

Estudio preliminar de un enjuague bucal de solución salina como muestra diagnóstica para SARS-CoV-2

Preliminary study of a saline mouthwash as a diagnostic sample for SARS-CoV-2

Samuel Suarez-Mendez¹,  Carlos García-Vázquez²,  David del Valle-Laveaga³, 
Isela Esther Juárez-Rojop⁴,  Jesús Arturo Ruiz-Quiñones⁵ 

DOI: 10.19136/hs.a20n3.4297

Artículo Original

• Fecha de recibido: 6 de febrero de 2021 • Fecha de aceptado: 9 de marzo de 2021 • Publicado en línea: 1 de julio de 2021

Autor de Correspondencia:

Jesús Arturo Ruiz Quiñones. Dirección postal: Carretera La Isla
Km 1 + 300 (42, 38 km), C.P. 86126, Villahermosa, Tabasco, México.
Correo electrónico: drjesusruiz@gmail.com

Resumen

Objetivo: Evaluar la utilidad de un enjuague bucal con solución salina (EBSS) como muestra diagnóstica para la detección de SARS-CoV-2 en pacientes ambulatorios.

Material y métodos: Este fue un estudio prospectivo realizado en el Hospital Regional de Alta Especialidad “Dr. Juan Graham Casasús”, se seleccionaron 34 muestras aleatorias pareadas EBSS/MNF (enjuague bucal con solución salina/muestra (clínica) de la nasofaringe) que se recolectaron durante la visita al centro de evaluación ambulatoria de dicho hospital. Las muestras se analizaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR) y se calculó la concordancia entre EBSS y MNF, la sensibilidad y especificidad del EBSS.

Resultados: De las 34 muestras pareadas EBSS/MNF, 14 fueron positivas para SARS-CoV-2; 4 muestras de EBSS y 10 muestras de MNF. Los resultados concordantemente positivos en las muestras pareadas EBSS/MNF fueron 3 y las medias de CT de cada gen (RdRp, N, E) no mostraron diferencia significativa entre las muestras. Se observaron 8 discordancias entre los dos tipos de muestras (7 individuos dieron positivo por MNF y 1 por EBSS). La concordancia observada entre EBSS y MNF fue aceptable (coeficiente kappa 0.31). La sensibilidad de EBSS fue de 30% con una especificidad del 95.8%.

Conclusiones: La sensibilidad de EBSS no es comparable con la sensibilidad de MNF para la detección de SARS-CoV-2, pero nuestros datos sugieren al EBSS como una herramienta no invasiva, permite la autocolectión y no requiere personal de salud capacitado para su muestreo: asimismo, esta muestra podría ser alternativa ante la escasez de hisopos y medios de transporte viral. Además, el EBSS puede tener beneficio para poblaciones remotas, vulnerables o facilitar las pruebas a un gran número de individuos.

Palabras clave: COVID-19; Coronavirus; Enjuague bucal; sensibilidad.

Abstract

Objective: To assess the usefulness of a saline mouth rinse (SMR) as a diagnostic tool for the detection of SARS-CoV-2 in outpatients.

Method: This was a prospective study carried out at the Hospital Regional de Alta Especialidad “Dr. Juan Graham Casasús”, 34 SMR/SNP (saline mouth rinse/sample (clinical) of nasopharyngeal) randomized paired samples were selected and collected in the outpatient clinic. The samples were analyzed by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and the concordance between SMRs and SNP samples and the sensitivity and specificity of SMR were calculated.

Results: Out of the 34 SMR/SNP paired samples, 14 samples were positive for SARS-CoV-2; 4 SMR samples and 10 SNP samples. We found 3 positive concordant results in the SMRs/SNP paired samples, the mean CT for each gene (RdRp, N, E) did not show a significant difference between the samples. Eight discrepancies were observed between the two types of samples (7 individuals were positive by SNP and 1 for SMR). The concordance observed between SMR and SNP was acceptable (kappa coefficient 0.31). The sensitivity of EBSS was 30% with a specificity of 95.8%.

Conclusions: The SMR sensitivity is not comparable with SNP sensitivity for SARS-CoV-2 detection, but our data suggest SMR as a non-invasive tool that allows self-collection, and it does not require health trained personnel for its collection. Also, this sample could be an alternative to the lack of swabs and/or viral transportation media. Additionally, SMR may be of benefit in remote and vulnerable populations, and/or to facilitate the screening of SARS-CoV-2 in a large number of individuals.

Key words: COVID-19; Coronavirus; Mouthwashes; Sensitivity.

¹ Químico Farmacéutico Biólogo. Maestro en Ciencias Básicas Biomédicas. Doctor en Ciencias Biomédicas. Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales y Emergentes. Hospital Regional de Alta Especialidad “Dr. Juan Graham Casasús”, División Académica de Ciencias de la Salud, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco, México.

² Médico. Maestro en Ciencias Biomédicas. Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales y Emergentes. Hospital Regional de Alta Especialidad “Dr. Juan Graham Casasús”, Villahermosa, Tabasco, México.

³ Químico Farmacéutico Biólogo. Maestro en Ciencias Básicas Biomédicas. Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales y Emergentes. Hospital Regional de Alta Especialidad “Dr. Juan Graham Casasús”. División Académica de Ciencias de la Salud, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco, México.

⁴ Químico Farmacéutico Biólogo. Maestra en Ciencias Básicas Biomédicas. Doctora en ciencias de Investigación en Medicina. División Académica de Ciencias de la Salud, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco, México.

⁵ Médico. Especialista en Infectología. Jefe del Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales y Emergentes. Hospital Regional de Alta Especialidad “Dr. Juan Graham Casasús”, Villahermosa, Tabasco, México.

Introducción

La enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) es causada por el síndrome respiratorio agudo severo por coronavirus 2 (SARS-CoV-2) y fue reportada en diciembre de 2019 por primera vez en Wuhan (China)¹. El SARS-CoV-2 se propagó por el mundo; al 21 de enero de 2021 se reportó 95, 612, 831 casos confirmados y 2, 066, 176 muertes reportadas en el mundo². En México, el reporte es de 1, 711, 283 casos y 146, 174 defunciones³. Los síntomas más comunes asociados a COVID-19 son fiebre, tos, disnea, expectoración, dolor de cabeza y mialgia o fatiga. Sin embargo, son muchos los portadores asintomáticos que hace que el SARS-CoV-2 sea más transmisible⁴. La principal característica clínica de los casos graves de COVID-19 está asociada a la neumonía atípica grave con síndrome de dificultad respiratoria aguda. Además, se tiene más riesgo de contraer una forma grave de COVID-19 en pacientes ancianos o si se padece una enfermedad crónica como: tensión arterial alta, diabetes, cardiopatías, accidente cerebrovasculares, afecciones respiratorias crónicas y cánceres⁵. En este sentido, la OMS refiere que las pruebas diagnósticas para COVID-19 son fundamentales para controlar la pandemia.

Las pruebas estándar para el diagnóstico de SARS-CoV-2 requieren una muestra (clínica) de la nasofaringe (MNF)⁶; sin embargo, la recolección es incómoda para el paciente, se requiere un profesional de salud capacitado que use equipo de protección personal y una alta cantidad de consumo de hisopos y medios de transporte viral⁷. Por lo tanto, surge una necesidad de estrategias en la toma de muestras que tenga un rendimiento aceptable para el diagnóstico de SARS-CoV-2 y evite las limitaciones de MNF. Por lo tanto, nuestro objetivo fue evaluar la sensibilidad y especificidad de un enjuague bucal con solución salina (EBSS) como muestra diagnóstica para la detección de SARS-CoV-2, comparado con el método recomendado (MNF), en pacientes ambulatorios.

Materiales y métodos

El presente estudio fue realizado en el Hospital Regional de Alta Especialidad "Dr. Juan Graham Casasús" en Villahermosa, Tabasco, México. A las personas adultas (>18 años) que asistían al centro de evaluación ambulatoria del hospital con síntomas sospechosos de COVID-19 (tos seca, fiebre, dolor de cabeza, disnea, mialgia, entre otros), con tiempo de evolución indistinto o tuvieron contacto previo con casos positivos, se les tomaron MNF para la prueba de SARS-CoV-2 y se solicitó su consentimiento para enjuagarse la boca con un volumen de 5 mL de solución salina, en un recipiente estéril que se almacenó a 4 °C hasta su procesamiento. Las MNF fueron procesadas 3 horas después de la toma de la muestra, una vez que se obtuvieron los resultados de las MNF, se seleccionaron aleatoriamente

34 y se identificaron las muestras de EBSS pareadas para ser analizadas, 24 horas después de la toma de la muestra. El ácido ribonucleico (ARN) de las muestras se aisló y purificó mediante el kit de extracción de ácidos nucleicos virales, IBI Scientific, EE.UU. La amplificación se realizó con el GeneFinder™ COVID-19 Plus RealAmp Kit, una reacción constituida por 10 µl de mezcla de reacción COVID-19 Plus, 5 µl de mezcla de sonda COVID-19 Plus y 5 µl de ARN, control positivo o control negativo. Para detectar SARS-CoV-2 se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR) Applied Biosystems QuantStudio 5. Una muestra se definió como positiva para SARS-CoV-2 cuando se observó una curva de amplificación sigmoidea para el gen RdRp, gen N o gen E, con valores del umbral de ciclo (C_T) ≤ 40 (Tabla 1)⁸.

Tabla 1. Interpretación de resultados para GeneFinder™

RdRp	Genes			Resultado del ensayo
	N	E	C.I	
≤ 40	≤ 40	≤ 40	≤ 35	COVID-19 positivo
≤ 40	≤ 40	I.D	≤ 35	COVID-19 positivo
≤ 40	I.D	≤ 40	≤ 35	COVID-19 positivo
≤ 40	I.D	I.D	≤ 35	COVID-19 positivo
I.D	≤ 40	≤ 40	≤ 35	COVID-19 positivo
I.D	≤ 40	I.D	≤ 35	COVID-19 positivo
I.D	I.D	I.D	≤ 35	COVID-19 negativo

I.D: Indeterminado; C.I: Control interno

Fuente: Elaboración propia a partir del inserto de GeneFinder™ COVID-19 Plus

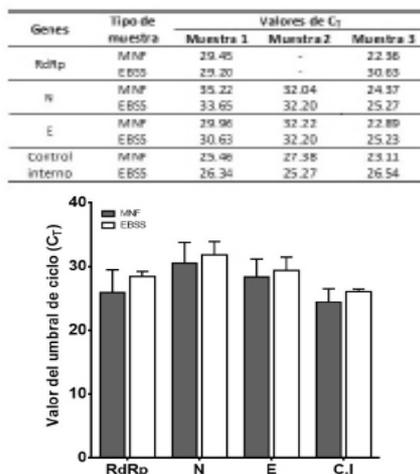
Los datos numéricos se expresaron como media \pm desviación estándar; los datos categóricos se expresaron como porcentaje (%). Se utilizó el coeficiente kappa para estimar la concordancia entre los resultados de detección de SARS-CoV-2 de EBSS y MNF⁹. Asimismo, se utilizó la prueba t-Student's para comparar los valores de C_T . La sensibilidad y especificidad del EBSS se calculó utilizando el número total de muestras positivas de MNF como estándar de referencia. El nivel de significancia empleado fue de $p < 0.05$ para todos los análisis. Todos los datos se analizaron con SPSS v. 23.

Resultados

Un total de 34 muestras pareadas EBSS/MNF de pacientes con sospecha de COVID-19 se incluyeron en el análisis final. La edad media de los individuos estudiados fue de 39.76 \pm 11.97 (rango 19-69), 21 (61.9%) eran mujeres y 13 (38.2%) hombres. En las muestras pareadas EBSS/MNF fueron 14 los resultados positivos para SARS-CoV-2; 4 (11.8%) muestras de EBSS y 10 (29.4%) de MNF. Únicamente tres pacientes resultaron concordantemente positivos por PCR para muestras de EBSS y MNF; las medias de C_T en las muestras de EBSS correspondieron a gen RdRp 28.45 \pm

0.75; gen N 31.80 ± 2.10 ; y gen E 29.35 ± 2.11 . Asimismo, las medias de C_T en MNF fueron gen RdRp 25.91 ± 3.54 ; gen N 30.54 ± 3.22 ; y gen E 28.36 ± 2.81 . Las medias de C_T de cada gen (RdRp, N, E) entre las muestras de EBSS y MNF concordantemente positivas no mostraron diferencia significativa (Figura 1).

Figura 1. Media del umbral de ciclo (C_T) de los genes RdRp, N, E entre las muestras pareadas EBSS/ MNF concordantemente positivas para SARS-CoV-2. * $p < 0.05$ significativamente diferente con respecto a MNF, determinado por la prueba t-student's.



Fuente: Elaboración propia

Por otra parte, 8 de las 34 muestras pareadas EBSS/MNF eran discordantes, 1 individuo positivo para EBSS fue negativo para MNF y 7 individuos positivos para MNF resultaron negativos para EBSS (Tabla 2 y 3). El grado de concordancia entre EBSS y MNF fue aceptable con un coeficiente kappa = 0.31; IC del 95%: 0.10-0.51 (Tabla 4). La sensibilidad de EBSS fue de 30% (IC del 95%: 0.06 a 0.65) con una especificidad del 95.8% (IC del 95%: 0.78 a 0.99). Cabe mencionar que los resultados negativos para SARS-CoV-2 fueron más frecuentes; 30 (88.2%) muestras de EBSS y 24 (70.6%) de MNF.

Tabla 2. Resultados de la detección de SARS-CoV-2, en muestras pareadas

EBSS	MNF		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	3	1	4
Negativo	7	23	30
Total	10	24	34

EBSS/MNF MNF: muestra (clínica) de la nasofaringe; EBSS: enjuague bucal de solución salina

Tabla 3. Resultados discordantes entre las muestras pareadas EBSS/MNF

Resultados	Valores C_T de MNF				Valores C_T de EBSS				
	MNF	EBSS	Genes	Control interno	RdRp	N	E	Control interno	
Muestra 1	+	-	ND	33.07	29.42	26.34	ND	ND	23.44
Muestra 2	+	-	ND	33.31	29.94	24.55	ND	ND	28.74
Muestra 3	+	-	29.20	33.55	27.43	23.95	ND	ND	26.81
Muestra 4	+	-	ND	36.06	31.95	25.64	ND	42.08	25.12
Muestra 5	+	-	ND	32.07	27.75	26.94	ND	ND	26.97
Muestra 6	+	-	ND	32.65	33.07	26.76	ND	ND	26.90
Muestra 7	+	-	24.74	24.44	21.60	26.52	ND	ND	22.18
Muestra 8	-	+	ND	46.01	ND	22.65	ND	31.89	35.20

+: Positivo; -: Negativo; MNF: muestra (clínica) de la nasofaringe; EBSS: enjuague bucal de solución salina; ND: no detectado

Fuente: Elaboración propia

Tabla 4. Valoración del coeficiente kappa

Coficiente kappa	Fuerza de concordancia
0.00	Pobre (<i>Poor</i>)
0,01-0,20	Leve (<i>Slight</i>)
0,21-0,40	Aceptable (<i>Fair</i>)
0,41-0,60	Moderado (<i>Moderate</i>)
0,61-0,80	Considerable (<i>Substantial</i>)
0,81-1,00	Casi perfecta (<i>Almost perfect</i>)

Entre paréntesis, la expresión original en inglés

Fuente: Elaboración propia modificado de Landis y Koch⁹

Discusión

La infección activa de SARS-CoV-2 se transmite a través de gotículas de saliva o mucosa. Algunos estudios sugieren que la detección de SARS-CoV-2 en saliva, es una alternativa a los métodos de diagnóstico de hisopos estándar^{10, 11, 12}. No obstante, existen diversos inconvenientes para analizar la saliva: volumen insuficiente; diferente viscosidad y consistencia de las muestras que requieren diluciones adicionales; la preparación de la saliva es más laboriosa; las muestras mucoides son difícil de pipetear, lo que requiere un mezclado vigoroso¹³. Todo esto podría resultar en un falso negativo; sin embargo, Kandel y colaboradores¹³ sugieren no afectar la sensibilidad de la saliva. Nosotros observamos que el EBSS no presenta ningún inconveniente durante su procesamiento, es de fácil recolección, las instrucciones son mínimas, y se evita la presencia de un profesional de salud. Además, la solución salina al 0.9% como parte del EBSS se usó como medio de transporte viral. En este sentido, Rodino y colaboradores¹⁴ reportaron que los hisopos nasofaríngeos almacenados en solución salina al 0.9% hasta siete días a temperaturas de 2-8 °C y -20 °C, no mostraron pérdida de sensibilidad y estabilidad para la detección de SARS-CoV-2, sugiriendo a la solución salina al 0.9% como alternativa de medio de transporte viral.

Encontramos que la sensibilidad de EBSS para detectar SARS-CoV-2 es del 30% (IC del 95%: 0.06 a 0.65) y una sensibilidad del 95.8% (IC del 95%: 0.78 a 0.99), con un grado de concordancia aceptable con respecto a MNF. Además, las medias de C_T de cada gen (RdRp, N, E) entre las muestras pareadas EBSS/MNF concordantemente positivas, no mostraron diferencia significativa. A pesar de la baja sensibilidad del EBSS, el presente estudio es el primer reporte en evaluar la utilidad de EBSS como muestra diagnóstica para SARS-CoV-2.

Nuestro estudio presenta algunas limitaciones: Primero, el tamaño de la muestra es pequeño. Segundo, no evaluamos la estabilidad de SARS-CoV-2 en el EBSS. Tercero, el rendimiento del EBSS se midió solamente con un kit de detección para SARS-CoV-2, resultado que podría variar con otros kits comerciales para la detección de SARS-CoV-2 con sensibilidad analítica diferente.

Conclusión

Nuestro estudio muestra que el rendimiento del EBSS no es comparable con MNF para la detección de SARS-CoV-2; sin embargo, es una herramienta de autocolecta simple, no invasivo, evita la necesidad de hisopos y medio de transporte viral, no requiere personal capacitado ni equipo de protección personal y se puede realizar en cualquier entorno, siendo ésta una ventaja en su uso en países con recursos limitados o en situaciones como la escasez de material por desabasto en la distribución o producción de los mismos. Además, las muestras de EBSS pueden ser de particular beneficio para agilizar la identificación de los casos donde se generen brotes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen intereses en competencia.

Financiamiento

Los autores no recibieron fondos para este trabajo.

Referencias

1. Younes N, Al-Sadeq DW, Al-Jighefee H, Younes S, Al-Jamal O, Daas HI, et al. Challenges in Laboratory Diagnosis of the Novel Coronavirus SARS-CoV-2. *Viruses*. 2020;12(6):582. <https://doi.org/10.3390/v12060582>.
2. World Health Organization. WHO: Coronavirus disease 2019 (COVID-19). [Internet]. 2021 [cited 2021 Jan 21]. Disponible en: <https://covid19.who.int/>.

3. Secretaria de Salud. SSA: Enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19). [Internet]. 2021 [citado 21 de enero 2021]. Disponible en: [Comunicado_Tecnico_Diario_COVID-19_2021.01.21.pdf](https://www.gob.mx/comunicado- tecnico-diario- covid-19_2021.01.21.pdf) (www.gob.mx)

4. Quan C, Li C, Ma H, Li Y, Zhang H. Immunopathogenesis of Coronavirus-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS): Potential Infection-Associated Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Clin Microbiol Rev*. 2020;34(1):e00074-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00074-20>.

5. Dhama K, Khan S, Tiwari R, Sircar S, Bhat S, Malik YS, et al. Coronavirus Disease 2019-COVID-19. *Clin Microbiol Rev*. 2020;33(4): e00028-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00028-20>.

6. Hong KH, Lee SW, Kim TS, Huh HJ, Lee J, Kim SY, et al. Guidelines for Laboratory Diagnosis of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in Korea. *Ann Lab Med*. 2020;40(5):351-60. <https://doi.org/10.3343/alm.2020.40.5.351>.

7. Azzi L, Carcano G, Gianfagna F, Grossi P, Gasperina DD, Genoni A, et al. Saliva is a reliable tool to detect SARS-CoV-2. *J Infect*. 2020;81(1):e45-e50. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.04.005>

8. Reina J, Suarez L. Evaluación de diferentes genes en la detección por RT-PCR del SARS-CoV-2 en muestras respiratorias y su evolución en la infección. *Rev Esp Quimioter*. 2020;33(4):292-3. <https://doi.org/10.37201/req/045.2020>.

9. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159-74. <https://doi.org/10.2307/2529310>.

10. Caulley L, Corsten M, Eapen L, Whelan J, Angel JB, Antonation K, et al. Salivary Detection of COVID-19. *Ann Inter Med*. 2021;174(1):131-3. <https://doi.org/10.7326/M20-4738>.

11. Czumbel LM, Kiss S, Farkas N, Mandel I, Hegyi A, Nagy Á, et al. Saliva as a Candidate for COVID-19 Diagnostic Testing: A Meta-Analysis. *Front Med*. 2020;7:465. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00465>.

12. To KK, Tsang OT, Yip CC, Chan KH, Wu TC, Chan JM, et al. Consistent Detection of 2019 Novel Coronavirus in Saliva. *Clin Infect Dis*. 2020;71(15):841-3. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa149>.

13. Kandel C, Zheng J, McCready J, Serbanescu MA, Racher H, Desaulnier M, et al. Detection of SARS-CoV-2 from Saliva as Compared to Nasopharyngeal Swabs in Outpatients. *Viruses*. 2020;12(11):1314. <https://doi.org/10.3390/v12111314>.
14. Rodino KG, Espy MJ, Buckwalter SP, Walchak RC, Germer JJ, Fernholz E, et al. Evaluation of Saline, Phosphate-Buffered Saline, and Minimum Essential Medium as Potential Alternatives to Viral Transport Media for SARS-CoV-2 Testing. *J Clin Microbiol*. 2020;58(6):e00590-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00590-20>.