



DETECCIÓN DE SARS-COV-2 POR RT-QPCR EN MUESTRAS DE SALIVA

Ayudas Diagnósticas SURA

Elaborado por:

Sebastian Gutierrez Hincapie, MSc
Richard Enriquez Salazar Herrera, MSc
Laura Carolina Álvarez Acevedo, MSc
Laboratorio de Biología Molecular COVID-19

Carlos Andres Agudelo Restrepo
Medico infectólogo, Consultor Medico

Andres Gonzalez Niño
Coordinación Técnica COVID-19

Magda Liliana Cardenas Gomez
Coordinación Operativa COVID-19

Heiddy Del Valle Arrieta
Dirección técnica de laboratorio Ayudas Diagnósticas SURA



INTRODUCCIÓN

Un nuevo coronavirus, el SARS-CoV-2, apareció en diciembre de 2019, seguido de un brote informado por primera vez en Wuhan, China (1). De acuerdo con los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos, la transmisión del virus se logra principalmente a través del contacto directo o gotitas respiratorias (2) de manera cercana y dependiente del tiempo, requiriendo a menudo un contacto cercano en un espacio de 2 metros o menos de distancia" por un periodo de 15 minutos. por un periodo de 15 minutos o más (3). Según la OMS (Organización Mundial de la Salud) hasta el 21 de octubre del presente año se han reportado 243.260.214 casos confirmados y 4.941.039 muertes (4) en Colombia se han reportado 4.991.050 casos confirmados y 127.067 muertes. El diagnóstico precoz en el laboratorio de una infección por SARS-CoV-2 puede ser útil para la gestión clínica y el control de brotes

Actualmente la detección de SARS-CoV-2 está basada en la detección de genes virales por medio de RT-PCR en tiempo real a partir de muestras nasofaríngeas u orofaríngeas o por hisopados nasales u orales. Obtener este tipo de muestras requiere de personal de la salud altamente entrenado, exponiéndolos a los aerosoles que pueden ser derivados de los pacientes, adicionalmente es un proceso incomodo e invasivo al que muchos pacientes (principalmente en niños y adulto mayor) no desean someterse dificultando la toma de la muestra y llevando a fallas en la obtención del resultado. Lograr tener una mejor experiencia de usuario (comodidad, confort y autonomía) eliminando las barreras antes mencionadas, hace posible explorar la saliva como muestra de fácil acceso, recolección y no invasiva disminuyendo los riesgos asociados a la toma de muestra. (5)



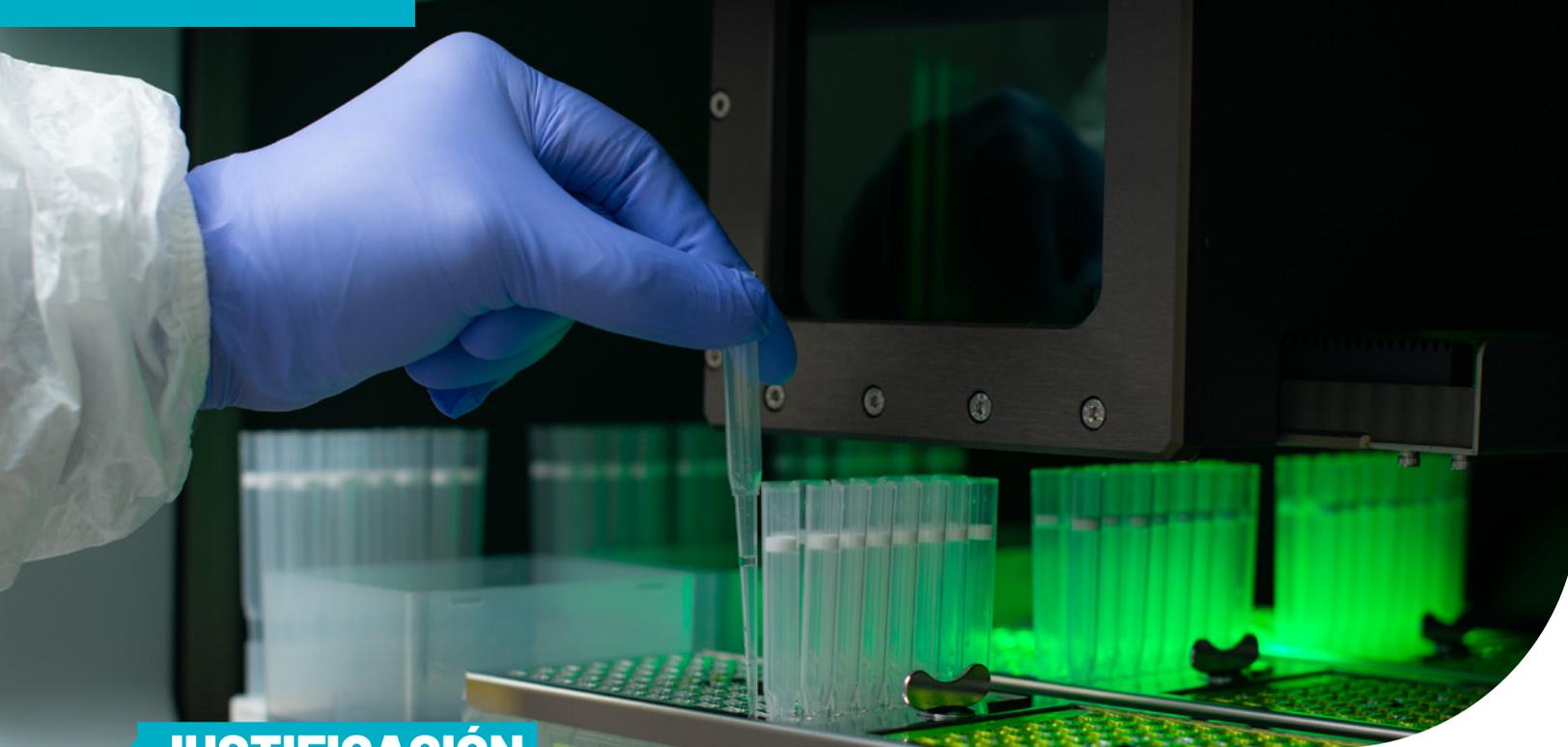
La saliva es un tema importante de investigación, sobre tipos alternativos de especímenes de muestras, así como la muestra elegida por numerosas empresas que implementan programas de pruebas de grandes volúmenes, algunas ciudades como Hong Kong (China), ya adoptaron la saliva en sus protocolos de detección masiva (6). De manera similar, en España, también se realiza el diagnóstico de COVID-19 utilizando la saliva como muestra alternativa.

Específicamente en Valencia y Cataluña, a través de la red de Clínicas Biomédicas Ascires, se realizan entre 2000 y 3000 RT-qPCR/día para SARS-CoV-2 en muestras de saliva. Por su parte, en Latinoamérica, países como Ecuador, Brasil, Perú y Chile, han realizado sus propios estudios piloto, concluyendo que, si bien la muestra de saliva no viene a reemplazar los aspirados e hisopados nasofaríngeos, si se considera una muestra alternativa y con importantes ventajas para ser utilizada en circunstancias como: vigilancia epidemiológica, la búsqueda activa de casos en atención primaria, establecimientos educativos, recintos deportivos, áreas laborales, entre otros más. Recientemente, por ejemplo, la Universidad de Santiago (Chile), implementó el test de saliva para detección de COVID-19 para quienes ingresan a sus instalaciones.

El fundamento fisiopatológico para el muestreo de saliva se basa en que la enzima convertidora de angiotensina II (ACE-2) que es el receptor celular para SARS-CoV-2 (7,8), exhibe una alta expresión en la mucosa oral y las glándulas salivales (9,10). Previamente, se ha identificado que las células epiteliales de los conductos de las glándulas salivales podrían ser un objetivo para el SARS-CoV en un modelo de macaco rhesus (11). Un estudio detectó el SARS-CoV-2 en la saliva recolectada a través de expresión directa del conducto de la glándula salival (12). Estos hallazgos sugieren que la saliva puede ser una muestra de diagnóstico adecuada y de alto rendimiento para las pruebas de SARS-CoV-2 basadas en la replicación viral local, además de la posible mezcla en la saliva de fluidos del tracto respiratorio superior e inferior que pueden transportar el virus. Una de las ventajas más importantes con este tipo de muestras es que al permitir ser obtenida por el paciente, reduce el riesgo de infección para el personal de la salud, optimiza el uso de equipo de protección personal y la dependencia de materiales para el proceso que pueden estar sujetos a escasez de suministros, como hisopos nasales, Orofaríngeos o Nasofaríngeos.

Con este estudio, Ayudas Diagnósticas Sura pretende verificar el rendimiento diagnóstico del uso de saliva como muestra adecuada para la detección de SARS-CoV-2 (COVID-19) por RT-qPCR e implementar esta nueva opción para la toma de muestra permitiendo un proceso más cómodo, eficiente y seguro para los pacientes que conserven los estándares de calidad, sensibilidad y especificidad en el diagnóstico clínico de COVID-19. En este estudio se emplearon juegos de reactivos diseñados específicamente para la toma de muestra de saliva, los cuales cuentan con certificado IVD (Certificado de Diagnóstico in Vitro), CE (Conformidad Europea) e INVIMA (Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos de Colombia).





JUSTIFICACIÓN

La toma de muestras con hisopados o aspirados nasofaríngeos, a pesar del uso generalizado pueden presentar un serie de limitaciones y presentar dificultades para su recolección además de requerir personal altamente capacitado, por ello se ha planteado una muestra alternativa como la saliva ampliamente utilizada en países de América Latina y países del resto del mundo, proporcionando una opción adicional para la recolección fácil, segura y conveniente de las muestras que se requieren para las pruebas, brindando mayor autonomía al paciente y sin ser una toma de muestra exclusiva del ambiente intrahospitalario (consultorio médico, hospital o laboratorio)(14).

El uso de hisopos o sondas nasales o nasofaríngeas son menos aceptables por los pacientes ya que tienden a causar incomodidad al paciente e incluso sangrado en comparación con métodos no invasivos como la recolección de saliva. La aceptación del paciente es muy deseable para los métodos de toma de muestra donde se necesita realizar monitoreo y seguimiento de la enfermedad, como en el caso de COVID-19. Además, el riesgo de transmisión de enfermedades al personal sanitario al recoger estas muestras es alto, ya que requiere interacción entre el trabajador de la salud- paciente; dado lo anterior se debe hacer recambio en cada toma de muestra llevando a altos costos en elementos de protección personal y que han escaseado a nivel mundial debido a la pandemia COVID-19 (15-16). Es preocupante el contagio y muerte en los trabajadores de la salud que han sido infectados con SARS-CoV-2; en Colombia se tienen datos a la fecha del día 5 de mayo del 2021 de 56.558 casos confirmados de los cuales 270 han fallecido.

El uso potencial de la saliva para la detección del SARS-CoV-2 está científicamente bien fundamentado. Se considera que la saliva es un buen reservorio de virus que se originan en la diseminación oral y secreciones del tracto respiratorio inferior, nasofaringe y glándulas salivales de ahí su alta tasa de transmisibilidad.



De hecho, Chen et al en 2019, pudieron detectar ARN del SARS-CoV-2 en tres de cada cuatro muestras de saliva recolectadas directamente de los conductos de las glándulas salivales, evitando así la contaminación de las secreciones respiratorias de los casos críticos (17). De acuerdo con esto, el posible uso diagnóstico de la saliva para varios virus respiratorios, incluido el coronavirus ha sido respaldado por estudios que demuestran una alta sensibilidad y especificidad de las pruebas basadas en saliva, con resultados que muestran de concordancia mayor al 90% entre saliva e hisopados nasofaríngeos (18).

Los estudios actuales de diferentes grupos han mostrado resultados prometedores sobre el posible uso de la saliva para la detección del ARN del SARS-CoV-2 con un rango de sensibilidad reportada desde 84.2% a 91.7% (19-26). Recientemente, investigadores del Instituto de Medicina Tropical de la Universidad de São Paulo (IMT-USP), validaron el diagnóstico de COVID-19 con muestras de saliva de 50 niños con síntomas leves relacionados con la enfermedad.

Las muestras (Hisopados Nasofaríngeos y saliva) fueron recolectadas en los primeros 7 días desde el inicio de síntomas. Reportaron una concordancia del 92% con una sensibilidad aproximada del 90%. Concluyen que la saliva es una muestra alternativa viable para el diagnóstico de COVID-19 en población pediátrica.

La sensibilidad de los métodos de detección de ARN del SARS-CoV-2 que emplean saliva parece ser comparable o mejor que la de los hisopos nasofaríngeos. Además, la saliva puede ser un buen candidato para la detección del SARS-CoV-2 para los casos con síntomas moderados a severos (20), y para casos asintomáticos o leves (19). Este último es particularmente importante para la búsqueda activa y en el tamizaje de casos sospechosos y/o en la vigilancia de los trabajadores de la salud. El auto muestreo de saliva también podría ser una opción en estudios poblacionales de prevalencia puntual a gran escala. Otro punto importante para tener en consideración es que, dado que la muestra de saliva es fácil de recolectar, favorece su aplicación en estrategias de búsqueda masiva de casos activos enfocadas por ejemplo en la reapertura y activación de instituciones de educación básica y superior.

Además, la saliva se ha utilizado como opción de muestra para RT-qPCR SARS-CoV-2 en más de 25 estudios publicados, aplicados en países como Japón, Francia, EE. UU. y China (13), sugiriendo una recolección de la muestra salival dentro de los 7 primeros días de síntomas, en los cuales la carga viral puede ser detectada (13). Por lo tanto, verificar el uso de saliva como muestra en los pacientes con sospecha o síntomas de COVID-19 dentro de los 5 a 7 primeros días para diagnóstico por RT-qPCR en el Laboratorio Ayudas Diagnósticas SURA permitiría una mayor capacidad de atención, mejorar los tiempos de espera y disminuir el gasto al sistema de salud, logrando una mejor experiencia de usuario (comodidad, seguridad y rapidez) e incluso lograr que el paciente pueda realizar la recolección en su domicilio asegurando la trazabilidad en la identificación y marcaje de su propia muestra al llevarla al laboratorio evitando posibles contagios al personal de salud derivados de la atención del paciente.



ALCANCE Y CAMPO DE APLICACIÓN

Este protocolo aplica para la detección de SARS-CoV-2 en muestras de aspirado nasofaríngeo y saliva en pacientes con sospecha de la infección. Además, esta estrategia puede apoyar la detección de SARS-CoV-2 ya que no se requiere de personal capacitado en el caso de usar como muestra la saliva, que incluso puede ser tomada por el mismo paciente.

OBJETIVO GENERAL

Verificar el rendimiento diagnóstico de las pruebas de RT-qPCR ASCIRES SG Kit Covid19 Multiplex One Step PCR Lyo-L y Allplex™ 2019-nCoV Assay a partir de muestras de aspirado nasofaríngeo y muestras de saliva recolectadas en el Saliva Viral Sample Collection Kit 2 de ASCIRES en pacientes afiliados a EPS SURA en la ciudad de Medellín Colombia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Describir las características demográficas y clínicas de los pacientes afiliados a EPS sura participantes del estudio.
2. Determinar la presencia del virus SARS-CoV-2 en muestras de aspirado nasofaríngeo y saliva por medio de las pruebas RT-qPCR ASCIRES SG Kit y Allplex™ 2019-nCoV Assay.
3. Comparar los valores de CT obtenidos de muestras de aspirado nasofaríngeo vs muestras de saliva para las pruebas RT-qPCR ASCIRES SG Kit y Allplex™ 2019-nCoV Assay.
4. Comparar el desempeño diagnóstico de la prueba RT-qPCR ASCIRES SG Kit Covid19 Multiplex One Step PCR Lyo-L frente a Allplex™ 2019-nCoV assay para la identificación de SARS-CoV2 en muestras de aspirado nasofaríngeo y saliva.
5. Determinar las características de desempeño diagnóstico de la prueba Allplex™ 2019-nCoV Assay para la identificación de SARS- CoV-2 en muestras de saliva.
6. Determinar las características de desempeño diagnóstico de la prueba RT-qPCR ASCIRES SG Kit Covid19 Multiplex One Step PCR Lyo-L para la identificación de SARS- CoV-2 en muestras de aspirado nasofaríngeo y saliva.



METODOLOGÍA

TIPO DE ESTUDIO: PROSPECTIVO

CÁLCULO DEL N MUESTRAL: para calcular el tamaño de la muestra para la evaluación de sensibilidad de la prueba RT-qPCR ASCIRES SG Kit Covid19 Multiplex One Step PCR Lyo-L, se aplicó la siguiente fórmula de Jacobson (1998) Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 1998,17 (2), 507-526:

$$n = \{Se (1-Se) C^2\} / E^2$$

Donde:

Se= Sensibilidad esperada (otorgada por el fabricante p la literatura)

C= Intervalo de confianza estimado (1.96 para un 95% de confianza)

E= % de error permitido en la estimación de sensibilidad expresado en decimal (habitualmente ± 5-20%)

$$n = \{Sp (1-Sp) C^2\} / E^2$$

Donde:

Sp= Especificidad esperada (otorgada por el fabricante p la literatura)

C= Intervalo de confianza estimado (1.96 para un 95% de confianza)

E= % de error permitido en la estimación de especificidad expresado en decimal (habitualmente ± 5-20%)

Luego de aplicar la formula, se obtuvo que se deben incluir mínimo 14 muestras positivas para evaluar la sensibilidad diagnóstica.

Sensibilidad de la prueba	99.10%
k para un IC del 95 %	1.96
E % de error permitido en la estimación de la S entre (5%-20%)	5%
Tamaño de la muestra	14
$n = (S*(1-S)/K^2)/E^2$	

Para evaluar la especificidad diagnóstica, se debe incluir mínimo 2 muestras negativas.

Especificidad	99.90%
k para un IC del 95 %	1.96
E % de error permitido en la estimación de la S, entre (5%-20%)	5%
Tamaño de la muestra	2

POBLACIÓN DE ESTUDIO: Pacientes afiliados a EPS SURA que asisten a la sede Punto Clave de Ayudas Diagnósticas SURA en la ciudad de Medellín. En total se incluyeron 71 pacientes con una distribución aproximadamente igual entre (31) positivos y (40) negativos para COVID-19.



CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- **Ordenamiento médico** de RT-qPCR para SARS-CoV-2.
- **Diligenciamiento y firma del consentimiento informado:** "Validación del uso de saliva como muestra para el diagnóstico de COVID-19 en Ayudas Diagnósticas SURA".
- **Diligenciamiento encuesta de síntomas:** "ENCUESTA PARA VINCULACIÓN DE PARTICIPANTES PARA INVESTIGACIÓN EN COVID-19".

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN: Haber consumido alimentos, masticar chicle o haber fumado en los últimos 30 minutos antes de la toma.

DESCRIPCIÓN DE LA UNIDAD DE ANÁLISIS: Aspirados nasofaríngeos y muestras de saliva.

OBTENCIÓN DE LA INFORMACIÓN DEMOGRÁFICA Y CLÍNICA: Encuesta de síntomas y ficha epidemiológica.

PREPARACIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS:

Las muestras de aspirados nasofaríngeos fueron recolectadas utilizando una sonda en un volumen mínimo de 3ml de solución salina estéril, dejando parte de la sonda dentro del recipiente, la cual se retiró en el momento que se procesó la muestra, después de realizar una homogenización por vortex para asegurar una mejor resuspensión.

Las muestras de saliva fueron recolectadas usando el kit PCR2Go Saliva (IVD, CE Ed 10/20 RBMSAL2V01-100; Registro INVIMA 2021DM-0023201) de ASCIRES Sistemas Genómicos (Durviz s.l. 46980, Paterna - Valencia - España) 10 minutos después de haber realizado un enjuague bucal con agua. El procedimiento consistió en tres pasos:

- 1.** Frotar las mejillas y paladar con la lengua para la estimulación de la secreción de saliva.
- 2.** Escupir la saliva en el embudo hasta que el líquido (sin incluir las burbujas) alcance la línea de 1 mL en el tubo de recolección.
- 3.** Añadir la solución conservadora al tubo de recolección que contiene la saliva y mezclar por inmersión durante 15 segundos (Volumen final 2 mL).

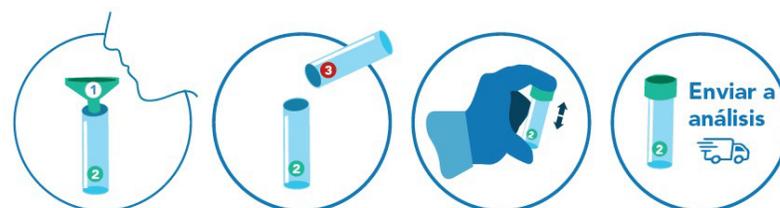


Figura 1. Esquema recolección de muestra de saliva.



NOTA: Las muestras de Aspirado Nasofaríngeo y Saliva fueron recolectadas simultáneamente dentro de los primeros 7 días de inicio de síntomas.

Las muestras se deben transportar al laboratorio garantizando una temperatura entre 4°C y 25°C, y ser procesadas en el mismo día de la recolección (Si el análisis no puede ser realizado el mismo día, congelar a -20°C por 24 horas o -80°C por tiempos prolongados)

CÁLCULOS ESTADÍSTICOS.

Tabla 2x2

Resultado de la prueba	Verdadero diagnóstico	
	COVID-19 Positivo	COVID-19 Negativo
Positivo	Verdadero positivo VP	Falso positivo FP
Negativo	Falso Negativo FN	Verdadero negativo VN

- 1. Sensibilidad:** Proporción de resultados de positivos que son detectados como positivos en las muestras analizadas. $VP / VP + FN$.
- 2. Especificidad:** proporción de resultados negativos que son detectados como negativos en las muestras analizadas. $VN / VN + FP$.
- 3. Valor predictivo positivo:** probabilidad de tener COVID-19 dado que se obtiene un resultado positivo $VP / VP + FP$.
- 4. Valor predictivo negativo:** probabilidad de no tener COVID-19 dado que se obtiene un resultado negativo $VN / VN + FN$.
- 5. Criterio de exactitud diagnóstica:** proporción de resultados correctamente clasificados como positivos y negativos $VP + VN / VP + VN + FP + FN$.
- 6. Índice Youden:** diferencia entre la proporción de verdaderos positivos y la de falsos positivos. VP / FP .
- 7. Concordancia:** Cada una de las 71 (muestras positivas y negativas por los dos métodos de toma de muestra empleados (ASN y Saliva) que fueron sujeto de proceso de extracción y amplificación. Para evaluar la concordancia entre las muestras fue empleado el cálculo del Índice kappa.

Las variables cualitativas se describieron con medidas de frecuencia ("n" y "%") y para establecer posibles asociaciones estadísticas se uso la prueba de Chi cuadrado de independencia.



Para las variables cuantitativas se aplicó la prueba de normalidad Kolmogorov – Smirnov con la corrección de Lillefors. La descripción de los datos se realizó con medidas de tendencia central (Media) y dispersión (DS) y con medidas de posición (Mediana y RIC). La prueba de Wilcoxon se aplicó para comparar el rango medio de dos muestras relacionadas (Ct de Aspirado Nasofaríngeo y Saliva) y determinar si existen diferencias entre ellas.

EXTRACCIÓN DE ARN VIRAL : En la extracción del ARN viral se emplearon reactivos de LifeRiver Bio-Tech de micropartículas magnéticas, que poseen certificados IVD (*In vitro diagnostic*), CE (Conformidad Europea) y registro INVIMA 2020RD-0006226 (Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos), en conjunto con el instrumento de extracción automatizado EX3600 de LifeRiver.

ESPECIFICACIONES DEL EQUIPO DE EXTRACCIÓN EX3600:

Nombre del equipo	EX3600 Automated Nucleic Acid Extraction
Cat. #	IE-0002
Volumen de muestra	300 µL
Cantidad de muestras	36 units/time
CMOD	1
Tiempo de proceso de la muestra	20 min
Eficiencia de las perlas magnéticas	≥99%
96 pozos por plato	3
Barra magnética	24
Capa magnética desechable	3 tiras (12 pozos)
Keypad	Start/Stop/Direction Keys
Monitor	LCD (text display)
Lámpara UV	Disponible
Dimensiones	53*50*45 cm
Peso	30kg
Condición de operación	Temperatura ambiente
CMOD	1



COMPONENTES DEL KIT DE EXTRACCIÓN: VIRAL RNA ISOLATION KIT - LIFERIVER BIO-TECH

Componentes	Cantidad		Almacenamiento
	ME-0044 (60 pruebas)	ME-0045 (240 pruebas)	
Plato precargado	5 piezas	20 piezas	Temperatura ambiente
Tiras Magnéticas desechables	5 tiras desechables	20 tiras	Temperatura ambiente
Proteinasa K	1.3 mL	1.3 mL x 4	Temperatura ambiente
Carrier de ARN	1 tubo	1 tubo x 4	Temperatura ambiente
Buffer del carrier de ARN	600 uL	600 uL x 4	Temperatura ambiente

Para la preparación de reactivos y el procedimiento de adición de las muestras, se realizó siguiendo las instrucciones del inserto de la casa comercial. Se agregaron 10 µL de RP-V IC (Control Interno Exógeno del kit de PCR de referencia: Allplex 2019-nCoV Assay) antes de la extracción de ácidos nucleicos.

RT-qPCR EMPLEADAS PARA LA DETECCIÓN DE SARS-CoV-2

1. PRUEBA DE REFERENCIA

Prueba 1	Allplex 2019-nCoV Assay
Fabricante	Seegene, inc Korea
Componentes	Mezcla maestra, Primers 2019-nCoV MOM, Tampón, Control Positivo (PC), Control Interno Exógeno (IC) y Agua libre de nucleasas.
Blanco molecular	gen E, RdRp y N de la cepa SARS-CoV-2
Control interno de extracción	Control interno exógeno (RP-V IC)
Volumen de reacción	25µL
Esquema de reacción	8µL de eluido de ARN + 17µL mezcla maestra
Límite de detección (copias/mL)	4167 copias/mL (100 copias de ARN/reacción)
Sensibilidad en muestras respiratorias superiores	93.07%
Sensibilidad en muestras respiratorias inferiores	96.84%
Especificidad	100%
Certificados	IVD, CE, INVIMA 2020RD-0006094



2.

PRUEBA SUJETO DE VERIFICACIÓN

Prueba 2	RT-qPCR ASCIRES SG Kit Covid19 Multiplex One Step PCR Lyo-L
Fabricante	Sistemas Genómicos-ASCIREs
Componentes	Mezcla maestra Ready to use (liofilizada), Buffer de rehidratación y control positivo (C+) y Agua libre de nucleasas, control de calidad de extracción
Blanco molecular	gen ORF1a y ORF1ab (RdRp) de la cepa SARS-CoV-2
Control de calidad de la extracción	gen RNaseP humano (Opcional)
Control interno de PCR	ADN heterólogo
Volumen de reacción	20 µL
Esquema de reacción	5µL de eluido de ARN + 15µL mezcla maestra
Límite de detección (copias/rxn)	> 5 copias/rxn
Sensibilidad	99.07%
Especificidad	100%
Certificados	IVD, CE, INVIMA 2020RD-0006258

NOTA: Ambas pruebas utilizan un control interno exógeno (heterólogo). Este control permite verificar el paso de extracción de ARN viral. El control exógeno de qPCR se "añade" al tampón de lisis con la muestra antes de la extracción. La presencia (amplificación) del control interno en la PCR confirma el éxito del paso de extracción y reduce la posibilidad de obtener un resultado falso negativo en la muestra evaluada, además evalúa inhibición de la PCR.

En el caso de la prueba RT-qPCR ASCIRES SG Kit Covid19 Multiplex One Step PCR Lyo-L, el fabricante recomienda realizar el análisis de RNaseP como control de calidad aleatorio y semanal para verificar los procesos de manera periódica.

Como limitante, no se incluye control interno endógeno o gen de referencia como: RNaseP de rutina en todas las corridas. Este gen debe expresarse en la muestra que está siendo analizado y su expresión no puede verse influenciada por el tratamiento experimental. Este tipo de control se utiliza principalmente en la PCR en tiempo real para normalizar las diferentes cantidades de carga de ácidos nucleicos, pero en el presente caso cumple una función muy importante ya que permite evaluar el proceso de obtención de la muestra respiratoria, la calidad la muestra y el proceso de extracción de ácidos nucleicos.



PREPARACIÓN DE LA REACCIÓN PARA CADA UNA DE LAS PCRS EMPLEADAS

Todas las preparaciones de reacción incluyeron suficientes pocillos de reacción para el número de muestras y al menos un control positivo (CP) y negativo (NTC) (# de muestras + 2 = total de pocillos de reacción necesarios). Se descongelaron los reactivos en hielo, o en un bloque frío, antes de comenzar la preparación.

NOTA: Todo el pipeteo se hizo en hielo

PREPARACIÓN DE MEZCLA MAESTRA SEGÚN EL NÚMERO DE REACCIONES:

A. ALLPLEX 2019-NCOV ASSAY

Núm. de reacciones	1 reacción (µL)
5X Real-time One-step Buffer	5
Primers 2019-nCoV MOM	5
Agua libre de nucleasas.	5
Real-time One-step Enzyme	2

1. Repartir alícuotas de 17 µL de One-step RT-QPCRMasternmix en cada pozo del plato de reacción.
2. Añadir 8 µL de los ácidos nucleicos de cada muestra
3. Añadir 8 µL de un control (NTC y CP por cada corrida de PCR)
4. Se colocaron las placas de PCR en el instrumento de PCR en tiempo real (CFX-96)

B. RT-QPCR ASCIRES SG KIT COVID19 MULTIPLEX ONE STEP PCR LYO-L:

Núm. de reacciones	Núm. de reacciones
RT-qPCRCOVID-19 MIX	RT-qPCRCOVID-19 MIX
Muestra/Controles	Muestra/Controles

1. Realizar spin a la placa con el reactivo de mezcla maestra liofilizado. En caso de no realizar un montaje completo (96 reacciones), el plato puede ser dividido en tiras de 8 reacciones (12X8 reacciones).
2. Rehidratar el plato o las tiras necesarias para la cantidad de muestras y controles que se vayan a utilizar con 15µL de buffer de rehidratación.
3. Añadir 5 µL de los ácidos nucleicos de cada muestra
4. Añadir 5 µL de un control (NTC y CP por cada corrida de PCR)

NOTA: El control positivo viene en presentación: Liofilizado. Previamente se debe rehidratar con 70 µL del buffer de rehidratación.

PREPARACIÓN DEL INSTRUMENTO DE PCR (CFX-96) PARA CADA UNA DE LAS METODOLOGÍAS

Se programó el instrumento de PCR con las condiciones de ciclo que se indican a continuación para la prueba:

A. ALLPLEX 2019-NCOV ASSAY

Fase	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Detección de fluorescencia
Transcripción inversa	1	50°C	20 minutos	-
Desnaturalización inicial	1	95°C	15 minutos	-
Amplificación	45	94°C	15 segundos	-
		58°C	30 segundos	FAM (E), HEX (CI), Cal Red 610 (RdRp) y Quasar 670 (N)

B. RT-QPCR ASCIRES SG KIT COVID19 MULTIPLEX ONE STEP PCR LYO-L

Fase	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Detección de fluorescencia
Transcripción inversa	1	45°C	10 minutos	-
Activación Polimerasa	1	95°C	20 segundos	-
Amplificación	40	95°C	5 segundos	-
		58°C	20 segundos	CY5 (ORF1a), FAM (ORF1ab-RdRp), HEX/VIC (CI)

ALGORITMO DE INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

1. VERIFICACIÓN DEL RESULTADO DE LOS CONTROLES DE LA PRUEBA:

A. ALLPLEX 2019-NCOV ASSAY

Tipo de control	Nombre de control	Resultado
Control positivo COVID-19	Gen E (FAM)	+
	Gen RdRP (CalRed 610)	+
	Gen N (Quasar 670)	+
	IC (HEX)	+
Control Negativo de PCR	Gen E (FAM)	-
	Gen RdRP (CalRed 610)	-
	Gen N (Quasar 670)	-
	IC (HEX)	-



B. RT-qPCR ASCIRES SG KIT COVID19 MULTIPLEX ONE STEP PCR LY0-L

Tipo de control	Nombre de control	Resultado
Control positivo COVID-19	ORF1a (CY5)	+
	ORF1ab-RdRp (FAM)	+
	IC (HEX)	+
Control Negativo de PCR	ORF1a (CY5)	-
	ORF1ab-RdRp (FAM)	-
	IC (HEX)	+

NOTA: Si los controles pasaron, se procedió a analizar los resultados de las muestras

2. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

A. ALLPLEX 2019-NCOV ASSAY

IC (HEX)	E (FAM)	RdRp (CalRed 610)	N (Quasar 670)	Interpretación
-/+	+	+	+	2019-nCoV Detectado
-/+	+	-	+	
-/+	+	+	-	
-/+	-	+	+	
-/+	-	-	+	
-/+	-	+	-	
-/+	+	-	-	Presuntivo positivo
+	-	-	-	Negativo
-	-	-	-	Invalido

NOTA: Un resultado positivo mostrará una curva de amplificación o un valor de umbral de ciclo para COVID - 19 \leq 40 ciclos.





RT-qPCR ASCIRES SG KIT COVID19 MULTIPLEX ONE STEP PCR LY0-L

ORF1a (CY5)	ORF1ab(RdRp) (FAM)	IC (HEX)	Interpretación
+	+	+	SARS-CoV-2 Positivo
+	-	+	
-	+	+	
-	-	+	SARS-CoV-2 Negativo
-/+	-/+	-	Invalido

RESULTADOS

Tabla 1. Características demográficas y clínicas del grupo de estudio.

Variables cuantitativas	Media \pm (DS)	Mediana (RIQ)	Min-Max
Edad	37 (14)	33 (26-45)	16-79
Evolución de síntomas (días)	4 (2)	3 (3-5)	1-10

Prueba de normalidad $p < 0.05$: datos no paramétricos; las medidas de resumen se interpretan con la mediana y RIQ.

Variables cuantitativas	Clasificación	n	%
Sexo	Masculino	17	24%
	Femenino	54	76%
Movilidad	Vehículo Particular	47	66%
	Transporte Público	23	32%
	Otro	1	1%
Viajes nacionales en los últimos 10 días	No	64	90%
	Si	7	10%
Tipo de vivienda	Familiar	64	90%
	Individual	7	10%
Nexo Epidemiológico	No	33	49%
	Si	34	51%
Orden de toma de muestra (saliva):	Antes del ASN	51	72%
	Después del ASN	20	28%
Horario de toma de muestra	Mañana	38	54%
	Tarde	33	46%
Resultado RT-qPCR Aspirado Nasofaríngeo con prueba de referencia	Negativo	40	56%
	Positivo	31	44%

*ASN: Aspirado Nasofaríngeo



La caracterización demográfica de los individuos por sexo mostró una frecuencia de mujeres del 76%; el 50% de los datos centrales de la edad se ubicaron entre 26-45 años cumplidos con una mediana de 33. La mediana desde el inicio de síntomas y la toma de la muestra fue de 3 días con el 50% de los datos centrales ubicados entre 3 y 5 días, con un rango entre 1 y hasta 10 días de síntomas para la toma de muestra y realización de la RT-qPCR.

Los análisis de frecuencia muestran que las mujeres representan el 76% en la población de estudio; el 66% de las personas incluidas se movilizan en vehículo particular. Solo el 10% refieren un viaje nacional en los últimos 10 días; el 51% reporta haber tenido contacto con alguna persona diagnosticada con COVID-19. Más del 70% de las muestras de saliva fueron tomadas antes del aspirado nasofaríngeo y el 54% de las muestras fueron colectadas en el horario de la mañana. En total se obtuvieron 40 (56%) resultados positivos para COVID-19.

VARIABLES RELACIONADAS		COVID-19			
		Negativo		Positivo	
		n	%	n	%
Movilidad	Vehículo Particular	27	57.4%	20	42.6%
	Transporte Público	13	56.5%	10	43.5%
	Otro	0	0.0%	1	100.0%
Viajes nacionales en los últimos 10 días	No	36	56.3%	28	43.8%
	Si	4	57.1%	3	42.9%
Tipo de vivienda	Familiar	38	59.4%	26	40.6%
	Individual	2	28.6%	5	71.4%
Nexo Epidemiológico	No	17	51.5%	16	48.5%
	Si	20	58.8%	14	41.2%
Orden de toma de muestra (saliva):	Antes del ASN	26	51.0%	25	49.0%
	Después del ASN	14	70.0%	6	30.0%
Horario de toma de muestra	Mañana	18	47.4%	20	52.6%
	Tarde	22	66.7%	11	33.3%

*ASN: Aspirado Nasofaríngeo

Los análisis de frecuencia muestran que 3 de 7 (43%) pacientes con antecedentes de viajes nacionales en los últimos 10 días resultaron positivos para SARS-CoV-2. Solo el 41.2% de los que refirieron haber tenido contacto con alguien con COVID-19 resultaron positivos. El 49% de las muestras de saliva tomadas antes del ASN dieron positivas, en contraste con el 70% de las muestras de saliva que se tomaron después del ASN con resultado negativo, sin embargo, estos resultados fueron concordantes con el resultado obtenido con el ASN. De acuerdo con el horario, cerca del 53% de las muestras tomadas en la mañana resultaron positivas y el 67% de las muestras tomadas en la tarde resultaron negativas. No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas.



Tabla 2. Sintomatología reportada por el grupo de estudio.

Variable	Clasificación	n	%
Fiebre	No presenta	39	55%
	Presenta	32	45%
Anosmia	No presenta	23	32%
	Presenta	48	68%
Ageusia	No presenta	31	44%
	Presenta	40	56%
Odinofagia	No presenta	32	45%
	Presenta	39	55%
Disnea	No presenta	49	69%
	Presenta	22	31%
Rinorrea	No presenta	23	32%
	Presenta	48	68%
Tos seca	No presenta	30	42%
	Presenta	41	58%
Tos productiva	No presenta	53	75%
	Presenta	18	25%
Taquicardia	No presenta	53	75%
	Presenta	18	25%
Taquipnea	No presenta	61	86%
	Presenta	10	14%
Vomito	No presenta	61	86%
	Presenta	10	14%
Dolor muscular	No presenta	20	28%
	Presenta	51	72%
Diarrea	No presenta	50	70%
	Presenta	21	30%
Dolor de cabeza	No presenta	30	42%
	Presenta	41	58%
Clasificación del caso	Sintomáticos	66	93%
	Asintomático	5	7%

Los análisis de frecuencia muestran que el 93% de los pacientes incluidos presentaron un cuadro sindrómico de infección respiratoria aguda leve o moderado (clasificados como sintomáticos). Específicamente, en relación con los síntomas, se observó que el dolor muscular representa el 72% de los síntomas reportados; El 68% reporta Anosmia y Rinorrea como síntomas asociados. Alrededor del 58% reportaron Ageusia, Odinofagia, tos seca y dolor de cabeza. Solo el 45% de los pacientes reportaron fiebre.



Tabla 2. Anexo 1. Características clínicas ajustadas por el resultado para COVID-19.

SINTOMAS		COVID-19			
		Negativo		Positivo	
		n	%	n	%
Fiebre	No presenta	23	59%	16	41%
	Presenta	17	53%	15	47%
Anosmia <i>p=0,000*</i>	No presenta	21	91%	2	9%
	Presenta	19	40%	29	60%
Ageusia	No presenta	21	68%	10	32%
	Presenta	19	48%	21	53%
Odinofagia	No presenta	16	50%	16	50%
	Presenta	24	62%	15	38%
Disnea	No presenta	26	53%	23	47%
	Presenta	14	64%	8	36%
Rinorrea	No presenta	16	70%	7	30%
	Presenta	24	50%	24	50%
Tos seca	No presenta	19	63%	11	37%
	Presenta	21	51%	20	49%
Tos productiva <i>p= 0,023*</i>	No presenta	34	64%	19	36%
	Presenta	6	33%	12	67%
Taquicardia	No presenta	32	60%	21	40%
	Presenta	8	44%	10	56%
Taquipnea	No presenta	35	57%	26	43%
	Presenta	5	50%	5	50%
Vomito	No presenta	34	56%	27	44%
	Presenta	6	60%	4	40%
Dolor muscular	No presenta	14	70%	6	30%
	Presenta	26	51%	25	49%
Diarrea	No presenta	28	56%	22	44%
	Presenta	12	57%	9	43%
Dolor de cabeza	No presenta	15	50%	15	50%
	Presenta	25	61%	16	39%
Clasificación del caso	Sintomático	35	53%	31	46%
	Asintomático	5	100%	0	0%

prueba de chi-cuadrado $p < 0.05$

Los análisis de frecuencia muestran que el 60% y 53% de los pacientes con afectación del olfato y el gusto, respectivamente, fueron positivos para COVID-19. El 67% de los pacientes con tos productiva también resultaron positivos.



Con las variables: Anosmia y tos productiva se encontró una asociación estadísticamente significativa entre presentar el síntoma y resultar positivo para SARS-CoV-2.

Al analizar el comportamiento de los resultados de la PCR de los pacientes asintomáticos, estos fueron negativos para COVID-19. Todas las muestras fueron tomadas entre 5-7 días después de reportar el contacto estrecho no protegido con algún caso confirmado (social o laboral) para SARS-CoV-2. (ver tabla 2 anexo 2.)

Tabla 2. Anexo 2. Nexo epidemiológico en los pacientes asintomáticos incluidos en el estudio.

Pacientes asintomáticos	Días desde último contacto	Tipo de nexo epidemiológico
M1E33277MFN	7	Conyugue
M1I33227MFN	5	Social
M1I33255MFN	5	Laboral
M1O33152MFN	7	Social
M1O33218MFN	7	Novio

Tabla 3. Descripción de los valores de Ct obtenidos en las muestras de aspirado nasofaríngeo con el kit de RT-qPCR Allplex 2019-nCoV.

Gen (Ct)	Media \pm (DS)	Mediana (RIQ)	Min-Max
E (n=30)	17.36 (5.76)	16.18 (13.17 - 19.68)	11.39 - 38.87
RdRP (n=29)	18.04 (4.08)	17.25 (15.17 - 20.81)	12.62 - 32.64
N (n=31)	20.07 (6.10)	18.70 (15.49 - 21.92)	13.07 - 38.40

Tabla 4. Descripción de los valores de Ct obtenidos en las muestras de saliva con el kit de RT-qPCR Allplex 2019-nCoV.

Gen (Ct)	Media \pm (DS)	Mediana (RIQ)	Min-Max
E (n=29)	25.84 (5.86)	26.51 (21.96 - 30.25)	12.60 - 36.38
RdRp (n=28)	27.16 (5.92)	28.99 (22.88 - 31.95)	13.16 - 34.18
N (n=29)	27 (5.49)	28.64 (23.14 - 30.88)	13.07 - 33-80



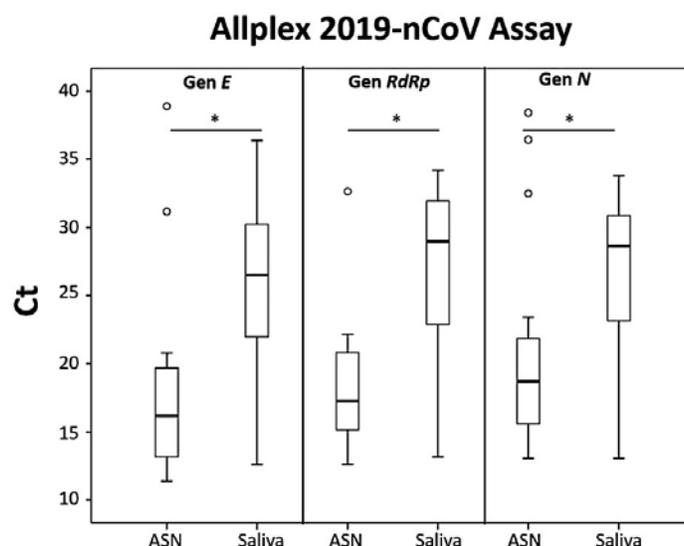


Figura 1. Valores de Ct para los genes E, RdRp y N según el tipo de muestra con la prueba ALLPLEX 2019-nCoV Assay. Prueba de Wilcoxon * $p < 0.05$ (ASN=Aspirado Nasofaríngeo)

En los resultados expuestos en las tablas 3 y 4 se observa una diferencia aproximada de 8 ciclos entre las medias de los diferentes genes incluidos en la prueba de RT-qPCR Allplex 2019-nCoV (ver Figura 1), observándose de esta manera una amplificación más tardía en las muestras de saliva, lo cual podría estar relacionado con una recuperación de ARN viral ligeramente menor, sin embargo, se observaron altos niveles de concordancia entre los diagnósticos obtenidos (positivo o negativo).

Tabla 5. Descripción de los valores de Ct obtenidos en las muestras de ASN con la prueba RT-qPCR ASCIRES SG Kit

Gen (Ct)	Media \pm (DS)	Mediana (RIO)	Min-Max
ORF1ab (RdRp)(n=27)	20.40 (4.43)	20.62 (18.12 - 23.10)	12.39 - 33.68
ORF1a (n=29)	20,57(4.75)	20.85 (17.88 - 23.07)	12.69 - 37.65

Tabla 6. Descripción de los valores de Ct obtenidos en las muestras de saliva con la prueba RT-qPCR ASCIRES SG Kit.

Gen (Ct)	Media \pm (DS)	Mediana (RIO)	Min-Max
ORF1ab (RdRp)(n=26)	26.41 (4.59)	27.83 (22.90 - 29.91)	15.10 - 33.12
ORF1a (n=29)	26.67 (5.38)	27.52 (23.47 - 29.41)	14.78 - 37.85



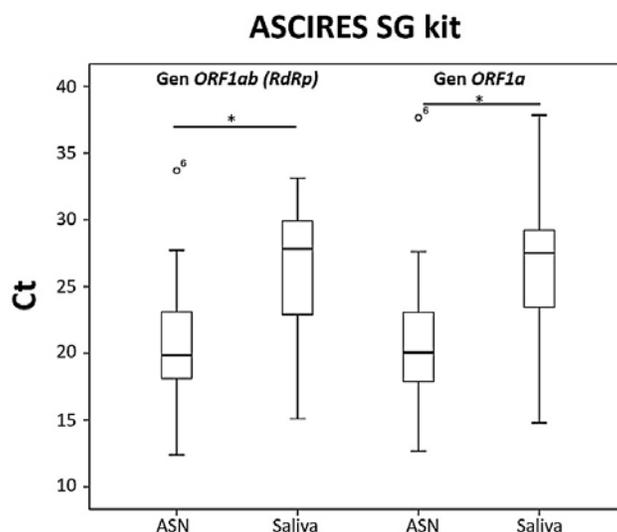


Figura 2. Valores de Ct para los genes E, RdRp y N según el tipo de muestra con la prueba ALLPLEX 2019-nCoV Assay. Prueba de Wilcoxon * $p < 0.05$ (ASN=Aspirado Nasofaríngeo)

En los resultados expuestos en las tablas 4 y 5 se observa una diferencia aproximada de 6 ciclos entre las medias de los diferentes genes incluidos en la prueba de RT-qPCR ASCIREs SG Kit (ver Figura 2), de manera similar a los resultados anteriores, se observa una amplificación más tardía en las muestras de saliva, lo cual podría estar relacionado con una recuperación de ARN viral ligeramente menor, no obstante, los niveles de concordancia entre los diagnósticos obtenidos son muy altos (99%).

Adicionalmente, se compararon los resultados en las muestras de saliva para el gen confirmatorio ORF1ab/RdRp en las pruebas ALLPLEX 2019-nCoV Assay y RT-qPCR ASCIREs SG Kit (ver figura 3). En este análisis, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de ambos resultados, mostrando una correlación muy alta en el rendimiento diagnóstico de ambas pruebas al emplear la saliva.

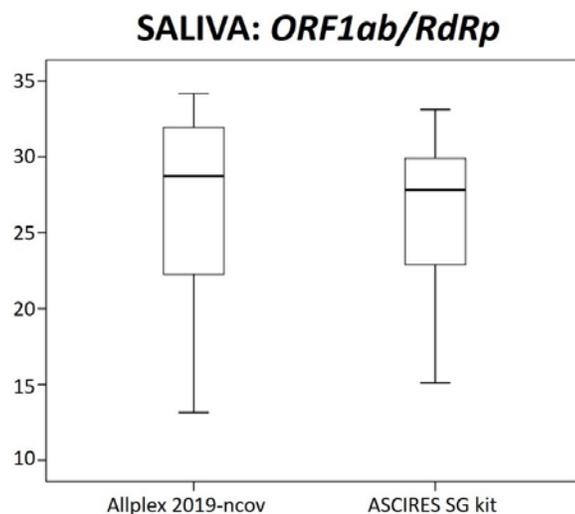


Figura 3. Valores de Ct para el gen confirmatorio ORF1ab (RdRp) en saliva con las pruebas ALLPLEX 2019-nCoV Assay y RT-qPCR ASCIREs SG Kit.



ANÁLISIS DE CONCORDANCIA Y DESEMPEÑO DIAGNOSTICO

Tabla 6. Tabla de contingencia con la comparación de los resultados obtenidos en ASN y Saliva con la prueba RT-qPCR Allplex 2019-nCoV. Índice Kappa de cohen=0.94

CÁLCULO ÍNDICE KAPPA DE COHEN			
Muestra a verificar: SALIVA	Muestra comparación: ASN		Total
	Positivo	Negativo	
POSITIVO	29	0	29
NEGATIVO	2	40	42
TOTAL	31	40	71

Al analizar los resultados obtenidos en la evaluación de la concordancia analítica, la muestra de saliva obtuvo un porcentaje de concordancia del 97% con un índice Kappa "Muy bueno", al compararse con los resultados obtenidos con aspirados nasofaríngeos (muestra de referencia) de pacientes con resultados tanto Positivos como Negativos por la prueba Allplex 2019-nCoV Assay.

Tabla 7. Tabla de contingencia con la comparación de métodos de RT-qPCR entre Allplex 2019-nCoV con ASN y RT-qPCR ASCIRES SG Kit con ASN. Índice Kappa de cohen=0.94

CÁLCULO ÍNDICE KAPPA DE COHEN			
Muestra a verificar: RT-qPCR ASCIRES SG Kit en ASN	Método y muestra de comparación: Allplex 2019-nCoV Assay en ASN		Total
	Positivo	Negativo	
POSITIVO	29	0	29
NEGATIVO	2	40	42
TOTAL	31	40	71

Al analizar los resultados obtenidos en la evaluación de la concordancia analítica, la prueba RT-qPCR ASCIRES SG Kit obtuvo un porcentaje de concordancia del 97% con un índice Kappa "Muy bueno", al comparar aspirados nasofaríngeos de pacientes con resultados tanto positivos como negativos por la prueba Allplex 2019-nCoV Assay (prueba de referencia).

Tabla 8. Tabla de contingencia con la comparación de los resultados obtenidos en ASN y Saliva con la prueba RT-qPCR ASCIRES SG Kit. Índice Kappa de cohen=0.97 (Casi perfecto)

CÁLCULO ÍNDICE KAPPA DE COHEN			
Muestra a verificar: SALIVA	Muestra comparación: ASN		Total
	Positivo	Negativo	
POSITIVO	28	0	28
NEGATIVO	1	42	43
TOTAL	29	42	71



Al analizar los resultados obtenidos en la evaluación de la concordancia analítica, la muestra de saliva obtuvo un porcentaje de concordancia del 99% con un índice Kappa "Muy bueno", al compararse con los resultados obtenidos con aspirados nasofaríngeos (muestra de referencia) de pacientes con resultados tanto Positivos como Negativos por la prueba RT-qPCR ASCIRES SG Kit.

Tabla 9. Tabla de contingencia con la comparación de métodos de RT-qPCR entre Allplex 2019-nCoV con ASN y RT-qPCR ASCIRES SG Kit con saliva. Índice Kappa de cohen=0.91 (Casi perfecto)

CÁLCULO ÍNDICE KAPPA DE COHEN			
Método y muestra a verificar: RT-qPCR ASCIRES SG Kit en SALIVA	Método y muestra de comparación: Allplex 2019-nCoV Assay en ASN		Total
	Positivo	Negativo	
POSITIVO	28	0	28
NEGATIVO	3	40	43
TOTAL	31	40	71

Al analizar los resultados obtenidos en la evaluación de la concordancia analítica, la prueba RT-qPCR ASCIRES SG Kit obtuvo un porcentaje de concordancia del 96% con un índice Kappa "Muy bueno" empleando como muestra saliva, al comparar aspirados nasofaríngeos de pacientes con resultados tanto positivos como negativos por la prueba Allplex 2019-nCoV Assay (muestra y prueba de referencia). En este caso, se obtiene una sensibilidad del 90%

Tabla 10. Características de desempeño y concordancia diagnóstica de las pruebas evaluadas.

Prueba y muestra de referencia: Allplex 2019-nCoV en ASN					
Prueba	Muestra	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
RT-qPCR Allplex 2019-nCoV	Saliva	94% (IC95%: 85%-100%)	100% (IC 95%: 100%)	100%	95%
RT-qPCR ASCIRES SG Kit	Saliva	97% (IC95%: 90%-100%)	100% (IC 95%: 100%)	100%	93%
RT-qPCR ASCIRES SG Kit	ASN	94% (IC95%: 85%-100%)	100% (IC 95%: 100%)	100%	95%

En cuanto a los criterios de exactitud diagnóstica, se obtuvo una Sensibilidad entre 94% y 97% y Especificidad del 100%, cumpliendo con el lineamiento vigente del Ministerio de Salud y Protección Social, el cual exige un desempeño mínimo del 85% de Sensibilidad y 95% de Especificidad para que la prueba pueda ser empleada como diagnóstico para SARS-CoV-2 (Covid19).



Tabla 11. Descripción de los valores de CT obtenidos en las muestras no concordantes en el diagnóstico.

Allplex 2019-nCoV en Assay								RT-qPCR A SCIRES SG Kit					
Tipo de muestra:ASN	E	RdRP	N	Tipo de muestra:SALIVA	E	RdRP	N	Tipo de muestra:ASN	Orf1a	Orf1ab (RdRp)	Tipo de muestra:SALIVA	Orf1a	Orf1ab (RdRp)
*POSITIVO	-	-	38.4	NEGATIVO	-	-	-	NEGATIVO	-	-	NEGATIVO	-	-
**POSITIVO	38.9	-	36.4	NEGATIVO	-	-	-	NEGATIVO	-	-	NEGATIVO	-	-
***POSITIVO	19.7	21.1	21.4	POSITIVO	36	-	33.8	POSITIVO	22.2	22.3	NEGATIVO	-	-

*Paciente 1, **Paciente 2, **Paciente 3

En la tabla 11 se observa que las muestras no concordantes #1 y 2 tienen un CT tardío (>35) en los genes evaluados con la muestra de ASN y la prueba de referencia ALLPLEX 2019-nCoV Assay, los cuales generalmente no son reproducibles incluso procesando desde la misma matriz y por metodologías diferentes; por su parte la muestra #3 correspondiente al ASN, presento CTs entre 19 y 21 en todos los genes evaluados con el kit de Allplex 2019-nCoV, este resultado fue coherente con los obtenidos al procesar el ASN con el kit ASCIRES SG, y aunque la muestra de saliva tiene un resultado positivo con el kit de Allplex 2019-nCoV con CTs muy alargados (Gen E: 36.4, Gen N: 33.80), el resultado obtenido al procesar la saliva con el Kit ASCIRES SG es negativo, lo cual puede estar relacionado con la toma de la muestra por estimulación insuficiente de las glándulas salivales o por no haber seguido las instrucciones de la toma de la muestra y por consiguiente no se obtiene una carga viral suficiente en saliva para ser detectada. (ver características clínicas tabla 12)

Tabla 12. Características clínicas de los pacientes con resultados no-concordantes

	Síntomas	Días de evolución	Nexo epidemiológico
Paciente 1 (M1Q33090MFN)	Cefalea, odinofagia, rinorrea, mialgias, tos seca y malestar general.	3	SI
Paciente 2 (M1P33138MFN)	Anosmia, odinofagia, rinorrea, adinamia, tos seca, fiebre y malestar general.	4	NO
Paciente 3 (M1R33295MFN)	Anosmia, ageusia, cefalea, odinofagia, rinorrea, adinamia, tos seca, fiebre, dolor muscular.	4	SI

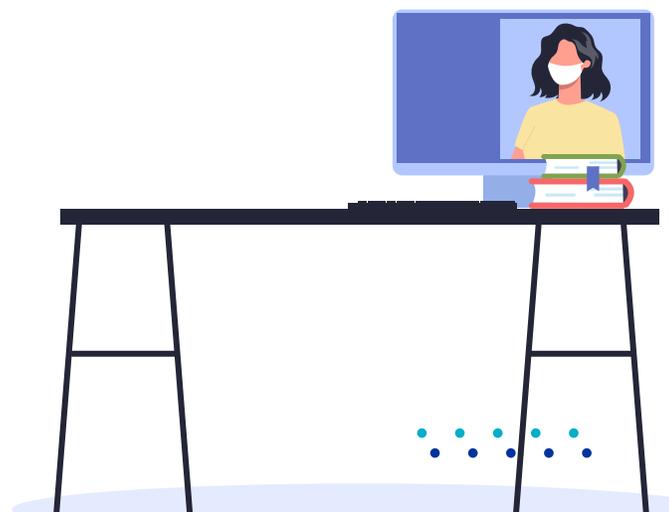


Tabla 13. Comparación entre el uso de las muestras de saliva y nasofaríngeas para el diagnóstico de COVID-19.

	Muestras de saliva	Muestras nasofaríngeas
Toma de muestra	<ul style="list-style-type: none"> · Auto-recolección · No-invasiva · Facilidad, rapidez y comodidad en su obtención · Kit para recolectar la saliva: frasco de recolección y medio de transporte. · Mejora los tiempos de espera. 	<ul style="list-style-type: none"> · Requiere personal de salud calificado y entrenado. · Invasiva · Requiere de una preparación previa del paciente. Métodos dolorosos e incómodos para el paciente · Requiere de múltiples elementos como: hisopos, sondas, medio de transporte adecuado, solución salina, EPP. · Es un proceso lento y laborioso.
Ambiente de toma de muestra	<ul style="list-style-type: none"> · Extrahospitalario. 	<ul style="list-style-type: none"> · Centros de atención primaria, Sede de toma de muestra y centros hospitalarios
Complicaciones	<ul style="list-style-type: none"> · Ninguna reportada 	<ul style="list-style-type: none"> · Sangrado, desgarros, y hematomas.
Contraindicaciones	<ul style="list-style-type: none"> · Ninguna reportada 	<ul style="list-style-type: none"> · Se debe evitar en pacientes con epistaxis frecuente y sangrados nasales severos previos, traumatismos nasales o cirugía reciente.
Transmisión nosocomial	<ul style="list-style-type: none"> · Bajo riesgo 	<ul style="list-style-type: none"> · Alto riesgo.
Detección en PCR	<ul style="list-style-type: none"> · Pacientes sintomáticos con una toma de muestra hasta 10 días desde el inicio de los síntomas. 	<ul style="list-style-type: none"> · Recomendada hasta el día 11 de inicio de síntomas.

EPP: Elementos de protección personal

IMPACTO ESPERADO

- Tener disponible una metodología de PCR en tiempo real adicional para la detección de SARS-CoV-2 en muestras respiratorias en Ayudas Diagnósticas SURA.
- Tener disponible una toma de muestra con una mejor experiencia del paciente: cómoda, rápida y segura.
- Optimizar recursos técnicos y en talento humano, disminuyendo el gasto asociado a los métodos actualmente empleados como aspirado/hisopado nasofaríngeo.
- Extender y masificar la recolección de muestras fuera de centros hospitalarios y centros de atención primaria.



CONCLUSIONES

- El 93% (n=66) de los pacientes evaluados presentaron algún síntoma relacionado con COVID-19 (pacientes sintomáticos), de los cuales el 53% (n=35) resultaron negativos para SARS-CoV-2 y el 46% (n=31) positivos para SARS-CoV-2. Cabe resaltar que en 28 de los resultados positivos se obtuvo un CT menor a 25.
- El 7% (5) de los pacientes evaluados no presentaron ningún síntoma relacionado con COVID-19. Ninguno de ellos resultó para positivo para SARS-CoV-2 por las metodologías empleadas.
- La concordancia en la interpretación diagnóstica en la muestra de Aspirado Nasofaríngeo (ASN) con la prueba RT-qPCR ASCIRES SG Kit usando como prueba de referencia el kit Allplex 2019-nCoV fue casi perfecta, dada por un índice kappa de 0.94, lo que nos indica que la prueba RT-qPCR ASCIRES SG puede ser utilizada en la detección de SARS-CoV-2 con muestras respiratorias en ayudas Diagnósticas SURA.
- Se obtuvo una sensibilidad del 94% (IC95%: 85%-100%) y una especificidad del 100% (IC 95%: 100%) con la prueba RT-qPCR ASCIRES SG Kit empleando como muestra aspirados nasofaríngeos. Los resultados fueron concordantes con el desempeño diagnóstico reportado por los fabricantes e indica un desempeño satisfactorio del método, de acuerdo con los estándares mínimos de sensibilidad y especificidad de 85% y 95% establecidos por el INS en el documento: Lineamientos para el uso de pruebas en el Laboratorio de Salud Pública (LSP) en el marco de la emergencia sanitaria por COVID-19 en Colombia.
- La concordancia en la interpretación diagnóstica entre las muestras de saliva y Aspirado Nasofaríngeo (ASN) con la prueba RT-qPCR Allplex 2019-nCoV y RT-qPCR ASCIRES SG Kit fue casi perfecta, dada por un índice Kappa de 0.97 y 0.91, respectivamente, lo que nos indica que la saliva es un tipo de muestra adecuado para la identificación de SARS-CoV-2 por RT-qPCR.
- Se obtuvo una sensibilidad del 94% (IC95%: 85%-100%) y 97% (IC95%: 90%-100%) para las pruebas RT-qPCR Allplex 2019-nCoV y RT-qPCR ASCIRES SG Kit, respectivamente y una especificidad del 100% (IC 95%: 100%) para ambas técnicas empleando saliva como muestra. Los resultados fueron concordantes con el desempeño diagnóstico reportado por los fabricantes e indica un desempeño satisfactorio del método, de acuerdo con los estándares mínimos de sensibilidad y especificidad de 85% y 95% establecidos por el INS en el documento: Lineamientos para el uso de pruebas en el Laboratorio de Salud Pública (LSP) en el marco de la emergencia sanitaria por COVID-19 en Colombia.



- Los resultados de esta verificación demuestran el desempeño satisfactorio y la capacidad diagnóstica de los métodos con muestras de saliva y de la prueba RT-qPCR ASCIRES SG Kit con muestras respiratorias para ser implementados en el laboratorio de Biología Molecular de Ayudas Diagnósticas Sura para la detección de SARS-CoV-2.
- Las medias de los valores de Ct obtenidos para todos los genes blanco de SARS-CoV-2 en las muestras de saliva fueron mayores (diferencias estadísticamente significativas, estadístico de Wilcoxon $p < 0.05$) en comparación con los obtenidos en los Aspirados Nasofaríngeos.
- Se obtuvieron 3 muestras (pacientes sintomáticos) no concordantes dentro del estudio, que se podrían explicar por una toma de la muestra con estimulación insuficiente de las glándulas salivales o por no haber seguido las instrucciones de la toma de la muestra por parte del paciente y por consiguiente no se obtiene una carga viral suficiente en saliva para ser detectada, esto evidenciado en dos de las tres muestras que tuvieron un Ct tardío > 36 .
- El proceso de recolección de la muestra de saliva se debe realizar siguiendo estrictamente las recomendaciones del medio de recolección, ya que un proceso inadecuado puede afectar la integridad de la muestra, influyendo en los resultados finales.
- La muestra de saliva es una alternativa importante para la detección del SARS-CoV-2, con una alta concordancia al compararse con muestras respiratorias en pacientes sintomáticos en las pruebas de RT-qPCR. La toma de muestra de Saliva no se requiere procedimientos invasivos, ni personal especializado y altamente equipado, por lo tanto, presentan ventajas muy importantes relacionadas con la simplificación y comodidad de la toma de muestra, la disminución de exposición a contagios en el personal de salud o para el paciente al tener de asistir a centros de atención primaria para su realización permitiendo la auto-toma y la disminución de costos.
- Con los resultados obtenidos en este estudio de verificación, se evidencia que la muestra de saliva puede ser empleada en el diagnóstico de SARS-CoV-2 en pacientes sintomáticos con o sin nexa epidemiológico.
- Es muy importante considerar la posibilidad de realizar estudios complementarios donde se pueda analizar a profundidad el desempeño de este tipo de muestra en pacientes asintomáticos o con síntomas superiores a los 10 días de evolución empleando la técnica RT-PCR.
- Gracias a la facilidad de su obtención, las muestras de saliva son ideales para el diagnóstico en población pediátrica, adultos mayores y pacientes con restricciones especiales por antecedentes de obstrucción nasal o epistaxis.



BIBLIOGRAFIA

1. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [published correction appears in *Lancet*. 2020 Jan 30;:]. *Lancet*. 2020;395(10223):497-506. doi:10.1016/S0140-6736(20)30183-5
2. Mürbe D, Kriegel M, Lange J, Schumann L, Hartmann A, Fleischer M. Aerosol emission of adolescents voices during speaking, singing and shouting. *PLoS One*. 2021;16(2):e0246819. Published 2021 Feb 10. doi:10.1371/journal.pone.0246819
3. Jayaweera M, Perera H, Gunawardana B, Manatunge J. Transmission of COVID-19 virus by droplets and aerosols: A critical review on the unresolved dichotomy. *Environ Res*. 2020;188:109819. doi:10.1016/j.envres.2020.109819
4. Organización Mundial de la Salud. "WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard". Disponible en: <https://covid19.who.int/>
5. Ana Laura GO, Abraham Josué NR, Briceida LM, et al. Sensitivity of the Molecular Test in Saliva for Detection of COVID-19 in Pediatric Patients With Concurrent Conditions. *Front Pediatr*. 2021;9:642781. Published 2021 Apr 12. doi:10.3389/fped.2021.642781
6. Wong SCY, Tse H, Siu HK, et al. Posterior Oropharyngeal Saliva for the Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clin Infect Dis*. 2020;71(11):2939-2946. doi:10.1093/cid/ciaa797
7. Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579(7798):270-273. doi:10.1038/s41586-020-2012-7
8. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*. 2003;426(6965):450-454. doi:10.1038/nature02145
9. Xu J, Li Y, Gan F, Du Y, Yao Y. Salivary Glands: Potential Reservoirs for COVID-19 Asymptomatic Infection. *J Dent Res*. 2020;99(8):989. doi:10.1177/0022034520918518
10. Xu H, Zhong L, Deng J, et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci*. 2020;12(1):8. Published 2020 Feb 24. doi:10.1038/s41368-020-0074-x
11. Liu L, Wei Q, Alvarez X, et al. Epithelial cells lining salivary gland ducts are early target cells of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection in the upper respiratory tracts of rhesus macaques. *J Virol*. 2011;85(8):4025-4030. doi:10.1128/JVI.02292-10
12. Chen L, Zhao J, Peng J, et al. Detection of SARS-CoV-2 in saliva and characterization of oral symptoms in COVID-19 patients. *Cell Prolif*. 2020;53(12):e12923. doi:10.1111/cpr.12923
13. Lee RA, Herigon JC, Benedetti A, Pollock NR, Denkinger CM. Performance of Saliva, Oropharyngeal Swabs, and Nasal Swabs for SARS-CoV-2 Molecular Detection: a Systematic Review and Meta-analysis. *J Clin Microbiol*. 2021;59(5):e02881-20. Published 2021 Apr 20. doi:10.1128/JCM.02881-20
14. Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU. FDA. Actualización sobre el coronavirus (COVID-19): La FDA autoriza la primera prueba de diagnóstico que utiliza la recolección de muestras de saliva en el hogar. 08/05/2020. FDA NEWS RELEASE.
15. Henrique Braz-Silva P, Pallos D, Gianecchini S, To KK. SARS-CoV-2: What can saliva tell us?. *Oral Dis*. 2021;27 Suppl 3:746-747. doi:10.1111/odi.13365
16. Sapkota D, Thapa SB, Hasséus B, Jensen JL. Saliva testing for COVID-19?. *Br Dent J*. 2020;228(9):658-659. doi:10.1038/s41415-020-1594-7



17. Chen L, Zhao J, Peng J, et al. Detection of SARS-CoV-2 in saliva and characterization of oral symptoms in COVID-19 patients. *Cell Prolif.* 2020;53(12):e12923. doi:10.1111/cpr.12923
18. To KKW, Yip CCY, Lai CYW, et al. Saliva as a diagnostic specimen for testing respiratory virus by a point-of-care molecular assay: a diagnostic validity study. *Clin Microbiol Infect.* 2019;25(3):372-378. doi:10.1016/j.cmi.2018.06.009
19. Kojima N, Turner F, Slepnev V, et al. Self-Collected Oral Fluid and Nasal Swab Specimens Demonstrate Comparable Sensitivity to Clinician-Collected Nasopharyngeal Swab Specimens for the Detection of SARS-CoV-2 [published online ahead of print, 2020 Oct 19]. *Clin Infect Dis.* 2020;ciaa1589. doi:10.1093/cid/ciaa1589
20. Wyllie AL FJ, et al. Saliva is more sensitive for SARS-CoV-2 detection in COVID-19 patients than nasopharyngeal swabs. *MedRxiv* 2020.04.16.20067835; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.16.20067835>. [Epub ahead of print: 22 Apr 2020]
21. To KK, Tsang OT, Leung WS, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2020;20(5):565-574. doi:10.1016/S1473-3099(20)30196-1
22. Williams E, Bond K, Zhang B, Putland M, Williamson DA. Saliva as a Noninvasive Specimen for Detection of SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol.* 2020;58(8):e00776-20. Published 2020 Jul 23. doi:10.1128/JCM.00776-20
23. Azzi L, Carcano G, Gianfagna F, et al. Saliva is a reliable tool to detect SARS-CoV-2. *J Infect.* 2020;81(1):e45-e50. doi:10.1016/j.jinf.2020.04.005
24. Pasomsab E, Watcharananan SP, Boonyawat K, et al. Saliva sample as a non-invasive specimen for the diagnosis of coronavirus disease 2019: a cross-sectional study. *Clin Microbiol Infect.* 2021;27(2):285.e1-285.e4. doi:10.1016/j.cmi.2020.05.001
25. Alvina C et al. Saliva as a Reliable Sample for COVID-19 Diagnosis in Paediatric Patients. *medRxiv* 2021.03.29.21254566; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.03.29.21254566>. Marzo 2021.
26. Tapia CV, Marcia C, Ivone M, et al. Performance of Saliva Samples for COVID-19 Diagnosis by Using the Allplex™ 2019-nCoV Assay Kit. *Front Med (Lausanne).* 2021;8:617399. Published 2021 Feb 24. doi:10.3389/fmed.2021.617399

Todos los derechos reservados. No se permite la reproducción total o parcial de ninguna parte de esta obra, ni su comercialización ni publicación en cualquier medio, sin el permiso previo y escrito de SURA.

© **Propiedad Intelectual de Suramericana S.A., Noviembre del 2021.**



SURA



Descarga nuestra **App Seguros SURA** disponible en:  

Línea de atención 01 8000 518 888

Bogotá 601437 88 88

Cali 602437 88 88

Medellín 604437 88 88

Celular #888