



Lineamientos generales para detección de SARS-CoV-2 por técnica de PCR en tiempo real desde muestras de saliva.

Instituto de Salud Pública de Chile

15 de enero de 2021

TABLA DE CONTENIDOS

I. REVISIÓN DE LA EVIDENCIA	4
II. ANTECEDENTES EN CHILE.....	5
Análisis de los estudios realizados en Chile.....	5
III. CONSIDERACIONES GENERALES PARA VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 EN MUESTRA DE SALIVA	6
IV. RECOLECCIÓN DE MUESTRA DE SALIVA (RT-qPCR COVID-19).....	7
V. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	8
VI. Anexo 1: Tamaño de muestra para validación	10
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	11



COLABORADORES:

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

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, lo cual es razonable por tiempo que ha transcurrido desde que se identificó el virus SARS-CoV-2 (1), la introducción de nuevas 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 de diagnóstico *in vitro* para 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.

Es en este sentido, el protocolo de la Universidad de Yale, de acuerdo a lo que informa en el sitio oficial: SalivaDirect™, cuenta con una autorización para uso de emergencia (provisoria), para investigación por parte de 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, y 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). Estos protocolos, consisten principalmente en la recolección de saliva desde pacientes enfermos o sospechosos de COVID-19 y que son posteriormente analizadas por PCR en tiempo real, comparando sus resultados con el Gold standard, donde se observa un alto grado de concordancia entre muestras de saliva con HNF.

Si bien 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, hasta la fecha la OMS/OPS sigue sin recomendar el uso de este tipo de muestra (5, 6). No obstante, diversas instituciones a nivel internacional, se encuentran trabajando para el desarrollo de diferentes kits y nuevas metodologías 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 (7,8, 9,10).

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.

II. ANTECEDENTES EN CHILE

En Chile, se han elaborado una serie de estudios pilotos preliminares, por parte de laboratorios de diferentes universidades, como son: Universidad Austral de Chile (UACH), 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 HNF, de acuerdo a los resultados obtenidos se considera una muestra alternativa y con importantes ventajas para ser utilizada en las siguientes circunstancias:

- a) Búsqueda Activa de Casos en la Comunidad (BACC), en atención primaria, establecimientos educacionales, recintos deportivos, áreas laborales, entre otros.
- b) Utilización de la muestra de saliva, en casos de pacientes sintomáticos que tengan contraindicaciones para la toma de muestra por HNF por razones anatómicas o sangramiento.
- c) Vigilancia epidemiológica.
- d) Incrementar la pesquisa de casos en sujetos diagnosticados con Coronavirus.

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, donde se analizaron 88 muestras positivas detectadas por HNF y 64 muestras conjuntamente detectadas positivas (verdaderos positivos) por HNF y saliva, sin embargo, el porcentaje de sensibilidad es demasiado bajo (72,7%), bastante inferior a lo reportado por estudios internacionales.

Por otro lado, los estudios de la PUC, UACH y UDD presentan un porcentaje de sensibilidad bastante alto en sus últimas fases (90%, 90% y 94,1%, respectivamente) pero considerando pocas muestras verdaderas positivas (ver Tabla 1), es importante considerar

una mayor cantidad de muestras verdaderas positivas, con el objetivo de validar la metodología aplicada.

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

Laboratorio	Kit utilizado	Fase	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	III	20	472	90% (18/20)	100% (472/472)
Universidad Austral de Chile	TaqMan® Fast Virus 1-step Master Mix	-	20	22	90% (18/20)	100% (22/22)
Universidad del Desarrollo	Kit TaqMan 2019-nCoV Assay Kit v1	I	31	158	64,5% (20/31)	100% (158/158)
		II	17	225	94,1% (16/17)	99,1% (223/225)

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

El análisis realizado a la fecha de este documento, concluye que si bien existen varios laboratorios o universidades que cumplen con una sensibilidad entorno a lo reportado por estudios internacionales, carecen de muestras verdaderos positivos para sustentar los parámetros considerados por un estudio de validación. Se espera que los laboratorios y universidades continúen reportando sus resultados al ISP, con el objetivo de evaluar la factibilidad de ser considerados como protocolos de referencia para validación de una metodología de detección de SARS-CoV-2 en muestra de saliva.

Por su parte, el ISP está trabajando en la validación analítica de la metodología para determinar la presencia de SARS-CoV-2 desde saliva. Los resultados obtenidos serán informados a la brevedad posible, una vez concluido el estudio.

III. CONSIDERACIONES GENERALES PARA VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA DE DETECCIÓN DE SARS-CoV-2 EN MUESTRA DE SALIVA

De acuerdo a la revisión de la literatura, para evaluar la capacidad del test que detecta SARS-CoV-2 en muestra de saliva, se indica que una validación debe considerar los siguientes aspectos, y otros 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. 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), tales 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.

IV. 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 emiece 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 medio de transporte es optativo, en caso de utilizar se sugiere el uso con una dilución máxima de 1:1.
2. Las muestras recolectadas pueden ser almacenadas a temperatura de 2°C-8°C, hasta su análisis dentro de un periodo máximo de 5 días (se recomienda hacer el análisis lo antes posible).
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.

V. 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 el fabricante, según el kit de detección de SARS-CoV-2 que utilice en su laboratorio.

En caso que un laboratorio desee implementar la metodología validada, se sugiere verificar la metodología de detección de SARS-CoV-2 en muestras de saliva. Se indica que para la verificación analítica no es necesario la realización de un estudio doble ciego aleatorizado en la población.

El ISP propone que un laboratorio o universidad realice su validación metodológica, cumpliendo con los estándares básicos definidos en el Anexo 1.

Una vez que se cuente un protocolo de validación, el laboratorio que desee implementar alguna metodología de las ya validada, no requiere replicar la validación. Sin embargo, debería realizar verificación de su desempeño mediante la examinación y presentación de evidencia objetiva, evaluando algunos parámetros reportados en la validación y determinar si son aceptables para la utilización del método.

VI. Anexo 1: Tamaño de muestra para validación

El desempeño de un kit/metodología bajo evaluación puede ser comparada con una referencia usando una tabla 2x2, que presenta la clasificación de las muestras por cada test.

Tabla 2: Tabla 2x2 para evaluar el desempeño de un test

		Test Referencia		
		Muestras Positivas (+)	Muestras Negativas (-)	Total
Test candidato	Muestras Positivas (+)	VP	FP	VP + FP
	Muestras Negativas (-)	FN	VN	FN + VN
	Total	VP + FN	FP + VN	VP + FN + FP + VN

Para realizar una **validación**, el ISP recomienda utilizar lo indicado por la normativa del CLSI, el cual indica un mínimo de 50 muestras verdaderas positivas y 50 muestras negativas detectadas por el método de referencia. En un esquema de tabla 2x2 esto sería:

Tabla 3: Tabla 2x2 para validar un test candidato según estándar CLSI.

		HNF	
		Muestras Positivas (+)	Muestras Negativas (-)
Saliva	Muestras Positivas (+)	≥ 50	FP
	Muestras Negativas (-)	FN	VN
	Total	VP + FN	FP + VN ≥ 50

VII. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Terje Aven & Frederic Boudier (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

- the Brazilian Society of Infectious Diseases, S1413-8670(20)30115-X. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.08.001>
- (18) Center for Disease Control and Prevention. [Internet] Disponible en: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/guidelines-clinical-specimens.html#collecting>
- (19) Anne L. Wyllie et al., (2020). Saliva is more sensitive for SARS-CoV-2 detection in COVID-19 patients than nasopharyngeal swabs. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.04.16.20067835v1.full.pdf>
- (20) Isabel M Ott et al., (2020). Saliva Collection and RNA Extraction for SARS-CoV-2 Detection V.2 <https://www.protocols.io/view/saliva-collection-and-rna-extraction-for-sars-cov-bg3pjymn/materials>
- (21) Banoo S, Bell D, Bossuyt P, Herring A, Mabey D, Poole F, et al. TDR Diagnostics Evaluation Expert Panel: Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2010;8(12 Suppl):S17-29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21548184>
- (22) Zhou X, McClish DK, Obuchowski NA. *Statistical methods in diagnostic medicine*. 2nd ed. Hoboken, N.J: Wiley; 2011. 545 p. (Wiley series in probability and statistics).
- (23) http://www.ispch.cl/sites/default/files/Lista%20Test%20Ra%CC%81pidos%20Covid%20al%2026_04_2020.pdf
- (24) B.F. Vogels, Anne E. Watkins, Christina A. Harden, Doug Brackney, Jared Shafer, Jianhui Wang, Cesar Caraballo, Chaney C Kalinich, Isabel Ott, Joseph R. Fauver, Eriko Kudo, Peiwen Lu, Arvind Venkataraman, Maria Tokuyama, Adam J Moore, M. Catherine Muenker, Arnau Casanovas-Massana, John Fournier, Santos Bermejo, Melissa Campbell, Rupak Datta, Allison Nelson, Charles Dela Cruz, Albert Ko, Akiko Iwasaki, Harlan M. Krumholz, JD Matheus, Pei Hui, Chen Liu, Shelli Farhadian, Robby Sikka, Anne L Wyllie, Nathan Grubaugh. SalivaDirect: A simplified and flexible platform to enhance SARS-CoV-2 testing capacity. *medRxiv*, September 28, 2020. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.08.03.20167791>
- (25) Becker D., Sandoval E., Amin A., De Hoff P., Diets A., Leonetti N., Lim YW., Elliott C., Laurent L., Grzymiski J., , Lu JT. Saliva is less sensitive than nasopharyngeal swabs for COVID-19 detection in the community setting. *medRxiv preprint*; May 17, 2020. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.11.20092338>
- (26) 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* 58:e00776-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00776-20>.

- (27) Citation Procop GW, Shrestha NK, Vogel S, Van; Sickle K, Harrington S, Rhoads DD, Rubin BP; Terpeluk P. 2020. A direct comparison of enhanced saliva to nasopharyngeal swab for the detection of SARS-CoV-2 in symptomatic patients. *J Clin Microbiol* 58:e01946-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.01946-20>.
- (28) Bastos ML, Perlman-Arrow S, Menzies D, Campbell JR. The Sensitivity and Costs of Testing for SARS-CoV-2 Infection With Saliva Versus Nasopharyngeal Swabs : A Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2021 Jan 12. doi: 10.7326/M20-6569. Epub ahead of print. PMID: 33428446.