

Evaluación de la detección de SARS-CoV2 por RT-qPCR en muestras de saliva de pacientes pediátricos

Sanluis Fenelli G¹, Domínguez P¹, Montoto Piazza L², Rial MJ³, Aprea V⁴, Labanca V¹, Ferreira JP¹, Bechara Aded C¹, Torres F¹

Resumen

Introducción: La prueba diagnóstica de referencia para SARS-Cov2 es la detección de ARN viral por PCR-RT, en muestras de hisopado nasofaríngeo (HNF). El HNF es invasivo e incluye riesgo de contagio para quien la toma, dada la posibilidad de aerosolización.

Objetivo: Evaluar la capacidad diagnóstica de la prueba de PCR para la identificación de SARS- CoV2 en saliva comparada con el HNF en niños.

Métodos: Estudio prospectivo de prueba diagnóstica, incluyendo pacientes de 1 mes a 18 años que cumplan con los criterios de caso sospechoso de COVID-19. Se comparó la detección de SARS-CoV2 en muestras de saliva con muestras nasofaríngeas, calculando sensibilidad, especificidad, valores predictivos y razones de verosimilitud. Se contó con la aprobación del Comité de Ética en Investigación de la institución.

Resultados: Se incluyeron 74 sujetos, con una mediana de edad de 2,9 años (IIC 0,6-11). De ellos, el 89,2% se consideraron leves; 9,4% asintomáticos y 1,4% moderados. La prevalencia de detección de SARS-CoV2 en HNF fue 81% (IC95%; 70-90), y en saliva

42% (IC95%; 34-58). La detección en muestras de saliva mostró sensibilidad de 57,4% (IC95%; 43-71) y especificidad de 100% (IC95%; 70-99).

Conclusión: La identificación de SARS-Cov2 por RT-qPCR a partir de muestras de saliva en niños mostró una baja sensibilidad comparada con el HNF.

Palabras clave: SARS-Cov2-COVID-19-Saliva-Prueba de Ácido Nucleico para COVID-19

Abstract

Background: The gold standard diagnostic test for SARS-Cov2 is the detection of viral RNA by RT-qPCR, in nasopharyngeal swab samples (NFS). NFS is invasive and includes a risk of contagion for operators, given the possibility of aerosolization.

Objective: To evaluate the diagnostic performance of the PCR test for identifying SARS-CoV2 in saliva compared to NFS, in children.

Methods: Diagnostic test study, including patients from 1 month to 18 years of age who meet the criteria for a COVID-19 suspected case. The detection of SARS-CoV2

¹ Docencia e Investigación, Hospital General de Niños Pedro de Elizalde

² Laboratorio de Biología Molecular, Hospital General de Niños Pedro de Elizalde

³ Laboratorio Central, Hospital General de Niños Pedro de Elizalde

⁴ Unidad Febril de Urgencia, Hospital General de Niños Pedro de Elizalde

Colaboradores: Martín Cassanelli², María Eugenia Martín², Gretel Wenk², Rocío Llames², Florencia Sanchez², Damián Prado Prado², Franco Morandi², Daniela Palavecino².

Correspondencia: Gabriela Sanluis Fenelli. Docencia e Investigación, Hospital General de Niños Pedro de Elizalde. Montes de Oca 40 (1270) Ciudad de Buenos Aires, Argentina. E-mail: gsanluisfenelli@buenosaires.gob.ar

Trabajo recibido el 30 agosto 2023 y aprobado el 11 noviembre 2023

Conflictos de interés: ninguno que declarar

Evaluación de la detección de SARS-CoV2 por RT-qPCR en muestras de saliva de pacientes pediátricos

in saliva samples was compared with nasopharyngeal samples, calculating sensitivity, specificity, predictive values, and likelihood ratios. The study was approved by the institution's Research Ethics Committee.

Results: 74 subjects were included, with a median age of 2.9 years (IQR 0.6-11). Of these, 89.2% were considered mild, 9.4% asymptomatic and 1.4% moderate. The prevalence SARS-CoV2 detection in NFS was 81% (95%CI; 70-90), and in saliva 42% (95%CI; 34-58). Detection in saliva samples showed a sensitivity 57.4% (95%CI; 43-71) and a specificity 100% (95%CI; 70-99).

Conclusion: Identification of SARS-Cov2 by RT-qPCR from saliva samples in children showed low sensitivity compared to NFS.

Keywords: SARS-Cov2-COVID-19-Saliva-COVID-19 Nucleic Acid Testing.

Introducción

En diciembre de 2019 el virus SARS-CoV2 causó una emergencia sanitaria en la Ciudad de Wuhan, China. La enfermedad se presentó con un cuadro clínico compatible con neumonía. La epidemia rápidamente se extendió al resto de los países del continente asiático y a Europa, con una letalidad de 2-3%.¹ El 11 de marzo de 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró una pandemia a partir de esta nueva enfermedad, denominada COVID-19.¹

El SARS CoV2 es un virus ARN, de transmisión interhumana, a través de secreciones respiratorias de individuos afectados. El virus se replica en las vías respiratorias, durante el período prodrómico, lo que contribuye a la transmisión de la enfermedad. La enfermedad en pediatría ha sido descrita en la mayoría de los reportes como una afección leve, con una prevalencia en reportes iniciales de alrededor de 2%.² Sin embargo, en nuestro medio los pacientes pediátricos con confirmación de COVID 19 alcanzaban el 15% al inicio de la pandemia.³

Dong et al. en su serie de 2.143 casos sospechosos de COVID 19, clasificaron a los pacientes pediátricos de acuerdo a la sintomatología en asintomáticos, leves a aquellos que presentaban síntomas de vía aérea superior, moderados a los que presentaban neumonía o fiebre persistente, severos a los que presentaban dificultad respiratoria o hipoxemia y críticos a los que presentaban

insuficiencia respiratoria, shock, encefalopatía, miocardiopatía o falla multiorgánica.⁴ El 19 de marzo de 2020, la OMS actualizó su guía provisional sobre las pruebas de laboratorio para la enfermedad por SARS-CoV-2. Hasta la fecha, la confirmación rutinaria de los casos de COVID-19 se basa en la detección del ácido nucleico (ARN) del virus mediante ensayos de RT-qPCR. Esta prueba diagnóstica puede efectuarse sobre diferentes muestras biológicas.⁵

Según las recomendaciones del Ministerio de Salud de Nación, a los niños con sospecha de COVID 19 se les realizaba a las 24 horas de iniciados los síntomas un hisopado nasofaríngeo, como patrón de oro. Eventualmente, en aquellos pacientes que requerían internación se realizaba además la pesquisa de los virus respiratorios estacionales, mediante inmunofluorescencia indirecta. Se consideró caso confirmado a todo paciente que presentaba genoma de SARS-CoV2 detectable por RT-qPCR y a todo paciente pediátrico con clínica compatible con síndrome inflamatorio multisistémico y que presente resultado positivo por RT-qPCR y/o serología positiva para SARS CoV-2.⁶

La saliva humana es un fluido corporal producido por las glándulas salivales. El SARS-CoV2, tiene tres formas de llegar a la saliva, una a través de las microgotas del tracto respiratorio inferior y superior, otra a través de la sangre por el líquido crevicular gingival y, la menos frecuente, a través de la infección local de la glándula salival y excreción del virus a través de la secreción salival.⁷

Las ventajas de la utilización de la saliva en pruebas diagnósticas radican en que es una técnica menos invasiva, menos displacentera, más segura para el personal de salud y que requiere un mínimo de entrenamiento específico para la toma de la muestra, incluso la recolección puede ser realizada por el mismo paciente.⁸

Aunque el estándar de oro para la detección de SARS-CoV2 es la RT-qPCR en muestras de HNF, investigaciones realizadas en población adulta sugieren una sensibilidad similar al HNF en muestras de saliva en las primeras semanas de los síntomas.⁹ Siendo la toma de muestra de saliva un procedimiento más sencillo, con menor riesgo de exposición para los trabajadores de la salud, es fundamental evaluar si es posible su utilización en la población pediátrica.

Objetivo

Evaluar la capacidad diagnóstica de la RT-qPCR en saliva para la identificación de SARS-CoV2 en niños, en comparación con la realizada a partir de muestras de hisopado nasofaríngeo.

Material y métodos

Diseño: Estudio prospectivo, de evaluación de prueba diagnóstica, comparando la capacidad de la RT-qPCR para identificar SARS-CoV2 a partir de muestras obtenidas de saliva y de HNF.

Población: El estudio se realizó en el Hospital General de Niños Pedro de Elizalde de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Aquellos pacientes de 1 mes a 18 años de edad que consultaban en el Departamento de Urgencias (Unidad Febril de Urgencia -UFU-), que cumplían criterio de caso sospechoso de COVID-19, fueron invitados a participar del estudio, durante el período comprendido entre el 01/08/2020 y el 28/02/2021. Se excluyeron pacientes inmunosuprimidos, con malformaciones anatómicas de la cavidad oral y/o vía aérea superior, trastornos deglutorios, traqueotomizados y aquellos pacientes con enfermedades pulmonares crónicas (enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística, etc).

Obtención de la muestra: Se tomó la muestra del HNF según los estándares de cuidado de la institución. La toma de muestra de saliva se realizó utilizando una pipeta tipo Pasteur estéril recolectando 1-2 ml de saliva en la región inferior de la lengua, y en el caso de los pacientes que colaboraban se obtenía muestra de esputo en forma directa en un recipiente contenedor estéril. Se colocó la saliva en un contenedor estéril como medio de transporte. La muestra se procesó en el mismo laboratorio que el HNF, con un intervalo no mayor a 12 horas desde la obtención de las muestras hasta el procesamiento de las mismas, refrigerándose y conservándose adecuadamente según protocolo del laboratorio.

Prueba diagnóstica: La confirmación estándar de la infección aguda por SARS-CoV-2 se basa en la detección de secuencias virales específicas, mediante pruebas de amplificación de ácidos nucleicos, como la reacción en cadena de la polimerasa por transcripción inversa en tiempo real (RT-qPCR). Se extrajo el ARN viral con los sistemas automatizados Chemagic™ 360

(PerkinElmer) o GenePure Pro Nucleic Acid Purification System NPA-32P (Bioer). Se realizó RT-qPCR con los reactivos Genefinder, que amplifican genes específicos RdRp (polimerasa dependiente de ARN), gen E (envoltura), gen N (nucleocápside) en termocicladores de PCR en tiempo real Cobas® Z480 (Roche®) o Quant Gene 9600 (Bioer), se consideró detectable toda muestra con cycle threshold (CT) \leq 40.¹⁰ En todas las muestras de nuestro estudio se pesquió genoma viral por RT-qPCR.¹¹

Variables a controlar: En todos los casos se registró la edad, el tiempo de duración del primer síntoma (en días) y la gravedad de la enfermedad, según Dong.⁴

Tamaño muestral: Considerando alcanzar una sensibilidad del 90% y una especificidad del 99%, asumiendo un margen de error de 7,5% y un nivel de confianza de 95% se estimó un tamaño muestral mínimo de 69 sujetos. Epidat 4.0 OPS.⁹

Aspectos éticos: El estudio cumple con los requerimientos éticos y legales de la Ley 3301 del Gobierno de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Se solicitó el correspondiente consentimiento/asentimiento informado de los participantes o sus responsables legales, según correspondiera. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Hospital General de Niños Pedro de Elizalde.

Resultados

Durante el período en estudio, se reclutaron 74 sujetos con criterio de caso sospechoso de COVID-19, con una mediana de edad de 2,9 años (IIC 0,6-11). El 89,2% de los casos presentaron una forma leve, 1,4% moderados y el 9,4% fueron asintomáticos. El 75% de los sujetos presentaron fiebre como síntoma principal. El tiempo de evolución de los síntomas fue de 1 día (IIC 0-2). La prevalencia de la enfermedad detectada a través de las muestras de HNF fue de 81% (IC95%; 70-90) y en saliva 42% (IC95%; 34-58). No se pudieron procesar 8/74 muestras de saliva por tratarse de una muestra escasa. Las muestras de saliva se obtuvieron con un ayuno previo de al menos 1 hora.

Al comparar el desempeño de las muestras de saliva considerando el HNF como patrón de oro se obtuvo una sensibilidad de 57,4% (IC95%; 43-71) y especificidad de 100% (IC95%; 70-99) el resto de los indica-

dores de desempeño de la prueba diagnóstica en saliva se muestran en la tabla 1.

Discusión

En nuestro estudio, la pesquisa de SARS-CoV2 en muestras de saliva de niños sospechosos de COVID-19 mostró una sensibilidad limitada (57%) y una elevada especificidad (100%) al compararla con la pesquisa por hisopado nasofaríngeo.

Durante la pandemia, en nuestra población pediátrica, se fueron estableciendo distintos criterios de internación. Al comienzo de la misma, los menores de 24 meses, y luego se modificó a menores de 12 meses, se internaban por criterio epidemiológico de aislamiento y control clínico, aunque fueran asintomáticos. En nuestro estudio el 9,4% de los pacientes que fueron asintomáticos, con HNF detectable para SARS CoV2.⁶

Fougère y col. realizaron un estudio prospectivo observacional multicéntrico, reclutando 397 pacientes con muestras de HNF y saliva donde realizaron RT-qPCR para SARS-CoV2. Obtuvieron una positividad de 22,9% en saliva, 25,4% en HNF. Usando el HNF como patrón de referencia, describieron una sensibilidad en muestras de saliva del 85,2% (IC95; 78,2–92,1).^{12,13}

Lai y col. también compararon la detección de SARS-Cov2 utilizando los dos tipos de muestras, y hallaron similar capacidad de detección (kappa 0,83). Sin embargo, encontraron que la posibilidad de detectar el virus en muestras de saliva disminuye más precozmente que en las nasofaríngeas. Aunque no consideramos esta variable, dado que la mayoría de nuestros pacientes eran sintomáticos, es posible que tuvieran un tiempo de evolución considerable, haciendo que la positividad de las muestras salivales disminuyera.¹⁴

En 2016, Kim y col. evaluaron diferentes virus respiratorios en muestras nasofaríngeas y de saliva de 236 sujetos sin encontrar diferencias significativas en la capacidad diagnóstica entre ambos tipos de muestras analizadas.¹⁵

En un estudio que incluyó 200 pacientes adultos con COVID-19 sintomáticos, Pasomsub y col. encontraron que la muestra de saliva podría ser una alternativa para la detección de SARS-CoV2 por PCR-RT.¹⁶

En un estudio pediátrico, Diani y colaboradores también encontraron una mayor sensibilidad (80%) en la detección en muestras salivales en relación a las obtenidas por HNF, pero en los 256 sujetos incluidos, la tasa de positividad fue de sólo 5% y 6%, respectivamente. Estos valores, muy inferiores a los obtenidos por nosotros (80%) muestra que el criterio para incluir los sujetos probablemente fue diferente y esto podría haber afectado el desempeño de la prueba diagnóstica.¹⁷

Aún con las limitaciones y diferencias mostradas, nuestro estudio aporta información sobre un método diagnóstico alternativo. Además, no hemos encontrado otro reporte nacional en pediatría en pacientes sintomáticos, remarcando la importancia de contar con experiencias locales.¹⁸

A pesar que se han evaluado diferentes muestras para la pesquisa de SARS-Cov 2 por PCR como diagnóstico de certeza de COVID-19 (orofaríngeas, salivales, nasales), la muestra obtenida del HNF sigue constituyendo el patrón de oro.¹⁹

Conclusión

En la muestra estudiada, la pesquisa de SARS-Cov2 por RT-qPCR en muestras de saliva mostró una sensibilidad limitada.

Referencias

1. Coronavirus disease outbreak. World Health Organization, 2020. En: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>.
2. Hasan A, Mehmood N, Fergie J. Coronavirus Disease (COVID-19) and Pediatric Patients: A Review of Epidemiology, Symptomatology, Laboratory and Imaging Results to Guide the Development of a Management Algorithm. *Cureus*. 2020 Mar 31;12(3):e7485.
3. Ministerio de Salud Argentina. Boletín integrado de vigilancia. En: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/biv_502_se_26_15-7.pdf
4. Dong Y, Mo X, Hu Y, et al. Epidemiology of COVID-19 Among Children in China. *Pediatrics*. 2020; 145(6):e20200702.2

5. WHO. Directrices de Laboratorio para la Detección y el Diagnóstico de la Infección con el Virus COVID-19. En: Toma de muestras y envío adecuado).
6. Ministerio de Salud. Vigilancia, diagnóstico y manejo institucional de casos en pediatría)
7. Sri Santosh T, Parmar R, Anand H, et al.. A Review of Salivary Diagnostics and Its Potential Implication in Detection of Covid-19. *Cureus*. 2020; 12(4):e7708.
8. Tran K, Cimon K, Severn M, et al. Aerosol generating procedures and risk of transmission of acute respiratory infections to healthcare workers: a systematic review. *PLoS One*. 2012;7(4):e35797.
9. Organización Mundial de la Salud. (2020). Pruebas diagnósticas para el SARS-CoV-2: orientaciones provisionales, 11 de septiembre de 2020. Organización Mundial de la Salud. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/335830>.
10. Inserto Genefinder. Consulta Online octubre 2023: download (fda.gov).
11. Hanson KE, Caliendo AM, Arias CA, et al. Infectious Diseases Society of America Guidelines on the Diagnosis of COVID-19. *Clin Infect Dis*. 2020; ciaa760.
12. Fougère Y, Schwob JM, Miauton A, et al. Performance of RT-PCR on Saliva Specimens Compared With Nasopharyngeal Swabs for the Detection of SARS-CoV-2 in Children: A Prospective Comparative Clinical Trial. *Pediatr Infect Dis J*. 2021; 40(8):e300-e304.
13. Jamal AJ, Mozafarihashjin M, Coomes E, et al. Invasive Bacterial Diseases Network COVID-19 Investigators. Sensitivity of Nasopharyngeal Swabs and Saliva for the Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Clin Infect Dis*. 2021 Mar 15;72(6):1064-1066.
14. Lai J, German J, Hong F, et al. Comparison of Saliva and Midturbinate Swabs for Detection of SARS-CoV-2. *Microbiol Spectr*. 2022; 10(2):e0012822.
15. Kim YG, Yun SG, Kim MY, et al. Comparison between Saliva and Nasopharyngeal Swab Specimens for Detection of Respiratory Viruses by Multiplex Reverse Transcription-PCR. *J Clin Microbiol*. 2016 Dec 28;55(1):226-233.
16. Pasomsub E, Watcharananan SP, Boonyawat K, et al. Saliva sample as a non-invasive specimen for the diagnosis of coronavirus disease 2019: a cross-sectional study. *Clin Microbiol Infect*. 2021;27(2):285.e1-285.e4.
17. Diani E, Silvagni D, Lotti V, et al. Evaluation of saliva and nasopharyngeal swab sampling for genomic detection of SARS-CoV-2 in children accessing a pediatric emergency department during the second pandemic wave. *Front Microbiol*. 2023; 14:1163438.
18. Reyes NS, Rodriguez PE, Ricarte C, et al. Shedding of infectious SARS-CoV-2 in two asymptomatic children. *Excreción de SARS-CoV-2 infeccioso en dos niños asintomáticos*. *Medicina (B Aires)*. 2023 ;83(2):185-189.
19. Lee RA, Herigon JC, Benedetti A, et al. Performance of Saliva, Oropharyngeal Swabs, and Nasal Swabs for SARS-CoV-2 Molecular Detection: a Systematic Review and Meta-analysis. *J Clin Microbiol*. 2021; 59(5):e02881-20.

Anexos

Tabla 1. Indicadores de desempeño de RT-qPCR en muestras de saliva comparada hisopado nasofaríngeo como prueba diagnóstica.

Sensibilidad	57,4% (IC95%; 43-71)
Especificidad	100% (IC95%; 70-99)
Valor predictivo positivo	100% (IC95%; 86-100)
Valor predictivo negativo	34,3% (IC95%; 20-52)
Razón de verosimilitud negativa	0,43 (IC95%; 0,31-0,58)