

Protocolo de toma de muestras de saliva para detectar SARS-CoV-2 por técnica de PCR.

5 DE NOVIEMBRE DE 2020

Protocolo de toma de muestras de saliva para detectar SARS-CoV-2 por técnica de PCR.

TABLA DE CONTENIDOS

I. REVISIÓN DE LA EVIDENCIA	5
II. ANTECEDENTES EN CHILE	7
III. RECOLECCIÓN DE MUESTRA DE SALIVA (RT-qPCR COVID-19)	8
IV. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	9
V. FUENTES CONSULTADAS	10

COLABORADORES:

Dra. María Teresa Valenzuela, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes.

Dr. Pablo Vial, Instituto de Ciencias Innovación en Medicina, Clínica Alemana, Universidad del Desarrollo.

Dra. Marcela Ferrés, Laboratorio Infectología y Virología Molecular, PUC.

Dra. Cecilia Perret, Laboratorio Infectología y Virología Molecular, PUC.

Dra. Katia Abarca, Laboratorio Infectología y Virología Molecular, PUC.

Dra. Sandra Solari, Laboratorios Clínicos Red de Salud UC Christus, PUC.

TM. Carlos Palma, Laboratorio Infectología y Virología Molecular, PUC.

TM. Ana María Contreras, Laboratorio Infectología y Virología Molecular, PUC.

TM. María Francisca Damm, Instituto de Ciencias Innovación en Medicina, Clínica Alemana, Universidad del Desarrollo.

Dra. Marcela Henríquez, Laboratorio E.L.S.A, Integramédica, BUPA.

Dra. Cecilia Vial, Instituto de Ciencias Innovación en Medicina, Clínica Alemana, Universidad del Desarrollo.

Dra. Anita Plaza, Laboratorio de Ecología de Enfermedades, Universidad Austral.

Dr. Claudio Verdugo, Laboratorio de Ecología de Enfermedades, Universidad Austral.

I. REVISIÓN DE LA EVIDENCIA

Durante esta pandemia, en que los países se enfrentan a grandes incertidumbres por evidencia científica insuficiente (1), la introducción de nuevas tecnologías en los mercados nacionales, como las pruebas diagnósticas para detección del virus SARS-CoV-2, plantea retos a las autoridades reguladoras a nivel mundial para disponer de un sistema de controles regulatorios y un manejo prudente del riesgo, que sea capaz de proteger la salud pública.

Para asegurar el acceso oportuno a dispositivos médicos, incluidos los dispositivos médicos de diagnóstico in vitro, esenciales durante la pandemia de COVID-19, los países han flexibilizado sus normativas y procesos regulatorios. Así, por ejemplo, la Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos, está otorgando autorización para uso de emergencia para pruebas diagnósticas in vitro para la detección y/o diagnóstico del brote de COVID-19 (2), debiendo equilibrar la necesidad urgente de acceso a estas pruebas y un nivel de supervisión que ayude a garantizar el desempeño adecuado de estas, con base a la información disponible y proporcionada por los fabricantes. Esta situación sirve para ilustrar la utilización práctica del Principio de Precaución, usualmente aplicado cuando hay un alto grado de incertidumbre científica y hay necesidad de tomar acciones aun cuando no hay evidencia absoluta.

La autorización del uso de emergencia es válida solo mientras dure la emergencia declarada y para un uso previsto acotado, por ejemplo, solo para uso en investigación, y además debe hacerse un seguimiento diario por si cambian las circunstancias.

Es importante tener en cuenta que el protocolo de la Universidad de Yale de acuerdo a lo que informa en el sitio oficial: SalivaDirect™ no ha sido aprobado por la FDA en términos regulatorios establecidos habitualmente, sino que cuenta con una autorización para uso de emergencia (provisoria) por laboratorios autorizados, en el contexto de la pandemia. La prueba ha sido autorizada solo para la detección de ácido nucleico del SARS-CoV-2, no para otros virus o patógenos. Esta prueba solo está autorizada mientras dure la declaración de que existen circunstancias que justifiquen la autorización del uso de emergencia de pruebas de diagnóstico in vitro para la detección y/o diagnóstico de COVID-19, a menos que la autorización sea cancelada o revocada previamente (3, 4).

Los laboratorios de alta complejidad deben solicitar autorización a Yale para convertirse en un laboratorio designado para la utilización de este protocolo, ya que requieren el cumplimiento de todos los requisitos y dispositivos médicos que ellos recomiendan, además de llevar a cabo el protocolo tal como se describe.

Por otra parte, es importante destacar que, en el contexto pandémico, la fase posterior a la autorización para uso de emergencia adquiere una dimensión aún más relevante para proteger a los usuarios y a los profesionales de la salud. Por ello, las autoridades reguladoras incluyen un plan de vigilancia posterior a la autorización que permita prevenir y detectar los eventos e incidentes relacionados con estos productos y responder a ellos de manera adecuada y oportuna.

En este sentido, la saliva se ha propuesto como una muestra alternativa, especialmente porque se puede tomar fácilmente sin procedimientos invasivos o incómodos, y minimizando la exposición potencial del trabajador de salud. Sin embargo, hay poca evidencia científica que respalde el uso de muestras de saliva para la detección de COVID-19 y a la fecha la OMS/OPS sigue sin recomendar el uso de este tipo de muestra (5, 6).

De acuerdo a la revisión de la literatura, para evaluar la capacidad del test para detectar SARS-CoV-2 en muestra de saliva, los laboratorios deben realizar la validación considerando los siguientes aspectos estadísticos y asociados al dispositivo médico de diagnóstico in vitro:

- 1.- Un procedimiento debe ser validado cuando un sistema analítico se aplica a una nueva matriz no incluida en la validación del fabricante. La validación incluye la determinación de los parámetros metrológicos que apliquen de acuerdo a las necesidades de la validación, estas pueden ser:
 - a) Sensibilidad
 - b) Especificidad
 - c) Valor Predictivo Positivo (VPP)
 - d) Valor Predictivo Negativo (VPN)
 - e) Precisión
 - f) Límite de detección
- 2.- Según lo establecido por el “User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance” del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), se recomienda un tamaño de muestra de al menos 50 muestras positivas detectadas conjuntamente por el método de referencia y el test candidato. Por otro lado, se recomienda al menos 50 muestras negativas obtenidas por el método de referencia (7).
- 3.- Seleccionar para el estudio un kit comercial que cuente con antecedentes de uso autorizado por una autoridad reguladora de alta vigilancia sanitaria en dispositivos médicos como son algunas de las agencias que forman parte del Foro Internacional de Reguladores de Dispositivos Médicos (IMDRF, por sus siglas en inglés), como la FDA de Estados Unidos, TGA de Australia, HSA de Singapur, ANVISA de Brasil, HEALTH CANADA de Canadá, PMDA de Japón y MFDS de Corea del Sur, y así realizar un mayor análisis regulatorio y que su protocolo cuente con la sensibilidad y especificidad reportada por el fabricante, al igual que el tamaño de muestra usado para estimar aquellos índices donde se detalla el total de muestras positivas y negativas identificados por el método de referencia y kit comercial, con el objetivo de poder comparar con la obtenida en el estudio de validación.

La literatura internacional reciente sugiere que la carga viral de SARS-CoV-2 en saliva es mayor que la carga viral detectada en hisopado nasofaríngeo (8, 9).

Diversas instituciones a nivel internacional, se encuentran trabajando para el desarrollo de diferentes kits de diagnóstico contra el SARS-CoV-2, y entre estas, destacan por su trabajo y metodología utilizada los protocolos desarrollados por la Universidad de Yale y la Universidad de Utah. Estos protocolos, consisten principalmente en la recolección de saliva y extracción automatizada de ácidos nucleicos de esta, desde los pacientes enfermos o sospechosos de COVID-19 que son posteriormente analizadas por PCR en tiempo real. Estos estudios comparan sus resultados con el gold estándar, siendo los resultados de sus comparaciones bastante cercanos entre sí. Ambos estudios presentan tamaños muestrales adecuados para las conclusiones obtenidas (8, 10), por lo que podrían ser un modelo adecuado a seguir.

II. ANTECEDENTES EN CHILE

En Chile, se han elaborado una serie de estudios preliminares, descritos por los autores como “estudios piloto”, por laboratorios de diferentes universidades, como son: Universidad Austral de Chile (UACH), Universidad de Atacama, Universidad del Desarrollo (UDD) y Pontificia Universidad Católica de Chile (PUC); y el Laboratorio E.L.S.A, Integramédica Bupa, para determinar la factibilidad de utilizar muestra de saliva en la detección de SARS-CoV-2. Si bien la muestra de saliva no viene a reemplazar el Hisopado Nasofaríngeo (HNF), de acuerdo a los resultados obtenidos, se considera una muestra alternativa y con importantes ventajas, para ser utilizada en las siguientes circunstancias:

- Búsqueda Activa de Casos en la Comunidad (BACC), en atención primaria, en quienes tienen contraindicación de muestra por HNF.
- BACC en establecimientos educacionales, recintos deportivos, áreas laborales, entre otros.
- Vigilancia epidemiológica.

Análisis de los estudios realizados en Chile:

Se han analizado los estudios de Integramédica Bupa, PUC, UACH y UDD. Se observa una cantidad de muestras adecuada para los análisis estadísticos propuestos por Integramédica Bupa, con una sensibilidad (72,7%) confiable dado la cantidad total de muestras positivas detectadas por HNF (n=88) y conjuntamente detectadas positivas por saliva (n=64), sin embargo, el porcentaje de sensibilidad es demasiado bajo como para considerarlo como un estudio de referencia (ver Tabla 1). Por otro lado, los estudios de la PUC, UACH y UDD presentan un porcentaje de sensibilidad bastante alto en sus últimas fases (91%, 90% y 92%, respectivamente) pero considerando pocas muestras positivas detectadas por HNF (n=11, n=20 y n=13, respectivamente), lo cual tampoco es recomendable como estudio de referencia.

De acuerdo a lo anterior, para el caso de los estudios de PUC, UACH y UDD, falta considerar más muestras positivas conjuntamente detectados por HNF y saliva, con la metodología aplicada, para considerar aquellos estudios como referencia para un protocolo. Con respecto al estudio realizado por Bupa, no existe mayor inconveniente con la cantidad de muestras analizadas, sin embargo, el porcentaje de sensibilidad observada es bastante inferior a lo reportado por estudios internacionales (protocolos de Universidad de Yale y Universidad de Utah), como para que se considere como referencia de procedimiento para un protocolo.

Respecto al estudio de la Universidad de Atacama, el número de muestras analizadas y reportadas son escasas (n=8) como para ser considerado como una referencia aplicable.

Tabla 1: Resultados obtenidos de estudios pilotos utilizando test RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2 mediante saliva.

Laboratorio	Kit utilizado	Nº muestras positivas (HNF)	Nº muestras negativas (HNF)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
Bupa	SARS-CoV-2/SARS-CoV Multiplex REAL-TIME PCR Detection Kit	88	708	72,7% (64/88)	97,5% (690/708)
Pontificia Universidad Católica de Chile	LightMix®SARS CoV 2 plus EAV Control	44	675	68,2% (30/44)	100% (675/675)
Universidad Austral de Chile	TaqMan® Fast Virus 1-step Master Mix	20	22	90% (18/20)	100% (22/22)
Universidad de Atacama	kit TaqMan™2019-nCoV Assay	2	6	100% (2/2)	100% (6/6)
Universidad del Desarrollo	Kit TaqMan 2019-nCoV Assay Kit v1	48	262	72,9% (35/48)	100% (262/262)

Elaborado por: Agencia Nacional de Dispositivos Médicos, Innovación y Desarrollo (ANDID), Instituto de Salud Pública de Chile.

Conclusión:

- 1.- Los “estudios pilotos” deben continuar reportando sus resultados al ISP, con el objetivo de evaluar la factibilidad de ser considerados como protocolos de referencia.
- 2.- En consideración de los antecedentes expuestos, el ISP ha determinado tomar como referencia para la elaboración del protocolo a aplicar en Chile, los protocolos de toma de muestras de saliva para detectar SARS-CoV-2 por técnica de PCR en tiempo real, realizados por la Universidad de Yale y Universidad de Utah, dado que cuentan con la cantidad de muestras positivas mínima requeridas por la FDA y el CLSI y, además, presentan un porcentaje de sensibilidad del 94,1% y 93,8%, respectivamente.

III. RECOLECCIÓN DE MUESTRA DE SALIVA (RT-QPCR COVID-19)

Instrucciones para el paciente:

- 1.- 30 minutos antes de la toma de muestra:
 - a) No ingiera alimentos ni líquidos, excepto agua.
 - b) No debe masticar chicle, fumar o utilizar algún tipo de spray bucal antes de la toma de muestra.
 - c) No debe lavarse los dientes, ni utilizar enjuagues bucales o hilo dental antes de la toma de muestra.
 - d) Remover productos cosméticos, bálsamos o cremas labiales, tampoco toque los labios con sus manos antes de la toma de muestra.

Toma de muestra:

1. Lavarse las manos, según Protocolo MINSAL.
2. Retírese la mascarilla y empiece a acumular saliva en el interior de su boca. Como ayuda, masajee sus mejillas de forma suave y circular, para estimular la producción de saliva.
3. Sujete el tubo en posición vertical y abra la tapa con su otra mano. Se requiere tubos libre de nucleasas, graduados y con capacidad de 5 ml hacia arriba.
4. Acerque el tubo a su boca y cuidadosamente deposite dentro del tubo la saliva acumulada en su boca, evitando la formación de burbujas y derrames fuera del frasco.
5. Llene el tubo con saliva hasta la línea de llenado. Mínimo 2 ml de muestra de saliva.
6. Al completar la cantidad necesaria de muestra, tape el tubo enroscando la tapa firmemente para evitar derrames.
7. Lávese las manos nuevamente.
8. Colóquese la mascarilla.
9. Entregue la muestra al profesional de salud correspondiente.

Instrucciones para quien supervisa:

1. Rotule el tubo tomando las precauciones de identidad de la persona a la cual se le toma la muestra.
2. Coloque el tubo al interior de la bolsa de plástico hermética y ciérrela.

Conservación y transporte de las muestras:

1. El uso del medio de transporte es optativo. En caso de utilizar medio de transporte este debe contener estabilizador de RNA e inhibidor de RNAsas, con una dilución máxima de 1:1.
2. Las muestras recolectadas pueden ser almacenadas a temperatura de 2°C-8°C, hasta su envío al laboratorio dentro de un periodo máximo de 8 horas.
3. El transporte de las muestras debe realizarse de acuerdo al sistema de triple embalaje según “Normativa Técnica para el transporte de Sustancias Infecciosas a Nivel Nacional”, utilizando unidades refrigerantes para mantención de la temperatura.

IV. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

La detección del SARS-CoV-2 en muestras de saliva va a depender de varios factores como: la calidad de recolección de la muestra, el oportuno envío de la muestra al laboratorio para su diagnóstico, almacenamiento, identificación y adecuado procesamiento.

1. Por su alta consistencia y viscosidad, previo a la extracción se recomienda agitar la muestra de saliva, en un vortex de forma vigorosa durante 5 – 10 segundos.
2. En un gabinete de seguridad tipo II, agregue el volumen de muestra respectivo en un tubo cónico libre de nucleasas y realice el proceso de extracción automatizado de RNA, de acuerdo a las especificaciones técnicas dadas por el fabricante.
3. Una vez purificado el RNA de la muestra, se debe continuar con el procedimiento indicado por fabricante, según el kit de detección de SARS-CoV-2 que utilice en su laboratorio.

El laboratorio antes del procesamiento de muestra a escala deberá validar el protocolo de detección de SARS-CoV-2, en el caso de no haberlo realizado con anterioridad.

El laboratorio registrado por el ISP debe realizar un proceso de validación abreviado con el mismo procedimiento de PCR implementado y en uso en su laboratorio. Esta validación debe realizarse con al menos 50 muestras positivas detectadas simultáneamente por ambos métodos, el método de referencia (HNF) y el test candidato (7). Por otro lado, se recomienda al menos 50 muestras negativas obtenidas por el método de referencia (HNF) (7).

Esta validación incluye la determinación de los siguientes parámetros:

- a) Sensibilidad
- b) Especificidad
- c) Valor Predictivo Positivo (VPP)
- d) Valor Predictivo Negativo (VPN)

V. FUENTES CONSULTADAS

- (1) Terje Aven & Frederic Bouder (2020): The COVID-19 pandemic: how can risk science help?. *Journal of Risk Research*, DOI: 10.1080/13669877.2020.1756383. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/13669877.2020.1756383>
- (2) In Vitro Diagnostics EUAs. Disponible en: <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/vitro-diagnostics-euas> [Acceso el 28 de octubre del 2020].
- (3) SalivaDirect™. Disponible en: <https://publichealth.yale.edu/salivadirect/> [Acceso el 28 de octubre del 2020].
- (4) Accelerated Emergency Use Authorization (EUA) Summary SARS-CoV-2 RT-PCR Assay. Disponible en: https://publichealth.yale.edu/salivadirect/3-EUA202097.S003_EUA%20summary_FINAL_397684_5_v1.pdf [Acceso el 28 de octubre del 2020].
- (5) Organización Panamericana de la Salud. Directrices de laboratorio para la detección y el diagnóstico de la infección por el virus responsable de la COVID-19. 8 de julio del 2020. Disponible en: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/52471>
- (6) Organización Mundial de la Salud. Diagnostic testing for SARS-CoV-2. 11 de septiembre de 2020. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/diagnostic-testing-for-sars-cov-2>. [Acceso el 15 de octubre del 2020].
- (7) EPI2-A2. User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline. *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Vol. 28, No. 3.
- (8) Wyllie AL, Fournier J, Casanovas-Massana A, Campbell M, Tokuyama M, Vijayakumar P et al. (2020) Saliva is more sensitive for SARS-CoV-2 detection in COVID-19 patients than nasopharyngeal swabs. *medRxiv*, Apr 22, doi.org/10.1101/2020.04.16.20067835.
- (9) Williams E, Bond K, Zhang B, Putland M, Williamson DA (2020) Saliva as a noninvasive specimen for detection of SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol*, Apr 21, doi: 10.1128/JCM.00776-20.
- (10) Hanson KE, Barker AP, Hillyard DR, Gilmore N, Barrett JW, Orlandi RR, and Shakir SM. Self-Collected Anterior Nasal and Saliva Specimens versus Healthcare Worker-Collected Nasopharyngeal Swabs for the Molecular Detection of SARS-CoV-2. August 2020, *J. Clin. Microbiol.* doi:10.1128/JCM.01824-20
- (11) Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos. Disponible en: https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-revokes-emergency-use-authorization-chembio-antibody-test?utm_campaign=2020-0616%20FDA%20Revokes%20Emergency%20Use%20Authorization%20%28EUA%29%20for%20Chembio%20Antibody%20Test&utm_medium=email&utm_source=Eloqua [Acceso el 03 de octubre del 2020].
- (12) Organización Panamericana de la Salud. Principios relativos a la utilización de decisiones de otras autoridades regulatorias: nota conceptual y recomendaciones. IX Conferencia de la Red Panamericana para la Armonización de la Reglamentación Farmacéutica (Red PARF). San Salvador, del 24 al 26 de octubre del 2018. Washington, D.C.: OPS; 2019. Disponible en: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51550/OPSHSS1903_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

