



**Universidad de Concepción
Facultad Farmacia**

VALIDACIÓN DE LA DETECCIÓN DE SARS-COV- 2 MEDIANTE RT-PCR EN TIEMPO REAL UTILIZANDO MUESTRA DE SALIVA

POR JUAN CARLOS PACHECO VIDAL

Trabajo de Investigación de Internado en Sector Salud presentado en la
Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción para optar al título
profesional de Bioquímico

Profesional Guía

BQ. Roxana Arriagada Torres
Director Técnico IC+ Medical Laboratorio Clínico
Los Ángeles

Profesor Patrocinante

Dr. Felipe Zúñiga Arbalti
Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología
Facultade de Farmacia
Universidad de Concepción
Concepción

Junio, 2023

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

© 2023, Juan Carlos Pacheco Vidal

A mi familia y a todos quienes me brindaron su apoyo.

ÍNDICE

ÍNDICE	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	ix
RESUMEN	x
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 COVID-19.....	1
Prevalencia mundial y local.....	2
1.2 SARS-CoV-2	2
1.3 Estrategias de detección y confirmación diagnóstica.....	5
RT-qPCR, Gold Standard.....	5
1.4 Toma de muestra	9
Muestra Hisopado nasofaríngeo.....	9
SalivaDirect™	9
1.5 Criterios de aceptabilidad	10
Sensibilidad	11
Especificidad	11
Valor predictivo positivo	11
Valor predictivo negativo.....	11
Precisión.....	12
1.6 Normativa legal.....	13
Tamaños mínimo muestral para la evaluación de desempeño diagnostico en una validación metodológica	14
Consideraciones para el uso de una metodología validada	15
Requisitos para la verificación	15
Ecuación del tamaño muestral	17
2 PROBLEMA	19
3 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	20
4 HIPÓTESIS.....	21

5 OBJETIVOS.....	22
5.1 Objetivo general.....	22
5.2 Objetivos específicos.....	22
6 METODOLOGÍA	23
6.1 Obtención de las muestras	23
6.2 Extracción de ARN.....	27
6.3 Amplificación del templado	32
Preparación del Mix Primers y Sondas.....	33
Mezcla de reacción	34
Configuración perfil térmico Agilent AriaMx	36
6.4 Interpretación de los resultados.....	38
7 VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA	40
7.1 Análisis de datos	40
Concordancia con análisis de referencia, test candidato SalivaDirect™	40
Calculo intervalos de confianza por el método de Clopper-Pearson.....	40
8 RESULTADOS	42
8.1 Implementación y validación de la toma de muestra según indicaciones de SalivaDirect™	42
Cálculo del N° de muestras necesarias para la validación	42
Capacitación del personal sanitario	44
8.2 Implementación y validación de la extracción de material genético según SalivaDirect™ ..	45
Extracción de ARN a partir de saliva	45
Otros resultados relacionados a la extracción de material genético.....	47
8.3 Verificación de la RT-qPCR según indicaciones de SalivaDirect™	49
Preparación mix primers y sondas, mezcla de reacción y uso de controles positivos	49
Obtención de los productos de PCR.....	50
8.4 Comparación de los criterios de aceptabilidad entre el método Gold Standard y el método SalivaDirect™	61
Tabla de concordancia o de contingencia.....	61
Tabla de intervalos de confianza de Clopper-Pearson.....	63
9 DISCUSIÓN	67
10 CONCLUSIONES.....	71

11 REFERENCIAS.....	73
12 ANEXOS	76
12.1 Anexo 1	76
12.2 Anexo 2	78
12.3 Anexo 3	79
12.4 Anexo 4	81

ÍNDICE DE TABLAS

1-1. Tabla de contingencia 2x2 para cálculo de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN.	12
1-2. Criterios de aceptabilidad para resultados de validación.	14
1-3. Tabla de contingencia 2x2 para validar una prueba candidata según criterio FDA.	17
6-1. Componentes del Mix Primers y Sondas.	33
6-2. Componentes mezcla de reacción.	35
6-3. Tabla tipo de resultados.	38
6-4. Interpretación de resultados en función del Ct.	39
8-1. Resultados del lote N° 2 de muestras positivas obtenidos por el termociclador Aria Mx.	51
8-2. Resultados positivos de la amplificación de SARS-CoV-2 (gen N de la nucleocápside, canal FAM, y el mensajero de la RNasa P humana, canal Cy5) en muestras obtenidas desde Hisopado nasofaríngeo mediante extracción manual y de Saliva.	54
8-3. Resultados negativos de la amplificación de SARS-CoV-2 (gen N de la nucleocápside, canal FAM, y el mensajero de la RNasa P humana, canal Cy5) en muestras obtenidas desde Hisopado nasofaríngeo mediante extracción manual y de Saliva.	55
8-4. Resultados positivos de la amplificación de SARS-CoV-2 (gen N de la nucleocápside, canal FAM, y el mensajero de la RNasa P humana, canal Cy5) en muestras obtenidas desde Hisopado nasofaríngeo mediante extracción manual y automática.	56
8-5. Resultados negativos de la amplificación de SARS-CoV-2 (gen N de la nucleocápside, canal FAM, y el mensajero de la RNasa P humana, canal Cy5) en muestras obtenidas desde Hisopado nasofaríngeo mediante extracción manual y automática.	57
8-6. Comparación de los resultados PCR positivos obtenidos de los métodos de extracción de ARN utilizados.	58
8-7. Resultados obtenidos de la RT-qPCR de Hisopado nasofaríngeo manual y de Saliva.	62
8-8. Resultados de sensibilidad y especificidad obtenidos usando MedCalc®.	64

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

1-1.	Representación digital de la ultraestructura de SARS-CoV-2.	3
1-2.	Sensibilidad analítica RT-qPCR.	7
6-1.	Interfaz de la configuración del perfil térmico de reacción del termociclador Agilent AriaMx.	37
7-1.	Parámetros estadísticos calculados por el software MedCalc®.	41
8-1.	Curva de amplificación de RT-qPCR correspondiente al lote N° 2: muestras 2,3,4 y 5, NTC, positivo y control de extracción.	52
8-2.	Curva de amplificación de RT-qPCR correspondiente al NTC (A1), al positivo (Pos), Al control de extracción (C-Ext) y a la muestra 2 (A2, A3, A4 y B1).	53

RESUMEN

La pandemia provocada por COVID-19 ha generado una enorme demanda de exámenes para detectar la enfermedad estableciendo una aguda falta de insumos para el diagnóstico RT-qPCR. Esta falta de insumos afecta principalmente las etapas de toma de muestra y extracción de ARN. Se suman las molestias que sufren los pacientes al hacerse el examen por Hisopado nasofaríngeo y el riesgo de contagio para el personal sanitario encargado de la toma de muestra que además debe mantener un ritmo acelerado para cubrir la demanda de exámenes.

Esto plantea la necesidad de buscar alternativas de diagnóstico que contemplen minimizar la complejidad operativa de la toma de muestra y del procedimiento de extracción de ARN. El método SalivaDirect™ propuesto por el Departamento de Microbiología de Enfermedades Microbianas de la Escuela de Salud Pública de Yale ofrece una alternativa al método convencional que usa muestras obtenidas por Hisopado nasofaríngeo. Se trata de una prueba simplificada de RT-qPCR para diagnóstico de COVID-19 que analiza la presencia de SARS-CoV-2 desde una muestra de saliva.

Para la implementación de esta técnica se estandariza la toma de muestra, la extracción de material genético y la amplificación de este por medio de RT-qPCR, posteriormente se determinan los Criterios de Aceptabilidad para evaluar el desempeño del protocolo. Este método se presenta como una alternativa segura, cómoda y fiable para la toma de muestras infecciosas por SARS-CoV-2 proveyendo resultados comparables a los obtenidos por las muestras de Hisopado nasofaríngeo evitándose los atascos provocados por la falta de insumos, brindando comodidad y confiabilidad a los pacientes además de seguridad adicional al personal clínico.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 COVID-19

La enfermedad por coronavirus de 2019, o COVID-19, es una enfermedad infecciosa provocada por el SARS-CoV-2 (Gorbalenya et al., 2020) responsable de la pandemia ocurrida entre marzo de 2020 y mayo de 2023 que afectó a gran parte los países y territorios del mundo (worldometers.info). Los primeros casos por COVID-19, informados en diciembre de 2019, se situaron en el mercado de Huanan en la ciudad de Wuhan, provincia de Hubei, China, donde se reportaron 41 personas con neumonía atípica. De las muestras obtenidas se pudo aislar el genoma de una nueva especie de coronavirus (Huang et al., 2020), denominado por la OMS como nCoV 2019. El 30 de enero de 2020 fue declarada por la OMS como una emergencia de salud pública de preocupación internacional y clasificada como pandemia el 11 de marzo del mismo año. El virus se propaga principalmente mediante aerosoles ($<5\ \mu\text{m}$) donde continúa siendo infectante en promedio hasta 3 horas, y puede permanecer estable en superficies, como plástico y acero inoxidable, incluso luego de 72 horas (N et al., 2020). Los síntomas asociados a la enfermedad según la OMS son: fiebre, tos, disnea, mialgia y fatiga, además de la pérdida parcial o total del gusto y el olfato

(anosmia). Los casos más graves pueden decaer a neumonía, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), sepsis y embolia pulmonar.

Prevalencia mundial y local

La prevalencia puntual en el mundo de COVID-19 para el 13 de septiembre de 2022 es de 509.835 nuevos casos, acumulando 7.538.649 nuevos casos en los últimos 14 días. Se estima alrededor de 8 millones de nuevos casos para los siguientes 14 días (news.google.com). Según datos oficiales del día 13 de septiembre de 2022 la prevalencia puntual en el país es de 1904 casos diarios con una positividad de 9.04% (Reporte diario del ministerio de Salud), además, se mantienen 15.603 casos activos a nivel nacional.

1.2 SARS-CoV-2

El coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo o SARS-CoV-2 por sus siglas en inglés, Severe Acute Respiratory Síndrome Coronavirus 2, es el patógeno responsable de la actual pandemia por COVID-19 que afecta a gran parte del mundo (Gómez-Carballa et al., 2020). Es de origen zoonótico y su principal reservorio son los murciélagos. Puede infectar ganado, aves, ratones, y seres humanos afectando una gran variedad de tejidos, principalmente el

respiratorio, hepático y nervioso central (Pasomsub et al., 2021)(Yadav & Saxena, 2020). Es, junto al SARS-CoV y al MERS-CoV, el tercer coronavirus en generar una enfermedad infecciosa en lo que va del siglo XXI.

SARS CoV-2 forma parte del género betacoronavirus perteneciente a la clase IV en la clasificación de Baltimore. Se caracteriza por tener una envoltura lipoproteica que en su interior contienen un genoma de tipo ARN monocatenario de polaridad positiva (Rehman et al., 2020), mismo tipo que el ARN mensajero (ARNm).

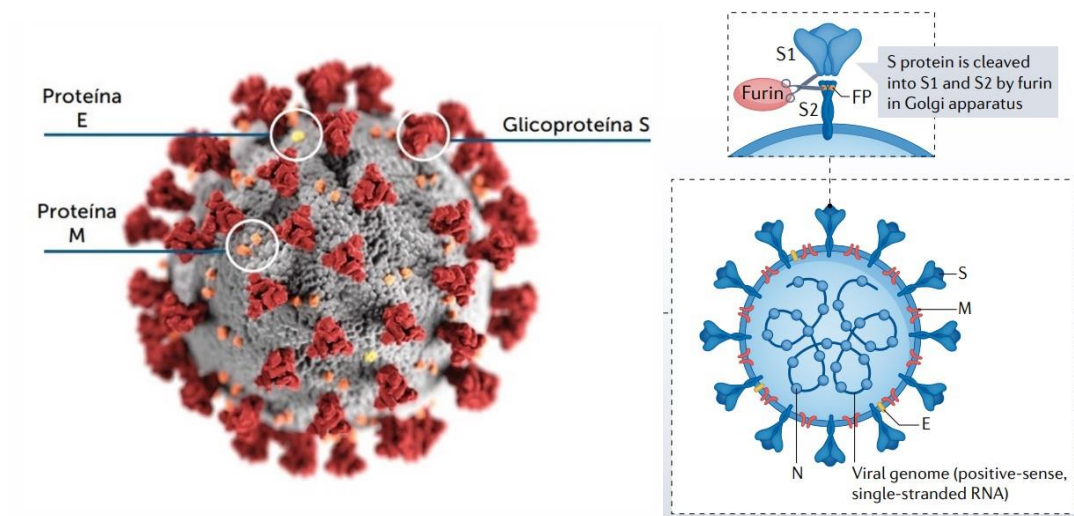


Figura 1. Representación digital de la ultraestructura de SARS CoV-2 (Jackson et al., 2022).

El virión posee un genoma de unos 30 kb que codifica para la poliproteína no estructural (ORF1a/b) que luego de clivaje proteolítico da lugar a dos clases de proteínas, cuatro **proteínas estructurales**: la glicoproteína de superficie (glicoproteína S o *Spike*), la proteína de envoltura (proteína E), la glicoproteína de membrana (glicoproteína M) y la proteína de la nucleocápside (proteína N)(Figura1), y ocho **proteínas funcionales**, entre ellas la ARN polimerasa (Dabanch, 2021). El mecanismo de infección de SARS CoV-2 está mediado por la glicoproteína S la cual tiene una afinidad por la ECA-2 de entre 10 a 20 veces mayor que la expresada por SARS-CoV-1 (Samsudin, 2020). El 83% de las células que expresan la ECA-2 forman parte del epitelio alveolar tipo II (Zhou et al., 2021) cuya función fisiológica es la difusión de gases a través de los neumocitos tipo II. SARS-CoV-2 usa a la ECA-2 como receptor y mecanismo de ingreso para infectar a células bronquiales ciliadas y a neumocitos tipo II (Yadav & Saxena, 2020). La expresión conjunta en la membrana celular de la ECA-2 y de la serina proteasa TMPRSS2 hace efectiva la fusión de ambas membranas (Hoffmann et al., 2020). Ya en el citoplasma comienza el proceso de reclutamiento de la maquinaria molecular, principalmente ribosomas, para comenzar con la traducción del ARN viral a proteínas virales y a la creación de nuevos viriones.

Estudios relacionados con la distribución y expresión de la ECA-2 en distintos tejidos del cuerpo humano, destacan su presencia en tejidos del sistema renal,

cardiovascular, gastrointestinal y pulmonar (Pascolo et al., 2020), además, se ha descrito la presencia de ECA-2 en tejidos de la cavidad oral, en células epiteliales de las glándulas salivales y en células epiteliales de la lengua (Soto, 2020).

1.3 Estrategias de detección y confirmación diagnóstica

Existe gran variedad de métodos para la detección y confirmación diagnóstica de COVID-19, destacan las pruebas serológicas (anticuerpos), las pruebas moleculares (PCR) y las pruebas de antígenos (Ag). Los métodos varían en sensibilidad analítica, complejidad, rapidez diagnóstica y costos. La PCR, por su sensibilidad y especificidad, es el Gold Standard para la detección y diagnóstico de COVID-19 (Gonçalves et al., 2021), sin embargo, su velocidad diagnóstica es muy lenta comparada con las pruebas rápidas de antígenos, generalmente se informan los resultados de un día para otro (PCR) versus 20 minutos (Ag), por lo que su capacidad para efectuar búsqueda activa de casos (BAC) es limitada.

RT-qPCR, Gold Standard

La PCR es una técnica utilizada en biología molecular que consiste en realizar copias de un segmento de ADN purificado. La amplificación se hace en un

termociclador donde unos pocos fragmentos de ADN se replican obteniéndose millones o miles de millones de copias. Desarrollada en la década de los ochentas, la PCR se fundamenta en la enzima Taq polimerasa, enzima codificada en el genoma de la bacteria extremófila *Thermus aquaticus* (Mullis & Kyle, 2002), la que posee características termoestables que le permiten una temperatura óptima de funcionamiento entre 75 y 80 °C y una vida media de 40 minutos a 95 °C (Lawyer et al., 1993). La RT-qPCR es un complemento a la PCR tradicional, agrega una etapa de transcripción reversa previa a la amplificación. La transcripción reversa se hace con otra enzima, la Retrotranscriptasa, esta toma fragmentos de ARN y los transcribe a ADN complementario (ADNc) el que luego es amplificado.

La PCR es altamente sensible y específica por lo que los resultados obtenidos poseen un alto rendimiento. En comparación con las otras técnicas de diagnóstico de SRAS-CoV-2, su sensibilidad analítica ofrece una ventana temporal mucho mayor en cuanto al límite de detección (Figura 2), lo cual es ideal para brindar diagnóstico temprano.

El límite de detección se define como la concentración del elemento que producirá un coeficiente de la señal/ruido de 3. Así, el límite de detección considera la amplitud de la señal y el ruido de la línea de fondo. Además, existe el límite de cuantificación que se define como la cantidad más pequeña de un

analito que puede ser cuantificada confiablemente por un instrumento, por ello, se establece la cuantificación como la señal para una concentración igual a 10 veces la desviación estándar del blanco.

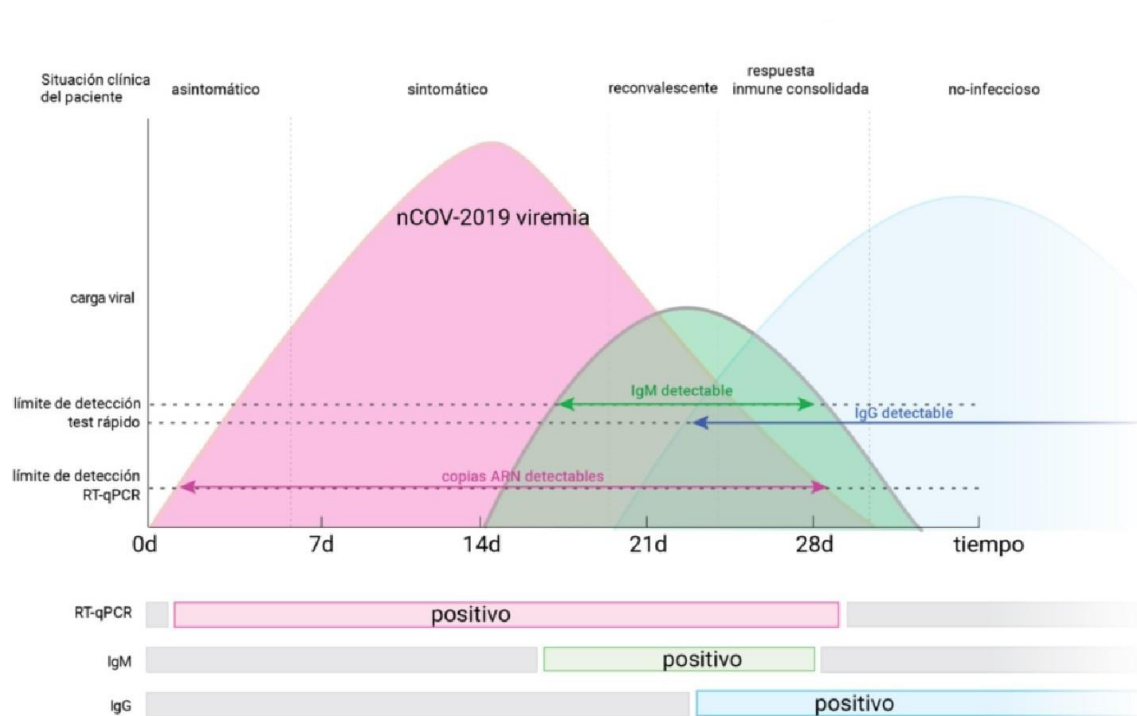


Figura 2. Sensibilidad analítica RT-qPCR (Langa et al., 2021).

Correlación entre la carga viral durante la infección por SARS-CoV-2. Se describe el proceso clínico y el resultado positivo de ensayo RT-qPCR y las pruebas serológicas. Destaca la alta sensibilidad de la prueba RT-qPCR.

La evaluación del límite de detección para los reactivos e instrumentos disponibles para el estudio está detallada en Emergency Use Authorization (EUA) Summary SARS-CoV RT-PCR Assay (Кыскова & Немкова, 2021), donde se verificó el límite de detección del termociclador Agilent AriaMX en 6 copias/μl.

La **carga viral** indica la concentración estimada de copias virales presentes en una muestra, lo que se relaciona directamente con las distintas etapas de la enfermedad. En un estudio realizado con 80 pacientes (Pan et al., 2020) determinó que la carga viral puede oscilar entre 650 copias/ml y 1.34×10^{11} copias/ml, esta última correspondiente a un paciente con una carga viral muy elevada y que murió a los 8 días desde la aparición de los síntomas. La carga viral más baja correspondía a dos individuos con antecedentes de exposición a pacientes infectados por SARS-CoV-2 y que mostraron resultados positivos un día antes de presentar síntomas, lo que revela que las personas infectadas pueden ser infecciosas antes de mostrar síntomas.

1.4 Toma de muestra

Muestra Hisopado nasofaríngeo

Esta muestra es extraída desde la región nasofaríngea a través de las fosas nasales con la ayuda de un hisopo. El objetivo del procedimiento es obtener células superficiales del epitelio respiratorio que presenten el virus.

SalivaDirect™

Es una prueba simplificada de RT-qPCR para la detección de SARS-CoV-2 a partir de una muestra de saliva. Este protocolo cuenta con el permiso de la FDA por medio de la Autorización de Uso de Emergencia (Островська, 2022) para su implementación en laboratorios clínicos habituados al uso de RT-qPCR. Ofrece ventajas significativas en comparación con el método de referencia, una de ellas es la flexibilidad con la que se dispone de insumos para realizar el análisis de las muestras, ya que, al no proceder con la etapa de extracción de ARN, no se requieren los equipos e insumos especializados para realizar este procedimiento evitándose problemas asociados a cuellos de botella en la cadena de suministros. Por otro lado, es una prueba considerablemente **menos invasiva** en comparación con la muestra de hisopado nasofaríngeo y su colección es rápida y sencilla, esto le evita experiencias incómodas o dolorosas a los pacientes que

deben periódicamente realizarse el examen, o que tienen dificultades para realizarse el hisopado nasofaríngeo, a la vez que ofrece protección adicional al personal encargado de la toma de muestra minimizando la exposición a gotas potencialmente infecciosas. Existe una pérdida mínima de sensibilidad (aumento de 1.8 Ct, $p < 0.01$) en la comparación de los resultados obtenidos de proteinasa K v/s extracción ARN, y un porcentaje de resultados inválidos (0.3%) y de falsos-positivos ($<0.05\%$) muy bajo (Pasomsub et al., 2021). En contra parte, la desventaja más relevante de este método es la obtención de resultados inconclusos a partir de una recolección deficiente de la muestra, puntualmente de la composición de esta, que por su naturaleza compleja puede inhibir la PCR debido a la gran cantidad interferentes presentes en ella, por esto, es muy importante que la muestra sea tomada lo mejor posible (Vogels et al., 2021).

1.5 Criterios de aceptabilidad

Para implementar una metodología por medio de verificación se usan los Criterios de Aceptabilidad. La determinación de estos parámetros ayuda a comparar la eficacia diagnóstica del método de referencia y la prueba candidata (Tabla 1), esto brinda información sobre el desempeño operativo de la prueba (sensibilidad

y especificidad) y evalúa cual es la confiabilidad de la prueba o la reproducibilidad de los resultados (Vizcaíno-salazar, n.d.). Estos parámetros son los siguientes:

Sensibilidad

Proporción de individuos enfermos que presentan una prueba positiva. Se calcula como: $VP/(VP+FN)$.

Especificidad

Proporción de individuos sin la enfermedad que poseen una prueba negativa o normal. Se calcula como: $VN/(VN+FP)$.

Valor predictivo positivo

Proporción de individuos con una prueba positiva que presentan la enfermedad. Se calcula como: $VP/(VP+FP)$.

Valor predictivo negativo

Proporción de individuos con una prueba negativa que no presentan la enfermedad. Se calcula como: $FN/(FN+VN)$.

Tabla 1. Tabla de contingencia 2x2 para cálculo de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo.

Prueba Candidata	Gold Standard		Total	
		Enfermo	Sano	
	+	VP	FP	VP+FP
	-	FN	VN	FN+VN
	Total	VP+FN	FP+VN	
		Sensibilidad	Especificidad	

Abreviaciones: Verdadero positivo (VP): la enfermedad está presente y se diagnostica al paciente como enfermo, Falso positivo (FP): el paciente no presenta la enfermedad y se le diagnostica como enfermo, Verdadero negativo (VN): la enfermedad no está presente y se diagnostica al paciente como sano, Falso negativo (FN): la enfermedad está presente y se diagnostica al paciente como sano.

Se infiere que la **sensibilidad** y la **especificidad** representan la validez de una prueba diagnóstica, y que el **valor predictivo positivo** y el **valor predictivo negativo** representan la seguridad de esta.

Precisión

Grado de concordancia entre resultados obtenidos de repeticiones de la misma muestra y bajo condiciones estipuladas.

1.6 Normativa legal

Según NCh-ISO 15189:2013, los laboratorios deben validar los procedimientos de exámenes derivados de las siguientes fuentes:

- Métodos no normalizados
- Métodos diseñados o desarrollados por el laboratorio
- Métodos normalizados utilizados fuera de su alcance previsto
- Métodos validados posteriormente modificados*

La validación puede incluir la determinación de los siguientes parámetros que se apliquen de acuerdo con las necesidades de la validación.

- Sensibilidad
- Especificidad
- Valor Predictivo Positivo (VPP)
- Valor Predictivo Negativo (VPN)
- Precisión

Luego se realizan las pruebas experimentales de la validación y se evalúan los resultados obtenidos comparando los Criterios de Aceptabilidad definidos por el Instituto de Salud Pública de Chile, según el uso previsto para el análisis de diagnóstico in vitro para la detección de SARS-CoV-2 en muestras de saliva, Los Criterios de Aceptabilidad son:

Tabla 2. Criterios de aceptabilidad para resultados de validación.

Sensibilidad Diagnóstica	Mayor o igual a 90%
Especificidad Diagnóstica	Mayor o igual a 95%

Posteriormente, se elabora un informe técnico de la validación con los resultados obtenidos.

Tamaños mínimo muestral para la evaluación de desempeño diagnóstico en una validación metodológica

El ISP considera, según el CLSI, un tamaño mínimo de muestras positivas detectadas conjuntamente por el método de referencia y test candidato de $n=50$ verdaderos positivos, y un mínimo de muestras negativas detectadas por el método de referencia de $n=50$ negativas. Sin embargo, debido al contexto pandémico, y luego de la autorización de la FDA para el uso de emergencia (EUA) para el diagnóstico molecular de SARS-CoV-2 a partir de muestra de saliva, considera que la implementación puede realizarse con un tamaño mínimo de $n=30$ muestras positivas detectadas por el método de referencia y un tamaño

mínimo de n=30 muestras negativas detectadas por el método de referencia para evaluar el desempeño clínico.

Consideraciones para el uso de una metodología validada

El ISP recomienda la implementación de un método de detección de SARS-CoV-2 por técnica de RT-qPCR en matriz de saliva previamente validado por un laboratorio registrado con capacidad diagnóstica en dicho método y que cumpla con los **Criterios de Aceptabilidad** del ISP. Esta metodología puede ser implementada en otro laboratorio, para ello los laboratorios deben realizar la verificación correspondiente, comprobando internamente el rendimiento del método candidato. Esta verificación se completa al confirmar mediante la examinación y presentación de evidencia objetiva el cumplimiento de los requisitos específicos del método validado. Por consiguiente, si un laboratorio va a usar un método ya validado, no necesita validarse nuevamente, pero debe realizar la verificación de los parámetros reportados en la validación bajo las condiciones de trabajo propias de operación antes de ser implementada.

Requisitos para la verificación

Como requisito central para la implementación de esta metodología es cumplir con los **Criterios de Aceptabilidad**. Siguiendo este eje debe realizarse la

verificación tal como fue validada, sin cambios en el tratamiento de la muestra, métodos de extracción, kit o reactivos y equipos usados para la amplificación y detección.

Existe una alternativa si los laboratorios no son capaces de replicar la metodología tal como fue validada. Debe realizarse la validación correspondiente por tratarse de una metodología modificada.

Considerando los Criterios de Aceptabilidad de Sensibilidad y Especificidad, si la **Sensibilidad** reportada en la validación del método es mayor o igual al 95%, se ha establecido que, en una verificación, la muestra mínima sugerida es de 18 muestras positivas detectadas por HNF, siempre y cuando la validación reportada cumpla con el estándar mínimo de la FDA (Tabla 3). De igual manera, si la **Especificidad** reportada en la validación del método es mayor o igual al 95%, se ha establecido que, en una verificación, la muestra mínima sugerida es de 18 muestras negativas detectadas por HNF.

Tabla 3. Tabla de contingencia 2x2 para validar una prueba candidata según criterio FDA.

Prueba Candidata	Prueba Referencia	
	Muestras +	Muestras -
	Muestras +	VP FP
	Muestras -	FN VN
Total	$VP+FN \geq 30$	$FP+VN \geq 30$

Abreviaciones, VP: Verdaderos Positivos, FN: Falsos Negativos, FP: Falsos Positivos, VN: Verdaderos Negativos.

En caso de que la **sensibilidad** reportada en la validación del método es menor al 95% se ha establecido que, en una verificación, la muestra mínima sugerida debe determinarse mediante la ecuación del tamaño muestral, ecuación 1, siempre y cuando la validación reportada cumpla con el estándar mínimo de la FDA (Tabla 3).

Ecuación del tamaño muestral

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

Considerando que la sensibilidad o especificidad de una prueba de diagnóstico es una proporción, se utilizó la siguiente fórmula para determinar el tamaño de muestra:

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

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 de parámetro.

Al reemplazar los valores de percentil y error máximo admisible correspondiente en la Ecuación 1 se tiene:

$$n = \frac{1.96^2 * P * (1 - P)}{0.1^2}$$

2 PROBLEMA

En el laboratorio clínico IC+ Medical de Los Ángeles se quiere implementar el método SalivaDirect™ para el diagnóstico de COVID-19. Se pretende que reemplace al hisopado nasofaríngeo el cual resulta muy incómodo debido a las molestias que genera, especialmente en personas que deben hacerse periódicamente el examen para la búsqueda activa de casos. Por otro lado, los problemas derivados de la cadena de suministros para la extracción de ARN limitan el alcance de la técnica para hacer detección masiva, necesarios para tener una trazabilidad adecuada y aplicar cuarentenas efectivas. La implementación requiere la verificación de este método ajustándose estrictamente al protocolo señalado o adaptándolo a la realidad del laboratorio evaluando los criterios de aceptabilidad requeridos por el Instituto de Salud Pública de Chile.

3 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el grado de cumplimiento de los criterios de aceptabilidad de la implementación de SalivaDirect™ en el laboratorio clínico IC+ Medical exigidos por el ISP respecto al Gold Standard?

4 HIPÓTESIS

La eficacia diagnóstica del método SalivaDirect™ se ajusta a los criterios de aceptabilidad al compararla con el Gold Standard según recomendación de Instituto de Salud Pública.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Validar el método de SalivaDirect™ para diagnóstico de COVID-19 en el Laboratorio Clínico IC+ Medical de Los Ángeles.

5.2 Objetivos específicos

1. Validar la implementación de la toma de muestra según indicaciones SalivaDirect™.
2. Validar la extracción de material genético según indicaciones de SalivaDirect™.
3. Verificar la amplificación por RT-qPCR según indicaciones de SalivaDirect™.
4. Comparar los criterios de aceptabilidad entre el método Gold Standard y el método SalivaDirect™.

6 METODOLOGÍA

6.1 Obtención de las muestras

IMPORTANTE: La recolección de las muestras de hisopado nasofaríngeo se realizó según la “Guía para toma de muestras respiratorias en pacientes con sospecha de infección por coronavirus (COVID-19) de la Sociedad Chilena de Medicina Intensiva 2021”, y para las muestras de saliva según el “Protocolo de toma de muestra de saliva para detectar SARS-CoV-2 por técnica de PCR” propuesto por el Instituto de Salud Pública, del 5 de noviembre de 2020 (De, 2021).

Los voluntarios seleccionados para obtener las muestras, tanto de hisopado nasofaríngeo como de saliva, fueron previamente elegidos por su condición de diagnóstico positivo para COVID-19. Ambos tipos de muestras fueron tomadas en domicilios particulares, residencias sanitarias y en la sala de toma de muestra IC+ Medical en varias tandas.

Para la obtención de las muestras negativas se procedió a reclutar voluntarios que previamente se diagnosticaran como negativo para COVID-19.

Las personas reclutadas en este estudio son voluntarios a quienes se les detalló el procedimiento y finalidad del estudio. No se utilizó en este estudio ningún dato sensible de los participantes voluntarios COVID negativos, y sólo fue utilizada la muestra de forma anónima para el procesamiento analítico.

La cantidad de muestras para este estudio se calculó mediante la expresión matemática ecuación del tamaño muestral, ecuación 1, descrita para determinar la cantidad mínima de muestras para satisfacer la representatividad requerida para una sensibilidad del 90% (35 muestras) y una especificidad del 95% (19 muestras). En consecuencia, este mínimo corresponde a 34 muestras en total considerando la cantidad mínima más grande.

Las muestras tomadas son las siguientes; a partir de 39 pacientes distintos: muestras positivas HNF n=19, muestras positivas Saliva n=19, muestras negativas HNF n=20, muestras negativas Saliva n=20 (*Protocolo de Validación Para La Detección Del Virus SARS-CoV-2 En Muestras de Saliva Mediante RT-PCR En Tiempo Real*, n.d.).

En primer lugar, se equipan los Elementos de Protección Personal (EPP) comenzando con la pechera (apertura posterior, impermeable, manga larga y desechable), luego se colocan los guantes de nitrilo cubriendo las mangas de la pechera y se sella con tela adhesiva de papel la unión entre el guante y la manga

de la pechera, se pone la mascarilla N95, las antiparras y la cofia. Finalmente, se pide feed-back sobre la correcta colocación de los EPP.

Para obtener las **muestras de hisopado nasofaríngeo** se invita al paciente a sentarse y que se baje la mascarilla, se le pide que incline la cabeza ligeramente hacia atrás (Morales-Angulo et al., 2020), de modo que las fosas nasales sean más accesibles, se quita el hisopo del embalaje y se introduce suavemente en la fosa nasal deslizándolo por la mucosa del piso de la fosa nasal hasta tocar la pared posterior de la faringe. Se prioriza la fosa nasal más despejada preguntándole al paciente por cuál de estas respira mejor. Es recomendable posicionarse a la lateral del paciente por si este toce o estornuda. Cuando el hisopo ofrece resistencia al avance significa que la punta de este ya se encuentra en la faringe, entonces se frota el hisopo contra la zona de la faringe rotándolo por unos 5 segundos para asegurarse de obtener muestra suficiente, después, se retira lentamente y rotando el hisopo para recoger más muestra a medida que va saliendo. Se repite el procedimiento con el mismo hisopo en la otra fosa nasal. Se retira el hisopo y se pone en 2 ml de PBS en un tubo Falcon de 15 ml procurando que este quede sumergido en el líquido, para luego quebrar el hisopo y cerrar el tubo. Las muestras son rotuladas con los datos del paciente: nombre, Rut, N° de muestra, tipo de muestra y fecha, se colocan en una bolsa de riesgo biológico y se almacenan en un cooler con hielo seco. Inmediatamente, se procede a tomar las **muestras de saliva**. Estas son colectadas por los pacientes

en tubos de centrifuga tipo Falcon de 50 ml libres de nucleasas, sin medio de transporte (vacío), y con la permanente supervisión del personal sanitario. Se consideran al menos 2 ml de saliva evitando la formación de burbujas. Es muy importante que la muestra contenga la menor cantidad posible de moco, esputo o restos de alimentos (Anexo 1). Luego, se cierra el tubo. Las muestras son rotuladas con los datos del paciente: nombre, Rut, N° de muestra, tipo de muestra y fecha, se colocan en una bolsa de riesgo biológico y se almacenan en un cooler con hielo seco. Finalmente, se desechan los EPP en la zona de retiro del EPP la que cuenta con un recipiente de boca ancha recubierto en su interior con una bolsa impermeable de desechos de acuerdo con la normativa del REAS (Salud, 2009). se traslada el cooler con las muestras al laboratorio. Si el análisis de las muestras no se hace inmediatamente estas son almacenadas a 4 °C hasta poder retomar el análisis de esta.

NOTA: Debido a su excepcional estabilidad (Ott et al., 2020) la muestra de saliva no necesita de tubos de colección con medios de transporte con preservantes, por lo que incluso puede ser trasladada en un cooler a temperatura ambiente constante.

6.2 Extracción de ARN

Una vez en el laboratorio se equipan EPP limpios, adicionando el uso de cubre calzado, y se pide feed-back sobre la correcta colocación de estos para proceder con la extracción de ARN total.

Ambos procedimientos, la **extracción manual de ARN** y la **extracción de ARN mediante SalivaDirect™** se realiza en un gabinete de bioseguridad tipo II.

Es recomendable trabajar junto a un revisor de carga y en conjunto revisar las etapas del procedimiento.

Comenzamos con la **extracción manual de ARN** a partir de las muestras de hisopado nasofaríngeo. Primeramente, se crea una copia digital del formulario para generar el registro del lote de análisis, se completa el registro de extracción del formulario indicando la fecha, responsables, reactivos y tipo de extracción (Anexo 2), se determina la carga de las muestras y controles en la placa de amplificación guiándose por el siguiente orden: NTC (Negative Template Control), Control Negativo de Extracción, Templado ARN (muestras), Control Positivo, y se ingresan los códigos de las muestras en el registro de extracción incluyendo el control negativo de extracción, después, se rotulan los tubos Eppendorf de 2 ml, que contienen 350 µl de buffer de lisis TRK, y los tubos

Eppendorf de 1.7 ml, en los que se obtendrán el ARN extraído, con los códigos de las muestras correspondientes, luego, se verifica junto al revisor de carga el orden de las muestras y controles. Además, debe disponerse de tubos Eppendorf de 2 ml sin tapa para montar las mini columnas HiBind® en las etapas de centrifugado. Es importante procurar no tocar la matriz de la columna con la punta de la micropipeta cuando se agreguen los reactivos. Los reactivos utilizados en la extracción pertenecen al kit E.Z.N.A.® Total RNA Kit I R6834-02 de Omega Biotek. Durante el procedimiento nos referiremos a las muestras en singular.

Una vez creado y completado el registro de extracción se continúa con el procedimiento. Se toma el tubo Falcon de 15 ml con la muestra, con el hisopo dentro, y se agita en vórtex durante 30 segundos para bajar la viscosidad de la muestra. A continuación, se toman 200 µl de muestra teniendo cuidado de no arrastrar restos del hisopo, moco o esputo, y se agregan a un tubo Eppendorf con 350 µl de buffer de lisis TRK, luego, se agita por 30 segundos en vórtex. En seguida se agregan 500 µl de etanol al 70%, preparado con agua libre de nucleasas, y se agita por 30 segundos en vórtex. En este momento se monta el sistema de extracción insertando las mini columnas HiBind® en tubos Eppendorf de 2 ml, se transfieren 550 µl de la muestra a la columna correspondiente y se centrifuga a 13.500 rpm por 1 minuto. Luego, se quita la columna del tubo, se descarta el filtrado y se vuelve a insertar la columna en el tubo. Se agregan los 550 µl de muestra restante a la columna y se repite el proceso. A continuación,

se agregan 500 µl de RNA Wash Buffer I a la columna y se centrifuga a 13.500 rpm durante 30 segundos, se descarta el filtrado y se reutilizan los tubos colectores. Luego, se agregan 500 µl de RNA Wash Buffer II a la columna y se centrifuga a 13.500 rpm por 1 minuto, se descarta el filtrado y se reutilizan los tubos colectores. Se agrega por segunda vez 500 µl de RNA Wash Buffer II a la columna y se centrifuga a 13.500 rpm durante 1 minuto, se descarta el filtrado y se reutilizan los tubos colectores. A continuación, se centrifuga a 13.500 rpm durante 2 minutos para secar por completo la columna, y después se deja secar la columna por 1 minuto con la tapa abierta dentro de la centrifuga. Una vez finalizada la etapa de secado, se transfiere la columna al correspondiente tubo Eppendorf de 1.7 ml, se agregan 50 µl de Agua libre de nucleasas directamente sobre la matriz de la columna, luego, se centrifuga a 13.500 rpm por 2 minutos. Finalmente se desecha la columna y se obtiene el ARN eluido. Se almacena el ARN eluido a 4 °C mientras se procede con la extracción desde las muestras de saliva usando el método SalivaDirect™.

Una vez utilizado el eluido de ARN para la amplificación se guarda a -20 °C por un mínimo de 24 horas luego de informados los resultados, también se conserva la muestra original por el mismo tiempo a 4 °C.

Se continúa con la **extracción de ARN siguiendo el protocolo SalivaDirect™** a partir de las muestras de saliva. Se crea una copia del formulario para generar

el registro del lote de análisis, se completa el registro de extracción del formulario indicando la fecha, responsables, reactivos y tipo de extracción (Anexo 2), se determina la carga de las muestras y controles en la placa de amplificación guiándose por el siguiente orden: NTC, Control Negativo de Extracción, Templado ARN (muestras) y Control Positivo, se ingresan los códigos de las muestras en el registro de extracción incluyendo el control negativo de extracción y se rotula la tira de reacción óptica de 8 pocillos 0.1 ml.

Ya creado y completado el registro se procede con la extracción. Se toma una tira de reacción óptica de 8 pocillos 0.1 ml y se agregan 3 µl de Proteinase K, Molecular Biology Grade, New England BioLabs (cat#P8107S) en cada pocillo a utilizar, luego se aparta la tira de reacción, inmediatamente se toma el tubo Falcon de 50 ml con la muestra y se agita en vórtex durante 30 segundos para bajar la viscosidad de esta, se toman 25 µl de saliva procurando tomar el sobrenadante de la muestra, evitando la fase sólida, y se agrega al pocillo correspondiente. Al primer pocillo se agregan 25 µl de agua libre de nucleasas para el control negativo de extracción. A continuación, se sellan los pocillos con los tapones correspondientes, se homogeneiza en vórtex por 15 segundos, se centrifuga por 10 segundos a 13.500 rpm y se lleva al termociclador Agilent AriaMx, se configura el tratamiento térmico a 95 °C durante 5 minutos y se pone en marcha. El tratamiento térmico es para inactivar la Proteinasa K y evitar la

degradación total de material genético de la muestra. Ya finalizado el tratamiento, la mezcla obtenida se utiliza directamente para el RT-qPCR.

NOTA: El tratamiento de las muestras para este estudio se realizó mediante el protocolo SalivaDirect™, lo que implica una sustitución de la etapa de extracción ácidos nucleicos por tratamiento con Proteinasa K (Vogels et al., 2021).

Adicionalmente, se realizó el análisis de las muestras de Hisopado nasofaríngeo por medio de **Extracción automática de ARN** con el fin de comparar el desempeño de ambos métodos previamente implementados en IC+ Medical. A continuación, se describe el procedimiento.

Se crea una copia digital del formulario para generar el registro del lote de análisis, se completa el registro de extracción del formulario indicando la fecha, responsables, reactivos y tipo de extracción (Anexo 2), se determina la carga de las muestras y controles en la placa de amplificación guiándose por el siguiente orden: NTC (Negative Template Control), Control Negativo de Extracción, Templado ARN (muestras), Control Positivo, y se ingresan los códigos de las muestras en el registro de extracción incluyendo el control negativo de extracción, se rotula la placa de pocillos del equipo Zybio EXM 3000 Nucleic Acid Extraction System con esta información para que al momento de cargar la placa de

extracción no ocurran errores. La placa es tabulada en una cabina de bioseguridad tipo II.

Una vez tabulada la placa se agregan 15 µl de Proteinasa K a los pocillos de esta, esto se realiza sobre la columna A, o las columnas A y F de la placa para la extracción de 8 o 16 muestras respectivamente. Posteriormente, las muestras son agitadas en vórtex durante 30 segundos para bajar su viscosidad y se agregan 200 µl de muestra por cada pocillo. Una vez cargados los pocillos con las muestras se instala la placa en el equipo Zybion EXM 3000 junto con las mangas magnéticas en la zona superior de la cámara del equipo. Se escoge el programa de extracción de ARN previamente configurado y se da a “Confirmar”. El equipo puede realizar el tratamiento de hasta 32 muestras. Al término del equipo se retira la placa con los eluidos preparados para el empleo en la técnica de RT-qPCR.

6.3 Amplificación del templado

Los productos obtenidos de la extracción manual de ARN, la extracción mediante SalivaDirect™ y extracción automática de ARN tienen el mismo tratamiento en la etapa de amplificación.

Preparación del Mix Primers y Sondas

La alícuota se hace en una cabina de bioseguridad tipo II en donde se dispone de todos los reactivos a usar. Antes de agregar los componentes estos se agitan en vórtex y se centrifugan brevemente. Se crea el stock de trabajo del Mix Primers y Sondas 20 nM tomando 20 µl del stock 100 nM y agregándolos a un microtubo LightSafe para cuidar las sondas fotosensibles, luego, se completa con 80 µl de agua libre de nucleasas. El Mix Primers y Sondas 20 nM para preparar la mezcla de reacción debe contener lo descrito en la tabla 3.

Tabla 4. Componentes del Mix Primers y Sondas.

Componente	Volumen (1 reacción)	Volumen (100 reacciones)
2019_nCoV_N1-F (400 nM/reacción)	0.4 µl	40 µl
2019_nCoV_N1-R (400 nM/reacción)	0.4 µl	40 µl
2019_nCoV_N1-P (400 nM/reacción)	0.2 µl	20 µl
RP-F (150 nM/reacción)	0.15 µl	15 µl
RP-R (150 nM/reacción)	0.15 µl	15 µl
RP-P (150 nM/reacción)	0.2 µl	20 µl
Agua Libre de Nucleasas	2.5 µl	250 µl

Mezcla de reacción

Se prepara el mix en una cabina de PCR en donde se dispone los reactivos descritos en la Tabla 4. Al tratarse de volúmenes pequeños se considera un 10% extra de los volúmenes pipeteados. La mezcla de reacción descrita en la Tabla 4 sirve para analizar una sola muestra debiendo recalcularse por el factor deseado dependiendo de la cantidad de muestras que se analicen por lote.

Primero se rotula un tubo Eppendorf de 2 ml donde se preparará la mezcla de reacción, después, se agitan los reactivos brevemente en vórtex. A continuación, se agrega al tubo Eppendorf recién tabulado el volumen de Mix Primers y Sondas, luego, se agrega el volumen RT (enzima) procurando vaciar el contenido de la punta suspendiendo con el contenido del tubo. Finalmente, se agrega el volumen de Máster Mix PCR Luna. Ya completada la mezcla de reacción, se agita en vórtex por 10 segundos y se centrifuga a 13.500 rpm por 10 segundos para eliminar las burbujas. Si las burbujas persisten, se pueden eliminar golpeando suavemente el tubo contra el mesón de la cabina de trabajo. Una vez lista la mezcla de reacción se agregan 15 µl por pocillo a usar de la placa de reacción rápida óptica de 96 pocillos, 0.1 ml, o de la tira de reacción rápida óptica de 8 pocillos, 0.1 ml, dependiendo del número de muestras a analizar. A continuación, se agregan 5 µl de los productos de extracción, extracción manual de ARN y extracción mediante SalivaDirect™, en los pocillos ya cargados con la mezcla de reacción cuidando no generar burbujas. Además, se cargan 5 µl del control

positivo, 5 µl de controles negativos y 5 µl para NTC, según lo indicado en el registro de extracción creado anteriormente. Se tapa la placa de reacción, o tira de reacción rápida, se agita en vórtex y se centrifuga por 10 segundos y 1 minuto respectivamente de modo que el contenido quede en el pocillo y no en la tapa de este, esto permite una disposición óptima a la medición del contenido además de eliminar las burbujas que queden.

Tabla 5. Componentes Mezcla de reacción.

Componente	Volumen x1 (µl)	Volumen para x (µl)
Mix Primers (cebadores) y Sondas	4	x4
Máster Mix PCR Luna	10	x10
RT	1	x1
Muestras o control*	5	x5
TOTAL	20	x20

*Como controles positivos de cada reacción se utilizó un control sintético correspondiente a un plásmido contenido en el gen de la proteína N (nucleocápside) de SARS-CoV-2 (2019-nCoV_N_Positive Control, IDT, EE. UU.).

Configuración perfil térmico Agilent AriaMx

Ya cargadas las muestras en el termociclador Agilent AriaMx se selecciona el perfil térmico descrito para la amplificación RT-qPCR (Figura 3). El perfil térmico se divide en 3 las etapas. Comienza con la retro-transcripción, donde el Cebador F se une al ARNm viral transcribiendo a ADNc, se continua con el Hot start, que es una modificación a la PCR convencional la cual reduce la presencia de productos no deseados y dímeros de cebadores debido a la amplificación de ADN no específica a temperatura ambiente. Posteriormente se inicia la reacción de amplificación donde el Cebador R se une al ADNc Monocatenario, esto le permite a la Polimerasa sintetizar ADNc Bicatenario y generar los amplicones.

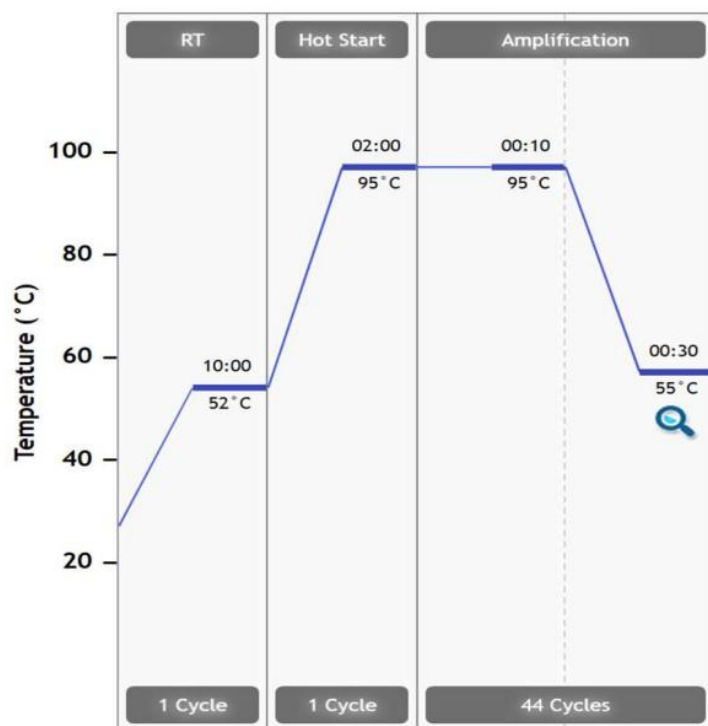


Figura 3. Interfaz de la configuración del perfil térmico de reacción del termociclador Agilent modelo AriaMx.

La cuantificación del material genético es hecha por PCR dúplex de dos canales que detecta el gen N de la nucleocápside de SARS-CoV-2 (canal FAM) junto con el mensajero de la RNasa P humana (canal Cy5) el que actúa como control interno.

Los datos obtenidos serán clasificados de la siguiente manera:

Tabla 6. Tabla tipo de resultados.

N°	Código interno	ID PNTM o EPIVIGILA	Fluoróforo	Ct HNF	Ct Saliva Direct	Resultado	Fluoróforo	Ct HNF	Ct Saliva Direct

6.4 Interpretación de los resultados

La interpretación de los resultados se considera válida sólo si todos los controles presentan un Umbral de Ciclos, Cycles Threshold (Ct), en el rango aceptable, esto es, para el **control negativo** de PCR (NTC) nCoV = No Ct / RnaseP = No Ct; y para el **control positivo** de PCR, nCoV Ct ~ 28 / RnaseP = No Ct. Para el **control interno** RnaseP presente en cada muestra se espera un Ct alrededor de 20. Para Ct's mayores a 30 o "No Cq" se interpretan como inhibición del PCR y se somete la muestra a un proceso de extracción manual de ARN para posteriormente repetir el PCR. De continuar la situación de no amplificación para el control interno, la muestra se considera inválida y con resultado inconcluso, a menos que la reacción de detección de SARS-CoV-2 si amplifique, en cuyo caso

la muestra podría considerarse positiva aún en ausencia de amplificación del control interno respectivo.

Tabla 7. Interpretación de resultados en función del Ct.

Resultados Agilent AriaMx	Valor *Cq N1	Valor Ct RP
Positivo	<34.0	Cualquier valor
Negativo	≥36.0	<30.0
Inconcluso	≥34.0 - <36.0	<30.0
Inválido	≥34.0	≥30.0

NOTA: Los resultados obtenidos del termociclador son analizados en el software incluido por el fabricante.

*Cq: número de ciclos donde la fluorescencia empieza a ser detectada.

7 VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA

7.1 Análisis de datos

Concordancia con análisis de referencia, test candidato SalivaDirect™

De la Tabla 1 se depende la siguiente información:

Saliva Direct	Hisopado		Nasofaríngeo	Total
		Muestra COVID positivo	Muestras COVID negativo	
	+	VP	FP	VP+FP
	-	FN	VN	FN+VN
	Total	VP+FN	FP+VN	

Calculo intervalos de confianza por el método de Clopper-Pearson

El tratamiento de los resultados obtenidos se hará con MedCalc®, un software gratuito para análisis estadísticos donde se determinarán los valores de Sensibilidad, Especificidad, Razón de verosimilitud positiva, Razón de verosimilitud negativa, Prevalencia de la enfermedad, Valor predictivo positivo, Valor predictivo negativo y Precisión.

Statistic	Value	95% CI
Sensitivity		
Specificity		
Positive Likelihood Ratio		
Negative Likelihood Ratio		
Disease prevalence (*)		
Positive Predictive Value (*)		
Negative Predictive Value (*)		
Accuracy (*)		

(*) These values are dependent on disease prevalence.

Figura 4. Parámetros estadísticos calculados por el software MedCalc®

8 RESULTADOS

8.1 Implementación y validación de la toma de muestra según indicaciones de SalivaDirect™

Cálculo del N° de muestras necesarias para la validación

Para determinar el tamaño de muestra que se necesita para satisfacer los criterios de aceptabilidad correspondientes a una Sensibilidad del 90% y a una Especificidad del 95% según señalado por Instituto de Salud Pública (*Protocolo de Validación Para La Detección Del Virus SARS-CoV-2 En Muestras de Saliva Mediante RT-PCR En Tiempo Real*, n.d.).

A partir de la Ecuación 1:

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

Para una Sensibilidad del 90%:

$$n = \frac{1.96^2 * 0.9 * (1 - 0.9)}{0.1^2}$$

$$n = \frac{3,8416 * 0.9 * 0.1}{0.01}$$

$$n = 34,6$$

$$n = 35$$

Y para una Especificidad del 95%:

$$n = \frac{1.96^2 * 0.95 * (1 - 0.95)}{0.1^2}$$

$$n = \frac{3,8416 * 0.95 * 0.05}{0.01}$$

$$n = 18,3$$

$$n = 19$$

Se considera el tamaño muestral mayor con el objetivo de contener tanto el tamaño muestras necesario para la Sensibilidad y la Especificidad y así satisfacer la representatividad requerida.

Capacitación del personal sanitario

Se realizaron capacitaciones del personal sanitario utilizando el “Protocolo toma de muestra Saliva, Instituto de Salud Pública 2021” como guía. Durante la capacitación, se proporcionaron instrucciones detalladas sobre el proceso de toma de muestras de saliva, siguiendo los lineamientos establecidos por el Instituto de Salud Pública en 2021.

Se enfatizó en la importancia del uso adecuado del equipo de protección personal (EPP) para garantizar la seguridad tanto del personal como de los pacientes. Se suministraron pecheras desechables, guantes de nitrilo, mascarillas N95, antiparras y cofias, asegurando que se utilicen durante todo el proceso de toma de muestras.

Asimismo, se brindaron instrucciones detalladas a los pacientes sobre los pasos que deben seguir antes de la toma de muestras. Se les indicó que deben restringir alimentos y líquidos durante un período específico antes de la recolección de la muestra. Se les recomendó evitar ciertos hábitos que podrían afectar la calidad de la muestra, así como cuidar adecuadamente su higiene bucal y eliminar cualquier producto cosmético antes de la toma de la muestra de saliva.

Para garantizar la integridad y calidad de las muestras recolectadas, se implementó un proceso de supervisión exhaustiva. Se verificó la calidad de cada

muestra recopilada, asegurando que cumpliera con los estándares establecidos. Además, se estableció un protocolo para el traslado de las muestras, utilizando contenedores acondicionados que mantuvieran la temperatura y las condiciones adecuadas durante el tiempo de traslado.

Como resultado de la capacitación y la implementación del “Protocolo toma de muestra Saliva, Instituto de Salud Pública 2021”, se logró un personal sanitario debidamente capacitado en la toma de muestras de saliva. Se estableció un protocolo estandarizado que garantiza la seguridad tanto del personal como de los pacientes, así como la integridad y calidad de las muestras recolectadas.

8.2 Implementación y validación de la extracción de material genético según SalivaDirect™

Extracción de ARN a partir de saliva

Se realizaron con éxito los pasos necesarios para la extracción de saliva, obteniendo resultados satisfactorios en el análisis de las muestras. En primer lugar, se llevó a cabo el registro de extracción, completando un formulario con los datos correspondientes para cada muestra, como la fecha, los responsables, los

reactivos utilizados y el tipo de extracción. Se extrajeron 19 muestras COVID positivas y 20 muestras COVID negativas.

Luego, se procedió a la carga de las muestras y los controles en la placa de amplificación siguiendo el orden específico descrito en la metodología. Se estableció un protocolo claro para determinar el orden de carga, asegurándose de incluir los controles negativos y positivos, así como las muestras de saliva. Los códigos de las muestras se registraron correctamente junto con el control negativo de extracción, y se rotuló la tira de reacción óptica para facilitar la identificación.

Posteriormente, se realizó la extracción de ARN utilizando los pocillos de la tira de reacción óptica. Se agregó Proteinasa K en cada pocillo, seguido de la adición del sobrenadante de la muestra de saliva previamente tratada en un vórtex para reducir la viscosidad. Se prestó especial atención al control negativo de extracción, agregando agua libre de nucleasas en el primer pocillo. Todos los pocillos se sellaron y homogeneizaron adecuadamente.

Se procedió al tratamiento térmico de la placa en el termociclador Agilent modelo AriaMx, configurando una temperatura de 95 °C durante 5 minutos. Este

tratamiento térmico fue esencial para inactivar la Proteinasa K y prevenir la degradación del material genético presente en las muestras de saliva.

Una vez finalizado el tratamiento térmico, se utilizó directamente la mezcla obtenida para realizar la técnica de RT-qPCR. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios, lo que indica que todos los pasos de la metodología se llevaron a cabo de manera exitosa.

Otros resultados relacionados a la extracción de material genético

Los resultados obtenidos, tanto la extracción manual como la extracción automática, se llevaron a cabo de manera satisfactoria en cuanto al procedimiento de obtención ARN eluido para su uso en la técnica de RT-qPCR.

En el caso de la extracción manual, se siguieron meticulosamente los procedimientos establecidos. La agitación del tubo *falcon* durante 30 segundos permitió reducir la viscosidad de la muestra de saliva, facilitando su manipulación. La transferencia de muestra al tubo *Eppendorf* junto con el buffer de lisis TRK se realizó sin contratiempos, seguida de la adición de etanol al 70% para el posterior procesamiento. El montaje del sistema de extracción con las mini columnas HiBind® permitió una separación eficiente de los componentes celulares, y cada paso, desde la remoción de la columna hasta el secado y la elución del ARN, se

llevó a cabo correctamente. El ARN eluido se almacenó adecuadamente a 4 °C y a -20 °C para su posterior uso y almacenamiento a largo plazo respectivamente.

Por otro lado, la extracción automática se realizó utilizando el equipo Zybiox EXM 3000. Se completó el registro de extracción con precisión, asegurando un seguimiento adecuado de las muestras. La carga de muestras y controles se realizó en el orden correcto, siguiendo el procedimiento establecido. La preparación de la placa de extracción se llevó a cabo sin problemas, garantizando la reducción de la viscosidad de las muestras mediante la agitación en un vórtex y agregando la cantidad indicada de muestra por cada pocillo. El proceso de extracción automática se ejecutó con éxito, siguiendo el programa configurado en el equipo. Al finalizar, se obtuvieron los eluidos preparados, listos para su uso en la técnica de RT-qPCR.

8.3 Verificación de la RT-qPCR según indicaciones de SalivaDirect™

Preparación mix primers y sondas, mezcla de reacción y uso de controles positivos

Los resultados obtenidos demuestran que se lograron realizar con éxito los diferentes pasos para la preparación del mix primers y sondas, así como la Mezcla de Reacción y el uso de los controles positivos.

La preparación del Mix Primers y Sondas se llevó a cabo en una cabina de bioseguridad tipo II, garantizando un entorno adecuado y estéril. Los componentes fueron correctamente agitados en un vórtex y centrifugados, asegurando su homogeneidad y eliminando posibles burbujas. Se logró crear con éxito el stock de trabajo del Mix Primers y Sondas 20 nM, utilizando la alícuota adecuada del stock 100 nM y diluyéndola en agua libre de nucleasas.

La mezcla de reacción se preparó meticulosamente en una cabina de PCR, siguiendo los reactivos indicados en la metodología. Se consideró un 10% extra de los volúmenes pipeteados para asegurar la cantidad adecuada de reactivos en los volúmenes pequeños. La preparación de la mezcla se realizó de manera precisa, logrando una consistencia uniforme mediante la agitación en un vórtex y la centrifugación para eliminar burbujas. Los productos de extracción, tanto de la

extracción manual y automática de ARN como de la extracción mediante SalivaDirect™, se agregaron sin generar burbujas, asegurando una correcta disposición de los contenidos. Los controles positivos y negativos se incluyeron de acuerdo con el registro de extracción previamente creado. La tapa de la placa de reacción fue colocada correctamente, realizando la agitación en un vórtex y la centrifugación para garantizar la ubicación óptima del contenido y la eliminación de burbujas.

En cuanto a los controles positivos, se utilizaron los controles sintéticos correspondientes a los plásmidos que contienen el gen de la proteína N de SARS-CoV-2 en cada reacción.

Estos procedimientos se realizaron en condiciones adecuadas de bioseguridad, siguiendo rigurosamente las indicaciones de la metodología, lo que *a priori* garantiza la calidad y confiabilidad de los resultados obtenidos.

Obtención de los productos de PCR

Los resultados obtenidos utilizando el termociclador Agilent AriaMx arrojaron resultados positivos consistentes. El análisis se llevó a cabo por duplicado, lo que aumenta la confiabilidad de los resultados obtenidos.

Tabla 8. Resultados del lote N° 2 de muestras, obtenidos por el termociclador Agilent AriaMx

Well	Well Name	Target	Cq (ΔR)
A1	NTC	FAM	No Cq
A2	S-L2A1M28787	FAM	30,83
A3	N-L2A1M28787	FAM	26,29
A4	S-L2A1M28787	FAM	39,07
B1	N-L2A1M28787	FAM	25,67
B2	S-L2A1M28788	FAM	31,17
B3	N-L2A1M28788	FAM	31,29
B4	S-L2A1M28788	FAM	33,65
C1	N-L2A1M28788	FAM	31,02
C2	S-L2A1M28789	FAM	32,16
C3	N-L2A1M28789	FAM	29,69
C4	S-L2A1M28789	FAM	33,68
D1	N-L2A1M28789	FAM	29,71
D2	S-L2A1M28800	FAM	33,84
D3	N-L2A1M28800	FAM	23,39
D4	S-L2A1M28800	FAM	36,93
E1	N-L2A1M28800	FAM	23,21
E2	POS	FAM	21,10
E3	C-EXT	FAM	No Cq
E4	POS	FAM	21,28
F1	C-EXT	FAM	No Cq
F3	NTC	FAM	No Cq

Las cuatro muestras analizadas correspondieron a la muestra 2, 3, 4 y 5, tal como se describen en la tabla 9 de resultados positivos de hisopado nasofaríngeo (N) y saliva (S). Cada una de las muestras analizadas se hizo por duplicado tanto para hisopado nasofaríngeo como para saliva. Los pocillos A2, A3, A4 y B1 corresponden a la muestra 2. Los pocillos A2 y A4 son los duplicados de las muestras de saliva, A3 y B1 son los duplicados de la muestra de hisopado nasofaríngeo.

La obtención de resultados positivos en estas muestras y en los controles positivos da cuenta de la presencia del virus en los individuos examinados.

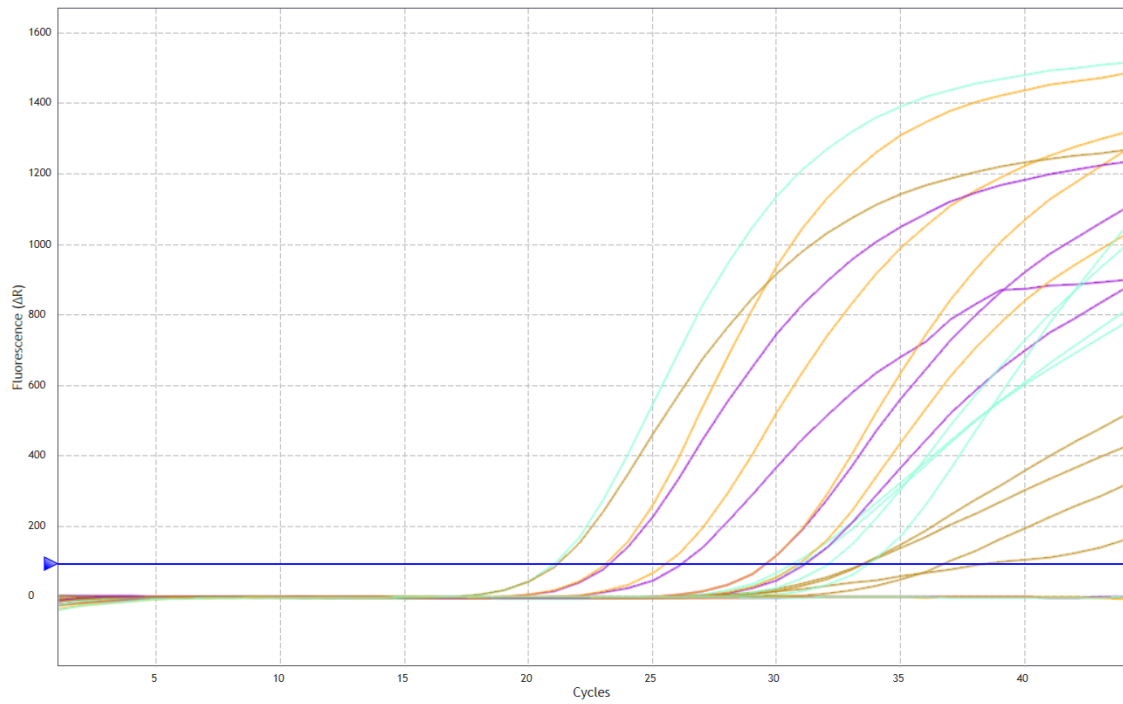


Figura 5. Curva de amplificación de RT-qPCR correspondiente al lote N° 2, muestras 2, 3, 4 y 5, NTC, positivo y control de extracción.

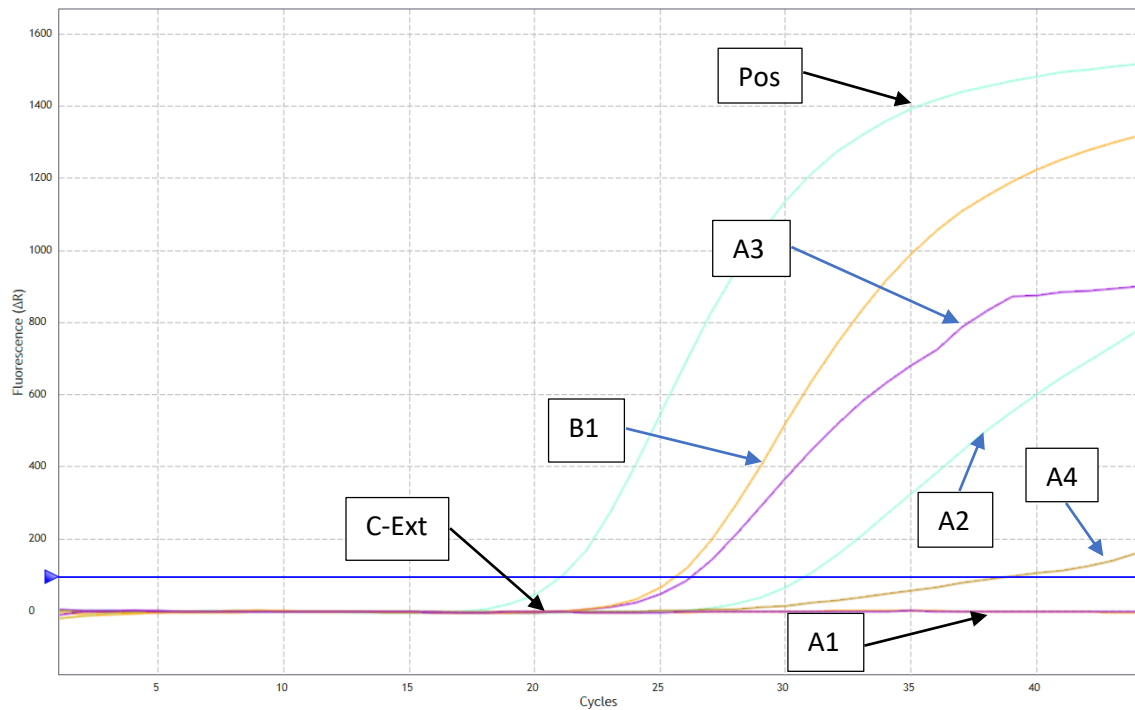


Figura 6. Curva de amplificación de RT-qPCR, correspondiente a NTC (A1), al positivo (Pos), al control de extracción (C-Ext) y a la muestra 2 (A2, A3, A4 y B1).

Los resultados obtenidos mediante el termociclador Agilent AriaMx en las muestras 2, 3, 4 y 5 revelaron resultados positivos consistentes con la presencia del virus SARS-CoV-2.

Tabla 9. Resultados positivos de la amplificación de SARS-Cov-2 (gen N de la nucleocápside, canal FAM, y el mensajero de la RNasa P humana, canal Cy5) en muestras obtenidas desde Hisopado nasofaríngeo mediante extracción manual y de Saliva.

N°	Código interno	ID PNTM o EPIVIGILA	Fluoróf	Ct HNF	Ct Saliva Direct	Resultado	Fluoróf	Ct HNF	Ct Saliva Direct
1	L2A1M28796	xxxxx362 EPI	FAM	27,3	33,7	Positivo	CY5	27,8	21,2
2	L2A1M28787	xxxxx247 EPI	FAM	25,7	30,8	Positivo	CY5	25,8	22,3
3	L2A1M28788	xxxxx747 EPI	FAM	31	31,2	Positivo	CY5	29,4	19,5
4	L2A1M28789	xxxxx348 EPI	FAM	29,7	32,2	Positivo	CY5	26,4	19,8
5	L2A1M28800	xxxxx552 EPI	FAM	23,2	33,8	Positivo	CY5	28,4	21,6
6	L2A1M08935	xxxxx448 EPI	FAM	19,2	25,3	Positivo	CY5	27,8	23
7	L2A1M08939	xxxxx342 EPI	FAM	19,4	26,6	Positivo	CY5	27,2	19,5
8	L2A1M08940	xxxxx396 EPI	FAM	15,1	25,06	Positivo	CY5	33,4	20,51
9	L2A1M08943	xxxxx454 EPI	FAM	31	36,5	Positivo/ Inconcluso	CY5	27,8	26,5
10	L2A1M08945	xxxxx583 EPI	FAM	22,2	32,2	Positivo	CY5	28	22,51
11	L2A1M15898	702033384 3	FAM	20,4	33,4	Positivo	CY5	24,7	24,5
12	L2A1M16761	702132115 2	FAM	13,3	19,1	Positivo	CY5	No Cq	21,9
13	L2A1M16767	702132114 3	FAM	19,1	22,2	Positivo	CY5	25,1	23,0
14	L2A1M16764	702033384 8	FAM	23,0	27,1	Positivo	CY5	25,6	22,2
15	L2A1M16765	702033384 7	FAM	24,8	27,1	Positivo	CY5	21,5	24,0
16	L2A1M16766	702033384 6	FAM	24,1	27,1	Positivo	CY5	24,9	22,9
17	L2A1M16758	702033385 1	FAM	22,4	28,5	Positivo	CY5	24,9	25,3
18	L2A1M16759	702033385 0	FAM	22,1	30,3	Positivo	CY5	25,0	22,4
19	L2A1M16762	702033385 4	FAM	26,6	30,9	Positivo	CY5	26,9	23,3

Tabla 10. Resultados negativos de la amplificación de SARS-Cov-2 (gen N de la nucleocápside, canal FAM, y el mensajero de la RNasa P humana, canal Cy5) en muestras obtenidas desde Hisopado nasofaríngeo mediante extracción manual y de Saliva.

N°	Código interno	ID PNTM o EPIVIGILA	Fluoróf	Ct HNF	Ct Saliva Direct	Resultado	Fluoróf	Ct HNF	Ct Saliva Direct
1	L2A1M09017	7018344430	FAM	No Cq	33,2	Positivo	CY5	25,3	22,3
2	L2A1M08979	7018515080	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	25,4	19,7
3	L2A1M08980	7018515264	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	26,7	20,9
4	L2A1M08981	7018515494	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	26,7	22,6
5	L2A1M08982	7018516072	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	20,6	21,7
6	L2A1M08983	7018516250	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	26,7	25,5
7	L2A1M08984	7018516472	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	27	19,6
8	L2A1M08985	7018516631	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	25,9	20,3
9	L2A1M08987	7018517297	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	26,3	22,6
10	L2A1M08988	7018517436	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	26,1	21,9
11	L2A1M08989	7018518349	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	24,9	22,4
12	L2A1M08990	7018518555	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	24,2	19,5
13	L2A1M08991	7018518778	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	26,5	22,4
14	L2A1M08992	7018519121	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	27,2	21,9
15	L2A1M08993	7018519569	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	25	21,7
16	L2A1M08946	7018519875	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	26,7	20,6
17	L2A1M08947	7018520315	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	25,8	21
18	L2A1M08948	7018520537	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	24,4	23
19	L2A1M08949	7018520811	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	28	20,5
20	L2A1M08950	7018521101	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	26	20,3

Tabla 11. Resultados positivos de la amplificación de SARS-Cov-2 (gen N de la nucleocápside, canal FAM, y el mensajero de la RNasa P humana, canal Cy5) en muestras obtenidas desde Hisopado nasofaríngeo mediante extracción manual y automática.

N°	Código interno	ID PNTM o EPIVIGILA	Fluoróf	Ct HNF Manual	Ct HNF Auto.	Resultado	Fluoróf	Ct HNF Manual	Ct HNF Auto.
1	L2A1M28796	xxxxx362 EPI	FAM	27,3	26,5	Positivo	CY5	27,8	26,0
2	L2A1M28787	xxxxx247 EPI	FAM	25,7	25,3	Positivo	CY5	25,8	24,9
3	L2A1M28788	xxxxx747 EPI	FAM	31	30,3	Positivo	CY5	29,4	30,1
4	L2A1M28789	xxxxx348 EPI	FAM	29,7	28,9	Positivo	CY5	26,4	25,8
5	L2A1M28800	xxxxx552 EPI	FAM	23,2	23	Positivo	CY5	28,4	27,7
6	L2A1M08935	xxxxx448 EPI	FAM	19,2	19,3	Positivo	CY5	27,8	27,1
7	L2A1M08939	xxxxx342 EPI	FAM	19,4	19,1	Positivo	CY5	27,2	27,0
8	L2A1M08940	xxxxx396 EPI	FAM	15,1	15	Positivo	CY5	33,4	31,4
9	L2A1M08943	xxxxx454 EPI	FAM	31	30,4	Positivo	CY5	27,8	28,0
10	L2A1M08945	xxxxx583 EPI	FAM	22,2	21,9	Positivo	CY5	28	27,3
11	L2A1M15898	702033384 3	FAM	20,4	21,1	Positivo	CY5	24,7	23,1
12	L2A1M16761	702132115 2	FAM	13,3	13,5	Positivo	CY5	No Cq	24,2
13	L2A1M16767	702132114 3	FAM	19,1	18,7	Positivo	CY5	25,1	24,5
14	L2A1M16764	702033384 8	FAM	23,0	22,2	Positivo	CY5	25,6	23,9
15	L2A1M16765	702033384 7	FAM	24,8	20,1	Positivo	CY5	21,5	22,2
16	L2A1M16766	702033384 6	FAM	24,1	22,9	Positivo	CY5	24,9	23,6
17	L2A1M16758	702033385 1	FAM	22,4	21,1	Positivo	CY5	24,9	22,8
18	L2A1M16759	702033385 0	FAM	22,1	21,0	Positivo	CY5	25,0	23,9
19	L2A1M16762	702033385 4	FAM	26,6	26,1	Positivo	CY5	26,9	25,7

Tabla 12. Resultados negativos de la amplificación de SARS-Cov-2 (gen N de la nucleocápside, canal FAM, y el mensajero de la RNasa P humana, canal Cy5) en muestras obtenidas desde Hisopado nasofaríngeo mediante extracción manual y automática.

N°	Código interno	ID PNTM o EPIVIGILA	Fluoróf	Ct HNF Manual	Ct HNF Auto.	Resultado	Fluoróf	Ct HNF Manual	Ct HNF Auto.
1	L2A1M09017	7018344430	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	25,3	24,5
2	L2A1M08979	7018515080	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	25,4	23,9
3	L2A1M08980	7018515264	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	26,7	27,0
4	L2A1M08981	7018515494	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	26,7	26,2
5	L2A1M08982	7018516072	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	20,6	19,5
6	L2A1M08983	7018516250	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	26,7	26,1
7	L2A1M08984	7018516472	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	27	26,2
8	L2A1M08985	7018516631	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	25,9	25,1
9	L2A1M08987	7018517297	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	26,3	25,9
10	L2A1M08988	7018517436	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	26,1	24,7
11	L2A1M08989	7018518349	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	24,9	22,8
12	L2A1M08990	7018518555	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	24,2	24,8
13	L2A1M08991	7018518778	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	26,5	26,0
14	L2A1M08992	7018519121	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	27,2	25,7
15	L2A1M08993	7018519569	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	25	23,5
16	L2A1M08946	7018519875	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	26,7	26,1
17	L2A1M08947	7018520315	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	25,8	23,6
18	L2A1M08948	7018520537	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	24,4	25,3
19	L2A1M08949	7018520811	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	28	26,9
20	L2A1M08950	7018521101	FAM	No Cq	No Cq	Negativo	CY5	26	24,5

Tabla 13. Comparación de los resultados PCR positivos obtenidos de los métodos de extracción de ARN utilizados.

N°	ID	HNF Ct		Saliva Ct
		Manual	Automático	
1	L2A1M28796	27,3	26,5	33,7
2	L2A1M28787	25,7	25,3	30,8
3	L2A1M28788	31	30,3	31,2
4	L2A1M28789	29,7	28,9	32,2
5	L2A1M28800	23,2	23	33,8
6	L2A1M08935	19,2	19,3	25,3
7	L2A1M08939	19,4	19,1	26,6
8	L2A1M08940	15,1	15	25,06
9	L2A1M08943	31	30,4	36,5
10	L2A1M08945	22,2	21,9	32,2
11	L2A1M15898	20,4	21,1	33,4
12	L2A1M16761	13,3	13,5	19,1
13	L2A1M16767	19,1	18,7	22,2
14	L2A1M16764	23,0	22,2	27,1
15	L2A1M16765	24,8	20,1	27,1
16	L2A1M16766	24,1	22,9	27,1
17	L2A1M16758	22,4	21,1	28,5
18	L2A1M16759	22,1	21,0	30,3
19	L2A1M16762	26,6	26,1	30,9

Los resultados obtenidos demuestran una validación exitosa de los controles y una interpretación adecuada del umbral de ciclos (Ct) en cada muestra analizada.

En primer lugar, los controles negativos y positivos de PCR muestran los Ct esperados, lo que indica un funcionamiento correcto del ensayo. Esto asegura la

fiabilidad de los resultados y confirma que el proceso de amplificación y detección se ha llevado a cabo de manera adecuada.

En el caso particular de la muestra 12, se observa un resultado positivo en el hisopado nasofaríngeo con un Ct de 13,3 en el canal FAM, que mide la fluorescencia del gen que codifica para la proteína N1 de SARS-CoV-2. Sin embargo, se obtiene un Ct de “No Cq” en el canal Cy5, que funciona como control interno. Estos resultados indican la presencia de un fenómeno de competencia entre la amplificación de ambos genes. El Ct de 13,3 sugiere que la cantidad inicial de material genético viral era significativamente mayor en comparación con la presencia del gen que codifica para la proteína RNase P humana.

En casos donde se identifica inhibición de la PCR con Ct de RNase P mayores a 30 o “No Cq”, se realiza una extracción manual de ARN y se repite el PCR. Este paso es necesario para abordar cualquier posible inhibición o interferencia en la muestra y garantizar la confiabilidad de los resultados.

Los resultados obtenidos en la Tabla 9 revelan una consistencia con las expectativas establecidas. Particularmente, en el caso de la muestra número 9, se observa un resultado positivo con un Ct (Ciclos de Umbral) de 31 para el hisopado nasofaríngeo, mientras que para la muestra de saliva se obtiene un Ct de 36,5. Estos valores indican que la primera muestra se considera positiva,

mientras que la segunda se considera inconclusa. Aunque normalmente un Ct mayor a 36 se considera negativo, la presencia de un resultado positivo en el hisopado nasofaríngeo lleva a esta consideración. Estos hallazgos evidencian las diferencias en sensibilidad entre la muestra de saliva y la muestra de hisopado nasofaríngeo.

Es importante destacar que si la detección de SARS-CoV-2 ocurre, pero no se amplifica el control interno, la muestra puede considerarse positiva. Esto se debe a la alta probabilidad de que se esté produciendo un fenómeno de competencia por la amplificación entre el gen N1 SARS-CoV-2 y el gen Rnase P humana. En estos casos, la detección del virus se considera válida a pesar de la falta de amplificación del control interno.

En resumen, los resultados obtenidos se basan en la validación de los controles y la interpretación adecuada del umbral de ciclos (Ct). Estos criterios garantizan una interpretación confiable de los resultados de detección de SARS-CoV-2, asegurando la precisión y la calidad de los datos obtenidos.

8.4 Comparación de los criterios de aceptabilidad entre el método Gold Standard y el método SalivaDirect™

Tabla de concordancia o de contingencia

Los resultados obtenidos reflejan un proceso satisfactorio de verificación y validación de la prueba diagnóstica. A continuación, se presentan los puntos clave que respaldan esta afirmación:

En primer lugar, se ha implementado una metodología de verificación que utiliza criterios de aceptabilidad. Esto asegura que se sigan estándares y pautas establecidas para evaluar la eficacia diagnóstica de la prueba candidata.

Se ha llevado a cabo una comparación entre el método de referencia y la prueba candidata para evaluar su eficacia diagnóstica. Esta comparación permite determinar si la prueba candidata es igualmente efectiva al método de referencia establecido.

Se han calculado parámetros clave, como sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo. Estos parámetros proporcionan información importante sobre la validez y seguridad de la prueba diagnóstica.

La sensibilidad y especificidad son medidas que representan la capacidad de la prueba diagnóstica para detectar correctamente los casos positivos y negativos, respectivamente. Un alto valor de sensibilidad indica una baja tasa de falsos negativos, mientras que una alta especificidad indica una baja tasa de falsos positivos.

El valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo reflejan la seguridad de la prueba diagnóstica al predecir correctamente los resultados positivos y negativos, respectivamente. Estos valores son especialmente relevantes para evaluar la utilidad clínica de la prueba en un contexto específico.

Tabla 14. Resultados obtenidos de la RT-qPCR de HNF manual y de Saliva.

		Hisopado	Nasofaríngeo	
		Muestras positivas	Muestras negativas	TOTAL
Saliva Direct	Muestras positivas	18	1	19
	Muestras negativas	1	19	20
	TOTAL	19	20	39

Es importante destacar que la prevalencia y sus parámetros derivados no deben influir en la validación de un método diagnóstico. La efectividad de la prueba diagnóstica debe ser evaluada independientemente de la prevalencia de la enfermedad en la población analizada.

Tabla de intervalos de confianza de Clopper-Pearson

Los resultados obtenidos a partir de la tabla de confianza de Clopper-Pearson respaldan la eficacia y confiabilidad de la prueba diagnóstica. A continuación, se presentan los puntos clave que demuestran la validez de los resultados:

Se utilizó el software MedCalc® para realizar el análisis estadístico de los resultados. Este software es ampliamente reconocido y confiable en el campo de la estadística médica, lo que garantiza la precisión y la integridad de los cálculos realizados.

Se calcularon varios valores estadísticos importantes, como la sensibilidad, especificidad, razón de verosimilitud positiva y negativa, prevalencia de la enfermedad, valor predictivo positivo y negativo, y precisión. Estos valores proporcionan una comprensión completa de la eficacia diagnóstica de la prueba.

Los intervalos de confianza obtenidos ofrecen una medida confiable de la eficacia diagnóstica de la prueba candidata. Estos intervalos indican el rango dentro del cual se espera que se encuentre el verdadero valor de la sensibilidad, especificidad y otros parámetros calculados. Un intervalo de confianza estrecho indica una mayor precisión y confiabilidad de los resultados.

Tabla 15. Resultados de sensibilidad y especificidad obtenidos usando MedCalc®.

Statistic	Value	95% CI
Sensitivity	94.74%	73.97% to 99.87%
Specificity	95.00%	75.13% to 99.87%
Positive Likelihood Ratio	18.95	2.80 to 128.38
Negative Likelihood Ratio	0.06	0.01 to 0.37
Disease prevalence (*)	0.30%	
Positive Predictive Value (*)	5.39%	0.83% to 27.87%
Negative Predictive Value (*)	99.98%	99.89% to 100.00%
Accuracy (*)	95.00%	82.86% to 99.41%

(*) These values are dependent on disease prevalence.

Prevalencia del 0.3%

De los datos ingresados a la herramienta digital MedCalc® se obtuvieron los siguientes valores con lo cual se cumplen las exigencias del ISP en cuanto a los criterios de aceptabilidad exigidos.

Sensibilidad Diagnóstica	94,74%
Especificidad Diagnóstica	95,00%

Los resultados brindan una evaluación confiable de la eficacia diagnóstica de la prueba, con un nivel de confianza del 95%. Un nivel de confianza del 95% indica que hay un 95% de probabilidad de que los resultados sean representativos y aplicables a la población en general.

Los resultados obtenidos en la tabla de concordancia demuestran la confiabilidad y reproducibilidad de la prueba diagnóstica. La implementación de criterios de aceptabilidad, la comparación con el método de referencia y el cálculo de parámetros clave respaldan la eficacia y validez de la prueba en la detección precisa de la enfermedad o condición analizada.

Por otro lado, los resultados obtenidos a partir de la tabla de confianza de Clopper-Pearson respaldan igualmente la eficacia y confiabilidad de la prueba

diagnóstica. El uso de software estadístico confiable, el cálculo de valores estadísticos importantes y la inclusión de intervalos de confianza proporcionan una evaluación precisa de la eficacia diagnóstica de la prueba.

Ambos métodos de evaluación de los resultados presentan ventajas significativas. La tabla de concordancia permite evaluar la consistencia y la reproducibilidad de la prueba, estableciendo su confiabilidad en la detección de la enfermedad o condición analizada. Por otro lado, la tabla de confianza de Clopper-Pearson ofrece una medida confiable de la eficacia diagnóstica, respaldada por el uso de software estadístico confiable y la inclusión de intervalos de confianza.

9 DISCUSIÓN

La implementación de un método efectivo y confiable para la detección de casos activos de COVID-19 fue fundamental en la lucha contra esta pandemia. En este sentido, la metodología SalivaDirect™ se ha mostrado eficaz y ha demostrado ventajas significativas en varios aspectos.

En primer lugar, el método SalivaDirect™ ha mostrado una buena eficacia diagnóstica, evidenciada por parámetros como la sensibilidad y especificidad obtenidas. Estos resultados indican la capacidad de la prueba SalivaDirect™ para identificar correctamente a los individuos enfermos y descartar a aquellos que no padecen la enfermedad. Esto es crucial para garantizar una detección precisa y reducir los falsos positivos y falsos negativos, lo que conllevó a una mejor gestión y seguimiento de los casos de COVID-19.

La toma de muestra de saliva se ha convertido en una opción altamente valorada y aceptada por parte de los usuarios en la detección de casos sospechosos de COVID-19. Su facilidad de uso, comodidad y resultados eficientes contribuyen significativamente a los esfuerzos de control y prevención de la enfermedad.

Se logró realizar la extracción de saliva de manera efectiva, siguiendo los pasos establecidos. El registro de extracción, la carga adecuada de las muestras y controles, el tratamiento térmico y el uso de la mezcla para RT-qPCR fueron realizados de manera precisa, lo que garantiza resultados satisfactorios en el análisis de las muestras de saliva mediante SalivaDirect™.

Conjuntamente de su eficacia diagnóstica, SalivaDirect™ también presenta ventajas en términos de recursos humanos y materiales. Al utilizar criterios de aceptabilidad y comparar el desempeño operativo del método de referencia y la prueba candidata, se optimiza el uso de los recursos disponibles en el laboratorio. Esto implica una mayor eficiencia en términos de tiempo y esfuerzo, ya que se prioriza la utilización de la prueba SalivaDirect™ la cual no es más confiable ni precisa que el *Gold Standard*, pero ofrece una alternativa equiparable en términos de diagnóstico para enfrentar las problemáticas más agudas como la falta de insumos, la rapidez de los resultados y el cuidado del personal sanitario.

Tanto la tabla de concordancia (tabla 14) como la tabla de confianza de Clopper-Pearson (tabla 15) proporcionaron resultados claros y confiables. La combinación de estos enfoques permite una evaluación completa de la eficacia y confiabilidad de la prueba diagnóstica, respaldando la toma de decisiones clínicas informadas y garantizando la calidad de la atención médica.

Otro aspecto relevante es la mejora significativa en la búsqueda de casos activos de COVID-19. La sensibilidad y especificidad obtenidas con esta metodología permiten identificar de manera temprana a los individuos infectados, incluso en etapas asintomáticas o leves de la enfermedad.

Además de los beneficios en términos de eficacia y detección temprana, es importante destacar el cuidado de la salud física y mental de los analistas de laboratorio. El síndrome de burnout emocional o síndrome del trabajador quemado es una preocupación creciente en entornos laborales exigentes como lo fueron los laboratorios de diagnóstico de COVID-19. El uso de un método eficaz y confiable reduce la carga de trabajo adicional asociada con la repetición de pruebas asociada a los resultados inconclusos. Esto puede contribuir a mitigar los factores de estrés y disminuir el riesgo de agotamiento emocional en los analistas de laboratorio, promoviendo así su bienestar y rendimiento laboral.

En un estudio realizado por el Departamento de Microbiología de la Universidad de Miami (Rainey et al., 2021) destaca un aspecto fundamental en la lucha contra la pandemia de COVID-19: la optimización de las estrategias de detección y vigilancia del virus SARS-CoV-2. La validación exitosa de un método de prueba PCR de saliva directa agrupada en un entorno universitario, comunidades semi cerradas, revela importantes resultados. Se determinó una mayor sensibilidad de la prueba de saliva agrupada superando a las pruebas diagnosticas

convencionales de hisopos orofaríngeos en sensibilidad; detectar eficazmente casos positivos en saliva sugiere su potencial para la detección temprana en poblaciones asintomáticas o presintomáticas. Además, la coherencia entre los resultados positivos en las pruebas de saliva y los hisopos orofaríngeos refuerza la confiabilidad clínica de la prueba de saliva agrupada. El estudio destaca la efectividad de la prueba PCR de saliva agrupada resaltando su utilidad en poblaciones asintomáticas además de plantear preguntas prácticas para abordar desafíos logísticos y económicos en la vigilancia de enfermedades infecciosas.

En conclusión, la implementación del método SalivaDirect™ para la detección de casos activos de COVID-19 tiene múltiples ventajas en términos de eficacia, optimización de recursos, búsqueda temprana de casos y cuidado de la salud de los analistas de laboratorio. Estas ventajas fueron fundamentales para enfrentar la pandemia de manera eficiente y garantizar un diagnóstico preciso y oportuno, brindando así una contribución significativa en la lucha contra la propagación del virus y el cuidado de la salud pública.

10 CONCLUSIONES

La validación y aplicación del método SalivaDirect™ para el diagnóstico de COVID-19 en el Laboratorio Clínico IC+ Medical de Los Ángeles se ha llevado a cabo de manera exitosa cumpliendo con el objetivo general planteado al comienzo de esta investigación. La efectividad del método SalivaDirect™ en la detección de casos activos de COVID-19 ha sido confirmada, evidenciando una alta precisión diagnóstica respaldada por sólidos parámetros de sensibilidad y especificidad. El método ha sido validado con una sensibilidad diagnóstica del 94,74% y una especificidad diagnóstica del 95,00% respecto del *Gold Standard*.

La optimización de recursos es un logro significativo del método SalivaDirect™. Al compararlo con el *Gold Standard*, SalivaDirect™ es altamente eficiente en términos de recursos humanos y materiales. Esto no solo resulta en ahorro de tiempo y esfuerzo, sino que también contribuye a una gestión mas efectiva de la información obtenida de los resultados.

Además de los aspectos técnicos y de eficacia, la implementación del método SalivaDirect™ también aborda el bien estar de los profesionales del laboratorio. Una menor probabilidad de contagio en la etapa de toma de muestra sumado a

la reducción de la carga de trabajo y el riesgo de agotamiento emocional contribuyen al cuidado de la salud mental y física de los analistas garantizando un ambiente laboral saludable.

11 REFERENCIAS

- Dabanch, J. (2021). Emergencia De Sars-Cov-2. Aspectos Básicos Sobre Su Origen, Epidemiología, Estructura Y Patogenia Para Clínicos. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 32(1), 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2020.12.003>
- De, D. E. J. (2021). Directrices de validación y RT-PCR en tiempo real desde de SARS-CoV-2 por técnica de verificación para la detección muestras de saliva. *Instituto de Salud Publica*, 24 de Febr, 6.
- Gómez-Carballa, A., Bello, X., Pardo-Seco, J., Martín-Torres, F., & Salas, A. (2020). Mapping genome variation of SARS-CoV-2 worldwide highlights the impact of COVID-19 super-spreaders. *Genome Research*, 30(10), 1434–1448. <https://doi.org/10.1101/GR.266221.120>
- Gonçalves, C. C. A., Barroso, S. P. C., Herlinger, A. L., Galliez, R. de M., de Almeida, T. B., Boullosa, L. T., Nascimento, E. R. D. S., de Almeida, J. M., da Costa, R. M. D. S. C., da Paixão, T. M., Couceiro, J. N. D. S. S., Frauches, T. S., de Souza, W. R., Costa, A. R., Faffe, D. S., Leitão, I. de C., da Silva, B. O., de Lira, G. S. A., de Almeida, I. L. C., ... Tanuri, A. (2021). COVID-19 diagnosis by RT-qPCR in alternative specimens. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 116(1), e210085. <https://doi.org/10.1590/0074-02760210085>
- Gorbalenya, A. E., Baker, S. C., Baric, R. S., de Groot, R. J., Drosten, C., Gulyaeva, A. A., Haagmans, B. L., Lauber, C., Leontovich, A. M., Neuman, B. W., Penzar, D., Perlman, S., Poon, L. L. M., Samborskiy, D. V., Sidorov, I. A., Sola, I., & Ziebuhr, J. (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*, 5(4), 536–544. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 181(2), 271-280.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., ... Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 395(10223), 497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
- Jackson, C. B., Farzan, M., Chen, B., & Choe, H. (2022). Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(1), 3–20. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>
- Langa, L. S., Sallent, L. V., & Díez, S. R. (2021). Interpretación de las pruebas diagnósticas de la COVID-19. *FMC Formacion Medica Continuada En Atencion Primaria*, 28(3), 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.fmc.2021.01.005>

- Lawyer, F. C., Stoffel, S., Saiki, R. K., Chang, S. Y., Landre, P. A., Abramson, R. D., & Gelfand, D. H. (1993). High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *Genome Research*, 2(4), 275–287. <https://doi.org/10.1101/gr.2.4.275>
- Morales-Angulo, C., González-Zubizarreta, R., Martín-Toca, G., Ramírez-Bonilla, A., Gonzalo-Margüello, M., & Rodríguez-Fernández, A. (2020). Toma de muestras nasofaríngeas para diagnóstico de COVID-19. *Revista ORL*, 11(4), 389–394. <https://doi.org/10.14201/orl.23079>
- Mullis, K. B., & Kyle, R. A. (2002). Kary B. Mullis—Nobel Laureate for Procedure to Replicate DNA. *Mayo Clinic Proceedings*, 77(7), 606. <https://doi.org/10.4065/77.7.606>
- N, van D., T, B., Morris DH, MG, H., Gamble A, BN, W., A, T., JL, H., NJ, T., SI, G., JOL, S., E, de W., & VJ., M. (2020). Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *New England Journal of Medicine*, 1–3.
- Ott, I. M., Strine, M. S., Watkins, A. E., Boot, M., Kalinich, C. C., Harden, C. A., Vogels, C. B. F., Casanovas-Massana, A., Moore, A. J., Muenker, M. C., Nakahata, M., Tokuyama, M., Nelson, A., Fournier, J., Bermejo, S., Campbell, M., Datta, R., Dela Cruz, C. S., Farhadian, S. F., ... Wyllie, A. L. (2020). Simply saliva: stability of SARS-CoV-2 detection negates the need for expensive collection devices. *MedRxiv : The Preprint Server for Health Sciences*. <https://doi.org/10.1101/2020.08.03.20165233>
- Pan, Y., Zhang, D., Yang, P., Poon, L. L. M., & Wang, Q. (2020). Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(4), 411–412. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30113-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30113-4)
- Pascolo, L., Zupin, L., Melato, M., Tricarico, P. M., & Crovella, S. (2020). TMPRSS2 and ACE2 Coexpression in SARS-CoV-2 Salivary Glands Infection. *Journal of Dental Research*, 99(10), 1120–1121. <https://doi.org/10.1177/0022034520933589>
- Pasomsub, E., Watcharananan, S. P., Boonyawat, K., Janchompoo, P., Wongtabtim, G., Sukswan, W., Sungkanuparph, S., & Phuphuakrat, A. (2021). Saliva sample as a non-invasive specimen for the diagnosis of coronavirus disease 2019: a cross-sectional study. *Clinical Microbiology and Infection*, 27(2), 285.e1-285.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.05.001>
- Protocolo de validación para la detección del virus SARS-CoV-2 en muestras de saliva mediante RT-PCR en tiempo real.* (n.d.).
- Rainey, A., Pierce, A., Deng, X., Actis, L. A., Smith, P., Kiss, A. J., & Wilson, T. J. (2021). Validation and deployment of a direct saliva real-time RT-PCR test on pooled samples for COVID-19 surveillance testing. *PLoS ONE*, 16(12 December), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261956>
- Rehman, S. U., Shafique, L., Ihsan, A., & Liu, Q. (2020). Evolutionary trajectory for the emergence of novel coronavirus SARS-CoV-2. *Pathogens*, 9(3), 1–13. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030240>
- Salud, M. D. E. (2009). *Reglamento Sobre Manejo De Residuos De Establecimientos De Atencion De Salud (Reas)*.

- Samsudin, C. M. (2020). No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における 健康関連指標に関する共分散構造分析Title. *Konstruksi Pemberitaan Stigma Anti-China Pada Kasus Covid-19 Di Kompas.Com*, 68(1), 1–12.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ndteint.2014.07.001><https://doi.org/10.1016/j.ndteint.2017.12.003><http://dx.doi.org/10.1016/j.matdes.2017.02.024>
- Soto, G. P. (2020). Presencia y Expresión del Receptor ACE2 (Target de SARS-CoV-2) en Tejidos Humanos y Cavidad Oral. Posibles Rutas de Infección en Órganos Orales Presence and Expression of ACE2 Receptor (Target of SARS-CoV-2) in Human Tissues and Oral Cavity. Possible Rout. *Int. J. Odontostomat*, 14(4), 501–507.
- Vizcaíno-salazar, G. J. (n.d.). *Importancia del cálculo de la sensibilidad, la especificidad y otros parámetros estadísticos en el uso de las pruebas de diagnóstico clínico y de laboratorio*. 28, 365–386.
- Vogels, C. B. F., Watkins, A. E., Harden, C. A., Brackney, D. E., Shafer, J., Wang, J., Caraballo, C., Kalinich, C. C., Ott, I. M., Fauver, J. R., Kudo, E., Lu, P., Venkataraman, A., Tokuyama, M., Moore, A. J., Muenker, M. C., Casanovas-Massana, A., Fournier, J., Bermejo, S., ... Grubaugh, N. D. (2021). SalivaDirect: A simplified and flexible platform to enhance SARS-CoV-2 testing capacity. *Med*, 2(3), 263-280.e6. <https://doi.org/10.1016/j.medj.2020.12.010>
- Yadav, T., & Saxena, S. K. (2020). *Transmission Cycle of SARS-CoV and SARS-CoV-2*. 2019, 33–42. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4814-7_4
- Zhou, Z., Huang, C., Zhou, Z., Huang, Z., Su, L., Kang, S., Chen, X., Chen, Q., He, S., Rong, X., Xiao, F., Chen, J., & Chen, S. (2021). Structural insight reveals SARS-CoV-2 ORF7a as an immunomodulating factor for human CD14+ monocytes. *IScience*, 24(3), 102187. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102187>
- Кускова, Д. С., & Немкова, Е. К. (2021). Сравнение Антибактериальных Функций Мезенхимальных Стромальных Клеток И Макрофагов in Vitro, “Вестник Центрального Научно-Исследовательского Института Туберкулеза.” *Вестник ЦНИИТ*, S1(2021), 12–13. <https://doi.org/10.7868/s2587667821050034>
- Островська, Б. В. (2022). Діти in Vitro: Українські Реалії Приватноправового Регулювання. *New Ukrainian Law*, 1, 64–70. <https://doi.org/10.51989/nul.2022.1.9>

Geo. F. Brooks, Karen C. Carroll, Janet S. Butel, Stephen A. Morse, Timothy A. Mietzner, Año, *Microbiología Médica*, edición 26,

COVID Live - Estadísticas de coronavirus - Worldometer. (n.d.). Retrieved June 12, 2022, from <https://www.worldometers.info/coronavirus/#countries>

12 ANEXOS

12.1 Anexo 1

Recolección de muestras de saliva (RT-qPCR-19)

Instrucciones para el paciente: Previo a que el paciente realice la toma de la muestra se deben tener las siguientes consideraciones:

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.

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 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 libres 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.

Nota: La muestra debe ser de saliva y no de esputo.

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.

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 la toma de muestra) de forma clara y legible.
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 a 8°C, hasta su análisis dentro de un periodo máximo de 5 días (se recomienda su análisis lo antes posible).
3. El transporte de las muestras debe realizarse de acuerdo con el sistema de triple embalaje según “Normativa Técnica para el transporte de Sustancias Infecciosas a Nivel Nacional”, utilizando unidades refrigerantes para mantención de la temperatura.

Fuente

Protocolo de Toma de Muestra en Saliva PCR ISP 15.01.2021-version-3.

12.2 Anexo 2

Registro de Extracción

F03 REGISTRO EXTRACCION RNA TOTAL COLUMNAS EZNA					
				N° lote	Vencimiento
ANALISIS DE RT-PCR	SARS-CoV-2		BUFFER LISIS TRK		
FECHA ANALISIS			ETANOL 75%		
RESPONSABLE ANALISIS			SOLUCION Lavado I		
SUPERVISOR DE CARGA			SOLUCION Lavado II		
			AGUA		
	CÓDIGO DE MUESTRA	OBSERVACIONES			
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24	CONTROL -				

Fuente:

Extracción de ARN Para Detección de SARS-CoV-2, Sistema de gestión de la calidad, IC+ Medical.

12.3 Anexo 3

NIVEL DE BIOSEGURIDAD DEL LABORATORIO

La descripción del diseño físico y operativo del Laboratorio IC+ Medical en relación con su nivel de bioseguridad se describe en el documento M2 Manual de Bioseguridad en el contexto de la protección de los analistas. Las mismas condiciones físicas y procedimientos redundan en la protección de los pacientes en el caso de que la toma de muestra se haga por el mismo personal. El diseño del Laboratorio y de los procedimientos operativos estándar (POE) que se realizan en él, se clasifican principalmente como de laboratorio básico de nivel de bioseguridad 2, con algunos aspectos de un laboratorio de contención de nivel de bioseguridad 3. El laboratorio cuenta con entrada de doble puerta y el acceso estará restringido solo al personal autorizado. Todo el personal al interior del laboratorio debe usar permanentemente elementos de protección personal (EPP) y llevará a cabo diariamente una rutina de limpieza y descontaminación. Una característica central del laboratorio que lo acerca a uno de Nivel 3 (contención), es que todos los procedimientos que involucran manipulación de material potencialmente infectivo se hacen bajo una cabina de seguridad biológica de clase II que posee sistemas de ultrafiltración (HEPA) tanto para la entrada de aire como para la salida. Los residuos biológicos, potencialmente peligrosos, que se generan en el laboratorio son retirados regularmente por una compañía especialista en su manejo.

ELEMENTOS DE PROTECCIÓN PERSONAL

El personal que realiza la toma de muestra usará los elementos de protección personal (EPP) que se especifican a continuación. Los siguientes elementos se deben usar de forma permanente durante todo el proceso de toma de muestra: Delantal blanco: Prenda de género blanco con el logo de la empresa que se debe usar de manera permanente sobre la ropa. Se debe usar siempre cerrado. Pechera: Prenda desechable de polietileno totalmente cerrada por delante con mangas y puños. Se debe usar siempre con las mangas totalmente abajo, los puños ajustados sobre las muñecas y anudada por la espalda. En caso de salpicaduras de material potencialmente infeccioso se debe desechar como desecho biológico peligroso y cambiar por uno nuevo. Mascarilla: Cubre bocas desechables de 3 pliegues que se usarán en todo momento durante la toma de muestras.

Guantes: Guantes de nitrilo que se cambiarán cada vez que se sospeche contaminación. Las manos son el vector principal de contagio por lo que el uso y cambio frecuente de guantes es esencial. Los siguientes elementos se usarán ocasionalmente según el criterio del muestreador, por ejemplo, durante muestreos que involucren una gran cantidad de personas en corto tiempo: Protector facial: Máscara transparente de policarbonato que cubre toda la cara del analista para evitar que este se la toque y para evitar que los aerosoles provenientes de un paciente lleguen a la cara. Los elementos

anteriores que se usan en procedimientos fuera del laboratorio no entrarán al laboratorio, así mismo los EPP que se usan dentro del laboratorio no deben salir de este.

PREPARACIÓN DEL PERSONAL El procedimiento de toma de muestras debe ser ejecutado únicamente por personal entrenado previamente y en estricto cumplimiento de los protocolos pertinentes en todo momento. La preparación del personal será demostrable mediante los registros que evidencien el conocimiento del presente manual y la compleción de las actividades de inducción para cada procedimiento particular.

MATERIAL DE MUESTREO Los tubos de toma de muestra serán siempre nuevos, nunca abiertos, certificados libre de nucleasas y manejados con doble empaque, como bolsas resellables nuevas, de modo que los pacientes siempre manipulan material nuevo y limpio. Los tubos son de uso único e individual y sólo serán manipulados por el paciente y el personal de muestreo (con guantes) al momento de la entrega de la muestra. Los contenedores de los tubos de muestra, como gradillas y coolers, se desinfectan con amonio cuaternario antes y después de ser usados.

PROCEDIMIENTO DE MUESTREO El procedimiento de muestreo se describe en detalle en el documento M5 Toma de Muestra de Saliva Para Detección de SARS-CoV-2, aquí solo se hará énfasis en los aspectos del procedimiento de muestreo que se deben cuidar para asegurar la seguridad de los pacientes. El personal de muestreo debe guiar a los pacientes para evitar aglomeraciones, se debe asegurar en todo momento la mantención de una distancia mínima de un metro entre ellos durante la espera y de dos metros durante la toma de la muestra. Justo antes de la manipulación de los tubos, todos los pacientes se deben desinfectar las manos con alcohol gel que será provisto por el personal de muestreo. No podrá haber intercambio de material entre los pacientes.

Fuente:

Manual de Prevención y Control de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud, Sistema de gestión de la calidad, IC+ Medical.

12.4 Anexo 4

Administración de la Emergencia

Para enfrentar las emergencias, el laboratorio cuenta con dos Líderes de Emergencia y/o Evacuación (uno será el oficial que recae en el cargo del director técnico de laboratorio y se tendrá además a un suplente); cuyas principales funciones incluyen:

- Tener el control de las emergencias producidas.
- Dirigir las acciones tendientes a lograr la superación de la emergencia.
- Evaluar el nivel de la emergencia para su clasificación.
- Dirigir la salida del personal, a través de las vías de evacuación pre-definidas.
- Asegurar la evacuación de todo el personal que labora y además considerar a las personas que pudiesen estar siendo atendidas en el box de toma de muestras y mantenerlos en la Zona de Seguridad designada.
- Impedir el regreso de las personas hasta la finalización de la emergencia.
- En caso de necesitar apoyo externo favor contactar según sea el caso a: bomberos, carabineros, Ambulancia.
- Colaborar en la atención primaria de lesionados, en la medida de lo posible.

El personal restante deberá:

- Estar atento y seguir la orden del líder de emergencia y evacuación.
- Colaborar en el control de la emergencia, en la medida de su responsabilidad y capacitación.
- Colaborar en la atención primaria de lesionados, en la medida de lo posible.

Notificación de la emergencia

Quien detecte una situación de emergencia, tiene la obligación de comunicarla inmediatamente al Líder de evacuación, el evaluará y aplicará de acuerdo con su cargo el control.

Para derrame residuo biológico

Aquí estamos ante la presencia solo de fluidos (saliva) humana, en donde ante una mala manipulación de la muestra podría generar un derrame la cual solo se controlará con limpieza de alcohol y cloro a través de toalla de papel.

Fuente:

Plan de Emergencia y Evacuación, Documento electrónico controlado, IC+ Medical.