

Protocolo de validación para la detección del virus SARS-CoV-2 en muestras de saliva mediante RT-PCR en tiempo real

Protocolo de validación para la detección del virus SARS-CoV-2 en muestras de saliva mediante RT-PCR en tiempo real

1. OBJETIVO

Detectar la presencia del material genético del virus SARS-CoV-2 a partir de muestras de saliva mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real.

2. DESARROLLO

2.1 Materiales, reactivos y equipos

- Placa de reacción rápida óptica MicroAmp™ de 96 pocillos, 0.1 ml (Catálogo 4346906, Applied Biosystems)
- MicroAmp™ Optical 8-Cap Strips (Catálogo 4323032, Applied Biosystems)
- Tubos cónicos 15 ml tapa rosca (Catálogo 339650, Thermo Scientific)
- Tubos cónicos 1.5 ml (Catálogo 5101501, Capp)
- Tubos cónicos 2 ml (Catálogo 1149K02, LabForce)
- Puntas de micropipeta con filtro y libres de nucleasas de 10 uL
- Puntas de micropipeta con filtro y libres de nucleasas de 20 uL
- Puntas de micropipeta con filtro y libres de nucleasas de 200 uL
- Puntas de micropipeta con filtro y libres de nucleasas de 1000 uL
- Micropipetas P10, P20, P200, P100
- Micropipeta de 8 canales P5-50 o P2-20
- Micropipeta electrónica de 200 µL
- Gabinete bioseguridad clase II
- Cabina de PCR
- Vortex
- Centrífuga con rotor de tubos de 15 ml
- Purificador de ácidos nucleicos ExPrep™ 96 Lite (Bioneer)
- Kit de purificación de ácidos nucleicos ExiPrep 96 Viral DNA/RNA Kit (Catálogo K-4614, Bioneer)
- Termociclador en tiempo real Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- Taqman Fast Virus 1-Step Master mix (1 x 10 ml) (Catálogo 4444436, Applied Biosystems)
- TaqMan™ 2019-nCoV Assay Kit v1 (Catálogo A47532, Applied Biosystems)
- TaqMan™ 2019nCoV Control Kit v1 (Catálogo A47533, Applied Biosystems)

- Agua Biología Molecular (Catálogo 46-000-CM, Corning)
- Desinfectantes de superficie (hipoclorito de sodio 0,5%, etanol 70%, removedor de RNAsas)
- Papel absorbente
- Elementos de protección personal (delantal desechable, delantal plástico, cubre calzado, mascarillas N95 (FFP2), antiparras y guantes quirúrgicos)

2.2 Metodología

I. Obtención de la muestra de saliva:

Al menos 30 minutos antes de la toma de muestra:

- No ingerir alimentos ni líquidos, excepto agua.
- No debe masticar chicle, fumar o utilizar algún tipo de spray bucal antes de la toma de muestra.
- No debe lavarse los dientes, ni utilizar enjuagues bucales o hilo dental antes de la toma de muestra.
- Remover productos cosméticos, bálsamos o cremas labiales, tampoco toque los labios con sus manos antes de la toma de muestra.

El personal de salud debe:

1. Rotular el contenedor de la muestra (tubo cónico de 15 ml sin medio de transporte ni PBS) con la información del paciente (nombre, tipo de muestra y fecha de toma de muestra) de forma clara y legible.
2. Entregar el tubo al paciente posterior al lavado de manos señalado en el siguiente punto.

El paciente por sí mismo debe:

3. Lavar sus manos según indicación del personal de salud.
4. Remover la mascarilla para descubrir la boca.
5. Acercar el tubo de 15 ml a su boca evitando el contacto con los labios y cuidadosamente depositar dentro del tubo la saliva acumulada en su boca, evitando la formación de burbujas y derrames fuera del frasco. La muestra debe caer libremente al interior del contenedor utilizado para la toma de muestra.

Nota: La muestra debe ser saliva y no esputo.

6. Llenar el tubo con un mínimo de 2 ml de muestra de saliva. En caso de derrame fuera del contenedor, limpiar con papel humedecido en etanol 70%.
7. Completar la cantidad necesaria de muestra, tapar el tubo enroscando la tapa firmemente para evitar derrames.
8. Lavarse las manos nuevamente.
9. Colocar la mascarilla.
10. Entregar la muestra al profesional de salud correspondiente.

El personal de salud debe:

11. Recibir y verificar que el rotulo del contenedor contenga la información del paciente.
12. Verificar el volumen apropiado de la muestra.
13. Mantener la muestra a temperatura ambiente por un máximo de 4 horas o refrigerada entre 2-8 °C por un máximo de 24 horas para su procesamiento. En estas condiciones la muestra es adecuada para el análisis.
14. Mantener en todo momento el frasco en posición vertical hasta la llegada al laboratorio para su análisis.
15. Procesar dentro de las 24 horas desde la toma de muestra.

II. Procesamiento de la muestra

1. Centrifugar por 5 minutos a 1500 x g o dejar decantar por 30 minutos si no dispone de centrífuga
2. Tomar 300 µL del sobrenadante y transferir a placa #1 del kit ExiPrep 96 Viral DNA/RNA.
3. Utilizar el protocolo de extracción de ARN del equipo ExPrep™ 96 Lite.
4. Recuperar eluido desde la placa #7 del kit ExiPrep 96 Viral DNA/RNA.
5. Elaborar reacción de RT-PCR en tiempo real de acuerdo a la siguiente tabla:

Reactivo	Volumen por reacción
Master mix (4X)	6,25 µL
2019-nCov assay (20X)	1,25 µL
RNAsa P assay (20X)	1,25 µL
RT PCR grade water	11,25 µL
Volumen total de la mezcla de reacción	20 µL

6. Agregar 5 µL del eluido obtenido en el paso 4.
7. Realizar el ensayo de RT-PCR en el termociclador 7500 Fast Real-Time PCR Systems, con el siguiente perfil térmico:

Ciclos	Paso	Temperatura	Tiempo
1	Transcripción reversa	50 °C	5 min
1	Activación	95 °C	30 seg
40	Denaturación	95 °C	3 seg
	Alineamiento y extensión	60 °C	30 seg

8. Analizar y validar los resultados de acuerdo a las instrucciones contenidas en el inserto del kit TaqMan™ 2019-nCoV Assay Kit v1.

3. REQUISITOS DE LA VERIFICACIÓN PARA LA IMPLEMENTACIÓN DE ESTE PROTOCOLO

- El primer requisito para una verificación es que se haya realizado la metodología anteriormente descrita.
- Considerando los valores obtenidos en este estudio, sensibilidad de 94,34% [IC: 84,34%-98,82%] y especificidad de 98,67% [IC: 92,79%-99,97%], se debe analizar para una verificación un mínimo de 21 muestras positivas y 18 muestras negativas confirmadas desde una muestra de hisopado nasofaríngeo (HNF) (ver Anexo N°1 para criterios del tamaño muestral de la verificación).
- Posterior a los ensayos, se debe calcular la sensibilidad y especificidad diagnóstica con sus respectivos intervalos de confianza (se sugieren intervalos de confianza exactos de Clopper-Pearson). Para esto puede utilizar la siguiente herramienta: https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php o el software gratuito R y R Studio.
- El ISP considera que el criterio de aceptabilidad para la verificación es una sensibilidad y especificidad reportada sobre o igual al intervalo inferior de esta validación, esto es, mayor o igual a 84,34% para sensibilidad y 92,79% para especificidad.

El desempeño de un kit bajo evaluación puede ser comparado con la referencia usando una tabla 2x2, que presenta la clasificación de las muestras según resultado obtenido por cada test. Esta tabla 2x2 se utiliza comúnmente para presentar los resultados de manera más ordenada:

Tabla 1: Tabla 2x2 para evaluar el desempeño de un test

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

Abreviaciones: VP: Verdaderos Positivos; FN: Falsos Negativos; FP: Falsos Positivos; VN: Verdaderos Negativos

Se sugiere reportar los parámetros de sensibilidad y especificidad, y sus respectivos intervalos de confianza, en una tabla con el siguiente formato:

Parámetro	Estimación	Intervalos de Confianza exacto de Clopper-Pearson con un 95% de confianza
Sensibilidad		
Especificidad		

Los protocolos de las metodologías y los resultados obtenidos de la verificación deben ser enviados al Instituto de Salud Pública de Chile, a través de la Agencia Nacional de Dispositivos Médicos, Innovación y Desarrollo, para su revisión a los correos electrónicos: avasquez@ispch.cl y descobar@ispch.cl

ANEXO N°1

Considerando los criterios de sensibilidad y especificidad que permiten a los kits acceder a una verificación de conformidad, se ha establecido que:

1. Para una sensibilidad reportada por el fabricante sobre o igual al 95%, la muestra mínima sugerida es de 18 muestras positivas detectadas por HNF, siempre y cuando la validación reportada por el fabricante cumpla con el estándar mínimo del “User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline” del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para las muestras verdaderos positivos* (VP). En caso que la validación no cumpla con lo descrito anteriormente, se requiere de un tamaño mínimo de 50 VP para la verificación de conformidad.
2. Para una especificidad reportada por el fabricante sobre o igual al 95%, la muestra mínima sugerida es de 18 muestras negativas detectadas por HNF, siempre y cuando la validación reportada por el fabricante cumpla con el estándar mínimo del “User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline” del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para las muestras negativas detectadas por HNF. En caso que la validación no cumpla con lo descrito anteriormente, se requiere de un tamaño mínimo de 50 muestras negativas detectadas por HNF para la verificación de conformidad.
3. Para una sensibilidad reportada por el fabricante menor a 95%, la cantidad total de muestras positivas detectadas por HNF debe determinarse mediante la “Ecuación 1”, siempre y cuando la validación reportada por el fabricante cumpla con el estándar mínimo del “User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline” del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para las muestras VP. En caso que la validación no cumpla con lo descrito anteriormente, se requiere de un tamaño mínimo de 50 VP para la verificación de conformidad.

Se utilizará la fórmula de tamaño muestral para la estimación de una proporción con una confianza del 95% y un error máximo admisible correspondiente a un 10%.

*verdaderos positivos: muestras detectadas positivas simultáneamente por método “gold standard” y candidato.

Ecuación del tamaño muestral

Considerando que la sensibilidad o especificidad de un test de diagnóstico es una proporción, se utilizó la siguiente fórmula para determinar el tamaño de muestra (21, 22):

$$n = \frac{z_{\alpha/2}^2 * P * (1 - P)}{d^2}$$

(Ecuación 1)

Dónde:

Z: es el percentil de la función de distribución de la Gaussiana (Normal (0,1)).

α : es la probabilidad que el intervalo de confianza no contenga al parámetro.

P: es la proporción (en este caso la sensibilidad o especificidad predeterminada)

d: es el error máximo admisible, valor que corresponde a un error de tolerancia para la estimación del parámetro.

Se utilizará la fórmula de tamaño muestral para la estimación de una proporción con una confianza del 95% y un error máximo admisible correspondiente a un 10%

En este caso, al reemplazar los valores de percentil y error máximo admisible correspondiente en la Ecuación 1 se tiene:

$$n = \frac{1,96^2 * P * (1 - P)}{0,1^2}$$