Abstract

Background: COVID-19 is an eminently respiratory transmissible infection of respiratory initiation, the existence of other sources of contagion is discussed. The ACE2 viral receptor has also been detected in the uterus and vagina; Hence, the involvement of the SARS-CoV-2 virus on the genitourinary system and its possible repercussions on pregnancy has been raised. **Aim:** To determine the presence of SARS-CoV-2 in endocervical samples of women with COVID-19 in the departments of Paraguay. **Methods:** Designed as a prospective observational of transverse cohort. Two hundred women were recruited from August 2020 to February 2021, with no more than 48/72 hours of a previous positive nasopharyngeal swab result for SARS-CoV-2 by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (rt-RT-PCR) and who agreed to participate in the study. A clinical epidemiological questionnaire was completed. The samples were taken in health services of the MSPYBS (Public Ministry of Health and Social Welfare), homes and shelters in the different departments of Paraguay. Each patient underwent a swab (dacron swabs) or endocervical cytobrush for the detection of SARS-CoV-2 by rt-RT-PCR. **Results:** Women recruited had a mean age of 46.5 years (95% CI 31,562.5). They reported contagion with SARS-CoV-2: 75.5% in

Correspondencia a:

Ana María Soilan Ayala
anisolan@yahoo.com.ar

contagio comunitario con SARS-CoV-2 en 75,5%, 13,5% en el hogar, 8,5% en el lugar de trabajo y 1,5% en el extranjero. Las manifestaciones clínicas fueron: 30%, síndrome gripal, fiebre 22,5%, tos 20%, anosmia 15,5%, trastornos digestivos 15,5%, y otros se presentaron con menor frecuencia. Las muestras de hisopados o *citobrush* endocervical sometidas a rt-RT-PCR para la detección de SARS Cov-2, resultaron negativas en las 200 mujeres de estudio. *Discusión:* Cabe destacar que las muestras vaginales fueron tomadas dentro de las 24-72 h de haber obtenido un resultado positivo para SARS-CoV-2 en el hisopado nasofaríngeo y que 62,5% de las mujeres se encontraban internadas en módulos respiratorios. Se discute la razón de la negatividad de los exámenes y su trascendencia. *Conclusión:* No se detectó infección con SARS-CoV-2 en la región endocervical de 200 mujeres con manifestaciones clínicas de COVID 19 y evaluadas dentro de las 48/72 h de un resultado positivo nasofaríngeo para SARS Cov-2. Los resultados en la población de estudio concuerdan con otros estudios reportados en la literatura científica.

Palabras clave: COVID-19; infección; SARS-CoV-2; síntomas; mucosa vaginal; endocervix.

the community, 13.5% at home, 8.5% in the place of work and 1.5% abroad. The clinical manifestations were: 30% flu syndrome, 22.5% fever, 20% cough, 15.5% anosmia, 15.5% digestive disorders, among other symptoms. The swabs or endocervical cytobrush samples subjected to rt-RT-PCR for the detection of SARS-CoV-2 were negative in the 200 study women. *Discussion:* It should be noted that the vaginal samples were taken within 24-72 hours after obtaining a positive result for SARS-CoV-2 in the nasopharyngeal swab and that 62.5% of the women were hospitalized in respiratory modules. The reason for the negativity of the exams and their significance are discussed. *Conclusion:* No SARS Cov-2 infection was detected in the endocervical region of 200 women with clinical manifestations of COVID 19 and evaluated within 48/72 hours of a positive nasopharyngeal result for SARS Cov-2. The results in the study population agree with the findings of other studies reported in the literature.

Keywords: COVID-19; infection; SARS-Cov-2; symptoms; vaginal mucosa; endocervix.

Introducción

El síndrome respiratorio agudo severo por coronavirus 2 (SARS-CoV-2) ha infectado a más de dos millones de personas causando miles de muertes a nivel mundial. El SARS-CoV-2 ingresa a las células por medio de un receptor viral, la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2), que se expresa en una amplia gama de tejidos humanos¹. Para bloquear eficazmente su transmisión, se deben determinar todas posibles rutas de transmisión. En varios estudios, las muestras de líquido de lavado broncoalveolar (93%), esputo (72%), frotis faríngeos (32%), heces (29%) y sangre (1%) dieron positivo para la detección de ARN viral de SARS-CoV-2². Según algunos autores, estas diferentes cargas virales podrían atribuirse al tipo de muestra o el momento, el estadio de la enfermedad y/o el lugar de donde se tomó la muestra, factores todos que juegan un papel importante en los resultados de rt-RT-PCR (de ahora en adelante RPC-TR-tr, traducción al español de reacción de polimerasa en cadena con transcripción reversa en tiempo real)^{2,3}. Cómo afecta el SARS-CoV-2 en el sistema genitourinario en general, y en particular en el embarazo, sigue siendo controvertido. El receptor ACE2 fue detectado en el útero, específicamente en la fase secretora de las células epiteliales, así como en la vagina⁴.

Mediante la técnica de RPC-TR-tr se ha observado que los infectados presentan en su mayoría una alta carga viral (10^4 to 10^8 copias de genoma/mL por muestra nasofaríngea o de saliva). En pacientes que tienen un curso leve de infección, el pico de la carga viral en muestras nasales y orofaríngeas ocurre durante los primeros 5-6 días tras el inicio de síntomas y prácticamente desaparece al día 10. Si bien en algunos pacientes se detecta virus más allá del día 10, la carga viral es del orden de 100-1.000 veces menor, lo cual sugeriría una baja capacidad de transmisión en estos días⁵. Esto parece indicar, que, en personas con síntomas leves, más allá de la primera semana tras el inicio de

síntomas, la probabilidad de transmitir la infección a otros sería muy baja, incluso cuando el virus aún es detectable mediante reacción de polimerasa en cadena (RPC).

El propósito del presente estudio es determinar la presencia de SARS-CoV-2 en muestras endocervicales de mujeres con COVID-19, para mejor protocolizar la vía de parto en pacientes gestantes infectadas, así como recomendar el comportamiento sexual de las pacientes en pandemia o el tratamiento si así lo requiriera.

Materiales y Métodos

Se reclutaron 200 mujeres entre agosto de 2020 y febrero de 2021, que reunieron los siguientes criterios de inclusión: sin sangrado vaginal, diagnóstico previo de SARS-CoV 2 positivo RPC-TR-tr, en un tiempo no mayor de 48/72 h del resultado del hisopado nasofaríngeo (dentro de los 10 días de inicio de síntomas) y que firmaron el consentimiento informado para ingresar al estudio. El diagnóstico de COVID-19 se basó en las directrices de la Organización Mundial de la Salud (OMS)⁶. Un caso confirmado de infección con SARS Cov-2 se definió como un resultado positivo en el ensayo de RPC-TR-tr de muestras de hisopado nasofaríngeo realizado por el sector público o privado en Paraguay.

Diagnóstico de SARS-CoV-2 en muestras de hisopado endocervical por rt-RT PCR duplex

Siendo el estándar de diagnóstico para SARS-CoV-2 la RPC-TR-tr, la OMS publicó una actualización de los protocolos aprobados para realizar pruebas de laboratorio en enero 2020⁷ y en febrero del mismo año la Organización Panamericana de Salud (OPS) adoptó el protocolo desarrollado por el Hospital Charité, Berlín, Alemania, como el método

de diagnóstico utilizado para la detección de SARS-CoV-2⁸. Esta metodología implica tres RPC, limitando la capacidad de procesamiento y retrasando los resultados. Con el fin de reducir estas limitaciones, en el SENACSA se implementó una RPC duplex para la detección del gen E y RNasa P. Las muestras de endocervix se tomaron con un hisopo de dacron o cepillado (*citobrush*).

Extracción de ARN. La extracción de ARN de las muestras de hisopado endocervical transportadas en 2 ml de medio de transporte viral fueron realizadas dentro de las 24 h de haber recibido el material en el SENACSA. Se emplearon extracciones manuales con el kit de PRO-MEGA de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El volumen de elución fue de 50 µL.

Partidores y sondas. Las amplificaciones por RPC para el gen viral E (tanto en monoplex como duplex), se realizaron siguiendo las recomendaciones de concentraciones de oligonucleótidos (cebadores y sondas), publicadas en el protocolo Charité, Berlín^{8,9}. El gen RNasa P fue empleado como control interno de reacción y se amplificó con los

oligonucleótidos y sonda publicados por los CDC de Atlanta, E.U.A., para detección de SARS-Cov-2¹⁰. La RNasa P se amplificó en la RPC duplex con una concentración de oligos de 0,15 µM y sonda a 0,2 µM.

Hemos aplicado el duplex desde marzo de 2020 hasta diciembre 2020 en 70.000 muestras de aspirados nasofaríngeos de individuos con sospecha de infección con SARS-CoV-2, en el Servicio Nacional de Saneamiento Animal (SENACSA). La técnica fue validada inicialmente con *kits* comerciales y luego de un control de calidad externo realizado por el Laboratorio Central de Salud Pública del Ministerio de Salud del Paraguay. La RPC duplex no afecta la sensibilidad y especificidad informadas por el protocolo Charité, Berlín.

Este estudio fue presentado y aprobado por el Comité de Ética de Investigación del Laboratorio Central de Salud Pública, perteneciente a la Dirección de Investigación y Estudios Estratégicos del Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social de Paraguay.

Resultados

Se tomaron muestras a 200 mujeres con COVID-19 confirmado por RPC positivo en hisopado nasofaríngeo, infección que fuera adquirida mayoritariamente en la comunidad (75,5%), en el hogar (13,5%) o en su lugar de trabajo (8,5%) (Tabla 1). El grupo incluyó pacientes embarazadas (8%) y no embarazadas (92%) y su edad media fue de 46,5 años (16-91; modo 60).

Algunas mujeres fueron internadas en los hospitales en módulos respiratorios (62,5%), mientras que otras permanecieron en sus domicilios (26,5%) de acuerdo a la intensidad de sus cuadros clínicos. El 11% restante fue internada en albergues sanitarios.

Los síntomas referidos en la Tabla 2 no difieren de lo ampliamente descrito.

Observando el protocolo de estudio descrito, no se detectó SARS-CoV-2 en las muestras endocervicales.

Discusión

La búsqueda de virus epidémicos en fluido vaginal ha sido parte de las investigaciones realizadas por varios grupos; entre ellos se encuentra el hallazgo del virus del Ébola en el fluido vaginal de una paciente que se recuperaba de la infección por el virus del Ébola 33 días después del inicio de la enfermedad¹¹. Sin embargo, hasta la fecha no hay un estudio decidor que demuestre que el SARS-CoV-2 invade el tracto reproductivo femenino. La mayor parte de los estudios realizados reportan la no detección del SARS-CoV-2 en los fluidos vaginales, inclusive en seguimientos de hasta 40 días después del

Tabla 1. Pacientes con COVID-19 incluidas en la búsqueda de SARS-CoV-2 en cuello uterino. Lugar de adquisición de la infección (n: 200)

Contagio	Frecuencia	%
Comunitario	153	75,50%
Hogar	27	13,50%
Trabajo	17	8,50%
Extranjero	3	1,50%
Total	200	100,00%

Tabla 2. Pacientes con COVID-19 incluidas en la búsqueda de SARS-CoV-2 en cuello uterino. Síntomas (n: 200)

Síntomas	n	%
Síndrome gripal ¹	61	30,5
Fiebre	45	22,5
Tos	40	20
Trastornos digestivos ²	31	15,5
Anosmia	31	15,5
Cefalea	20	10
Dificultad respiratoria	17	8,5
Cansancio	14	7
Asintomáticas	6	3

¹Síndrome gripal: rinorrea, mialgia, faringodinia, pérdida del gusto. ²Trastornos digestivos: vómitos y diarrea.

inicio de la enfermedad en mujeres que aún necesitaban atención en la UCI por el COVID-19 en curso¹².

En un estudio de 35 muestras de secreciones vaginales de mujeres con infección aguda por SARS-CoV-2, detectaron por RPC-TR-rt a dos mujeres (5,7%), una premenopáusica y la otra posmenopáusica, el ARN del SARS-CoV-2 en secreción vaginal¹³. Los autores sugieren que la no detección en otros estudios se debería al pequeño número de casos en cada grupo y que la presencia vaginal de SARS-CoV-2 tiene una incidencia relativamente baja, por lo que se requieren más estudios para confirmar sus hallazgos.

En nuestro estudio hemos reclutado 200 mujeres infectadas con SARS-CoV-2, sintomáticas leves/moderadas y con toma de muestra vaginal dentro de las 48 a 72 h de la RPC-TR-rt positiva nasofaríngea, y no hemos detectado infección en el endocervix como tampoco en secreción vaginal si consideramos que en la toma de muestra se contaminaría con el fluido. Tal vez, la discrepancia entre los que detectan y los que no detectan pueda explicarse en que algunos casos coincidan con una elevada carga viral detectada en nasofaringe y que se correlacione con carga viral detectable en vagina; pero los autores no hablan del valor del umbral (Ct) detectado en las muestras nasofaríngeas y vaginales cuando detectan SARS-CoV-2 en secreción vaginal, lo que hace muy difícil reproducir este hallazgo. En una publicación de un caso de transmisión transplacentaria, donde sí muestran los gráficos de las reacciones de RPC-TR-rt de los diferentes fluidos analizados, tanto del recién nacido como de la madre, se puede observar que la carga viral fue mucho mayor en tejido placentario con Ct12 y en el hisopado nasofaríngeo de la madre se observa un valor de aproximadamente Ct 26. Además, la mujer embarazada e infectada resultó ser un caso grave de COVID-19¹⁴.

Nuestro resultado es similar al de varios grupos, donde todas las muestras del tracto genital inferior fueron negativas para el SARS-CoV-2¹⁵. Los autores relatan en este artículo que el resultado negativo podría explicarse

por la expresión negativa de la ACE2, el receptor del SARS-CoV-2, en la vagina y el cuello uterino, referido por otros autores¹⁶. Esto último se contradice con la publicación donde refieren que SARS-CoV-2 puede infectar el ovario, útero, vagina y placenta a través de la expresión de ACE2². Sin embargo, también deben reconocerse otros factores que influyen en la heterogeneidad de estos artículos, incluidas las diferentes etnias, las definiciones ligeramente diferentes para los casos agudos y las enormes diferencias en el momento de la prueba de los casos en recuperación. En la hipótesis de que el virus se transmite al fluido vaginal, todos estos factores podrían afectar en gran medida, tanto a la carga viral como a la degradación viral en el fluido vaginal y, por tanto, las posibilidades de detección. En consecuencia, los datos disponibles deben interpretarse con cautela.

La amplificación en RPC dúplex del gen *E_Sarbeco* publicado en el protocolo Charité, Berlín, en conjunto con el gen RNAsa P, es una herramienta de gran utilidad para el cribado de SARS-CoV-2 en muestras clínicas porque optimiza el consumo de reactivos, el tiempo en la obtención de resultados, mejora la capacidad instalada necesaria para el diagnóstico, y a su vez, disminuye el costo de la evaluación. Además, el gen RNAsa P es un control interno que ayuda a detectar resultados falsamente negativos que puedan ocurrir por la presencia de inhibidores o por una pobre eficiencia de amplificación del gen E.

Conclusión

La no detección del ARN viral del SARS Cov-2 en endocervix y fluido vaginal obtenido como resultado en la población de estudio, concuerda con estudios reportados en la literatura médica. Esto implica que el tracto genital inferior femenino podría no ser una vía de transmisión para SARS Cov- 2, lo cual serviría en la selección del método de parto para mujeres embarazadas infectadas con COVID-19.

Referencias bibliográficas

- 1.- Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterization and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 2020; 395: 565-74. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8).
- 2.- Bwire G M, Majigo M V, Njiro B J, Mawazo A. Detection profile of SARS-CoV-2 using RT-PCR in different types of clinical specimens: a systematic review and meta- analysis. *J Med Virol.* 2021; 93: 719-25. doi: 10.1002/jmv.26349.
- 3.- Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, et al. Research Letter. Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. *JAMA.* Published March 11, 2020. doi: 10.1001/jama.2020.3786.
- 4.- Jing Y, Run-Qian L, Hao-Ran W, Hao-Ran C, Ya-Bin L, Yang G, et al. Potential influence of COVID-19/ACE2 on the female reproductive system. *Mol Hum Reprod*, 2020; 26 (6): 367-73. doi: 10.1093/molehr/gaaa030.
- 5.- WHO. Clinical management of severe acute respiratory infection (SARI) when COVID-19 disease is suspected Interim guidance. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331446>.
- 6.- Molecular assays to diagnose COVID-19: Summary table of available protocols WHO 2020, Jan 24. <https://www.who.int/who-documents-detail/molecular-assays-to-diagnose-covid-19-summary-table-of-available-protocols>.
- 7.- Laboratory Guidelines for Detection and Diagnosis of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Infection PAHO 2020. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51895>.
- 8.- Corman V M, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu D K, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.*

- 2020; 25: 23-30. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
- 9.- CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) real-time RT-PCR diagnostic panel. [Online] US Centers for Disease Control and Prevention. [Accessed 3 Mar 2020]. <https://www.fda.gov/media/134922/download>.
- 10.- Rodríguez L L, De Roo A, Guimard Y, Trappier S G, Sánchez A, Bressler D, et al. Persistence and genetic stability of Ebola virus during the outbreak in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J Infect Dis* 1999; 179 (Suppl 1): S170-6. doi: 10.1086/514291.
- 11.- Qiu L, Liu X, Xiao M, Xie J, Cao W, Liu Z, Morse A, et al. SARS-CoV-2 is not detectable in the vaginal fluid of women with severe COVID-19 infection. *Clin Infect Dis*. 2020; 71: 813-7. doi: 10.1093/cid/ciaa375.
- 12.- Schwartz A, Yogev Y, Zilberman A, Alpern S, Many A, Yousoyich R, et al. Detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus2 (SARS-CoV-2) in vaginal swabs of women with acute SARS-CoV-2 infection: a prospective study. *BJOG* 2021; 128: 97-100. doi: 10.1111/1471-0528.16556.
- 13.- Vivanti A J, Vauloup-Fellous C, Prevot S, Zupan V, Suffee C, Do Cao J, et al. Transplacental transmission of SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun*. 2020; 11: 1-7. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17436-6>.
- 14.- Cui P, Chen Z, Wang T, Dai J, Zhang J, Ding T, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 detection in the female lower genital tract. *Am J Obstet Gynecol*. 2020; 131-4. doi: 10.1016/j.ajog.2020.04.038
- 15.- Uhlén M, Fagerberg L, Hallström B M, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 2015; 347: 1260419. doi: 10.1126/science.1260419.

EL BICHO*

Mi mamá me llevó al CESFAM a sacar una muela.. tenía tanto miedo... pero me dolía mucho... Entramos por la puerta lateral y nos sentamos en la sala de espera del sector Naranja... Ahí vi al Bicho ... tratando de meterse en las narices y los ojos ... De repente saltó hasta mi bolsillo y entonces vino esa doctora bacana con traje de astronauta y manos azules y lo mató con unas aguas especiales y me dijo que me lavara las manos. Después me sacó la muela mala. Soy el Bayron; de Alto Hospicio. Cuando grande voy a ser dentista.

Luna de Hospicio

*Mención Honrosa en el Concurso de Cuentos: "Yo, el COVID y la Seguridad del Paciente en 100 palabras". Fundación para la Seguridad del Paciente, Chillán, Ñuble, Chile. 2021. Reproducido con autorización de los Editores.