

Detección del SARS-CoV-2 mediante RT-qPCR utilizando saliva en pacientes ambulatorios con estudio de COVID-19

SARS-CoV-2 detection by RT-qPCR using saliva in outpatients tested for COVID-19

Cecilia Perret P¹, Katia Abarca¹, Sandra Solari¹, Pablo Aguilera¹, Diego García-Huidobro^{1,2}, Felipe Olivares³, Carlos Palma³, Ana María Contreras², Constanza Martínez-Valdebenito¹ y Marcela Ferrés¹

¹Escuela de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.

²Department of Family and Community Medicine, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota, Estados Unidos.

³Red de Salud UC.

Estudio financiado parcialmente por el Ministerio de Salud de Chile y parcialmente por el Departamento de Enfermedades Infecciosas e Inmunología Pediátricas. Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile y el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas y Virología Molecular, Red de Salud UC CHRISTUS.

Todos los autores revelan que no tienen afiliaciones o participación en ninguna organización o entidad con interés financiero alguno o interés no financiero en el tema o los materiales discutidos en este manuscrito.

Recibido: 23 de mayo de 2022 / Aceptado: 27 de julio de 2022

Resumen

Introducción: La pandemia de COVID-19 ha afectado a millones de personas en todo el mundo. La identificación de sujetos infectados ha sido importante para el control. **Objetivo:** Evaluar el rendimiento de una reacción de polimerasa en cadena (RPC) cuantitativa en tiempo real (en inglés: RT-qPCR) para SARS-CoV-2, utilizando saliva como matriz en comparación con un hisopado nasofaríngeo (HNF). **Metodología:** Se reclutaron adultos en atención ambulatoria, la mayoría sintomáticos. Fueron estudiadas 530 muestras pareadas de saliva e HNF con RT-qPCR. **Resultados:** Fueron positivas 59 muestras de HNF y 54 de saliva. La sensibilidad con saliva fue 91%, especificidad 100%, el valor predictor positivo (VPP) 100%, valor predictor negativo (VPN) 98%. El índice Kappa fue de 0,95 y LR-0,08. En promedio, el umbral de ciclo (en inglés *cycle threshold-CT*) de la saliva fue 3,99 puntos más alto que los de HNF ($p < 0,0001$) mostrando que la carga viral (CV) es menor en saliva. La carga viral en ambas disminuyó con el tiempo después del inicio de los síntomas. El muestreo de saliva fue preferido por los sujetos en lugar de HNF. **Conclusión:** Este estudio demuestra que la RPC para SARS-CoV-2 utilizando saliva, es adecuada para el diagnóstico de COVID-19 en adultos ambulatorios, especialmente en la etapa temprana de los síntomas.

Palabras clave: COVID-19; diagnóstico; SARS-CoV-2; RT-PCR; saliva; hisopado nasofaríngeo; carga viral de SARS-CoV-2; umbral de ciclo de SARS-CoV-2.

Abstract

Background: The COVID-19 pandemic has affected millions of people around the world. Part of control strategies is testing a large proportion of the population to identify and isolate the infected subjects. **Aim:** To evaluate the SARS-CoV-2 detection by the performance of a reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) against SARS-CoV-2, using saliva as a matrix compared to a nasopharyngeal swab (NPS) to simplify obtaining a diagnostic sample. **Methods:** Adults in outpatient care were recruited, 95% of them symptomatic. We studied 530 paired saliva and NPS samples by SARS-CoV-2 RT-qPCR. **Results:** Fifty-nine individuals tested positive in NPS and 54 in saliva samples. Sensitivity for saliva sample was 91%, specificity 100%, positive predictive value (PPV) 100%, negative predictive value (NPV) 98%. The Kappa index was 0.95 and LR-0.08. On average, the cycle threshold (CT) of saliva was 3.99 points higher than those of NPS ($p < 0.0001$) showing that viral load (VL) is lower in saliva than in NPS. Viral load in both decreased over the time after onset of symptoms. Saliva sampling was preferred by subjects instead of NPS. **Conclusion:** This study demonstrates that SARS-CoV-2 RT-qPCR using saliva, even with lower VL, is suitable for the diagnosis of COVID-19 in outpatient adults, especially at early stage of symptoms.

Keywords: COVID-19 testing; COVID-19 nucleic acid testing; SARS-CoV-2 RT-PCR; saliva; nasopharyngeal swab; SARS-CoV-2 viral load; SARS-CoV-2 cycle threshold.

Correspondencia a:

Cecilia Perret Pérez
cperret@uc.cl

Introducción

COVID-19 surge en el mundo a finales de 2019 en China y fue declarada pandemia en marzo de 2020 por la OMS. Desde entonces, ha evolucionado en varias olas epidémicas en prácticamente todos los países, confirmando en el momento de escribir este artículo, más de 500 millones de casos y más de 6 millones de muertes en todo el mundo¹. Para controlar la pandemia, los países han optado por diferentes medidas y estrategias para contener la acelerada progresión en el número de casos. A pesar de ello, persiste una intensa circulación viral, agravada por la aparición de diferentes variantes del virus SARS-CoV-2 con mayor transmisibilidad o evasión inmune.

Sin duda, el diagnóstico masivo y oportuno, con el objetivo de identificar a los transmisores, es una de las estrategias más críticas para el control. La identificación de casos de COVID-19 se ha basado principalmente en el uso de las técnicas de reacción de polimerasa en cadena (RPC) cuantitativa con transcripción reversa (en inglés: RT-qPCR) en HNF, muestra considerada como el estándar de oro, principalmente por el papel en el diagnóstico de otros patógenos respiratorios². Sin embargo, al necesitar pruebas masivas, frecuentes y rápidas, este método tiene algunas dificultades. Algunas de ellas fueron inicialmente el quiebre de *stock* de suministros de muestreo, adicionado a la necesidad de tener personal capacitado, el uso de equipos de protección personal (EPP) y, en la percepción del paciente, las molestias asociadas con el muestreo, especialmente en la población pediátrica y en aquellos que deben someterse a las pruebas en varias ocasiones por motivos de trabajo o viaje.

Para hacer frente a estas dificultades, la muestra de saliva para el diagnóstico ha surgido como una alternativa al HNF, debido a la facilidad de muestreo, e incluso puede ser auto-tomada. En este escenario de auto-toma, las ventajas del uso de saliva sobre el HNF son más relevantes al no necesitar de personal capacitado ni de EPP. Varios estudios han evaluado su desempeño como recurso diagnóstico, aunque los resultados son diversos debido a la falta de estandarización en la fase pre-analítica³⁻⁵.

Diversos estudios que evalúan la utilidad de la saliva para el diagnóstico se basan en pacientes hospitalizados con un pequeño número de participantes^{6,7}. Por esta razón, decidimos evaluar la utilidad de la saliva como muestra diagnóstica de COVID-19 utilizando RT-qPCR SARS-CoV-2 en una población de sujetos consultantes en el ámbito ambulatorio, en comparación con HNF como estándar de oro.

Materiales y Métodos

Diseño

Se trata de un estudio transversal, durante dos momentos de la pandemia en Chile, uno de baja y otro de alta

transmisión comunitaria (número reproductivo 0,7 y 1,5, respectivamente) de septiembre de 2020 a marzo de 2021. Durante el primer período predominó la cepa ancestral B1 y Wuhan, y durante el segundo período la variante gamma P1. Todos los participantes fueron consultantes en dos centros de diagnóstico ambulatorio y tres Servicios de Urgencia de la Red de Salud UC-CHRISTUS, en Santiago, Chile.

Participantes

Se invitó a participar a personas de 18 años y más, que consultaron por síntomas sugerentes de COVID-19 en el servicio de urgencias o que contaban con prescripción médica para realizar la prueba RPC de COVID-19 en las unidades de diagnóstico ambulatorio. Los participantes no debían haber consumido alimentos o líquidos, excepto agua, efectuado ni el lavado de dientes o fumado, en los 30 minutos previos a la toma de las muestras.

Procedimientos

Después de firmar el consentimiento informado, se tomó una muestra de saliva seguida de HNF. Los participantes con un resultado positivo recibieron un cuestionario en línea para evaluar la presencia y el tipo de síntomas y los días de progresión de la enfermedad. Además, el cuestionario evaluó la aceptabilidad de la muestra de saliva e HNF.

Recolección de muestras

El personal de salud instruyó a los participantes a salivar en un tubo Falcon® de 15 ml con 2 ml de medio de transporte universal (MTU). No se solicitó un volumen mínimo de saliva. Luego, la enfermera obtuvo la muestra de HNF también en un tubo Falcon con 2 ml de MTU. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente en el sitio de muestreo y se transfirieron al Laboratorio de Infectología y Virología Molecular en la Red Salud UC-CHRISTUS a temperaturas entre 4 y 8° C.

RT-qPCR

En ambas muestras se realizó, en forma paralela, RT-qPCR de SARS-CoV-2. La extracción de ARN de saliva y del HNF se realizó en un sistema automatizado. Se utilizaron 250 µl de saliva, a los que previamente se añadieron perlas de vidrio y fueron agitadas por al menos 10 segundos. Para el proceso de extracción, se utilizó el kit *Mag-Bind RNA extraction*® (Maccura) en el equipo *Auto-Pure32A Nucleic Acid Purification System*® (Maccura). Como proceso de respaldo, se utilizó el kit *DA0630 RNA-DNA Purification Kit (Magnetic Bead)*® (Da An Gene) en el equipo *Smart-32* (Da An Gene) y se corrió en paralelo con el *Auto-Pure32A* (Maccura).

Se agregó un control de extracción de ARN, que consiste en ARN del virus de la artritis equina (EAV), a

cada muestra. Para la amplificación RT-qPCR, se utilizó el kit *LightMix® SARS-CoV-2 RdRP plus EAV control* (TibMolBiol, cat. 53-0777-96). Este RT-qPCR de un solo paso, está diseñado para amplificar un fragmento de 87 pb de longitud del gen de la ARN polimerasa dependiente de ARN del SARS-CoV-2 (gen RdRP). La amplificación ocurre en un proceso de transcripción reversa (RT) y RPC en un solo paso en un termociclador en Tiempo Real, LightCycler® 480 II (ROCHE). En todas las corridas se incluyó un control negativo, un control positivo y un control interno que detecta el ARN de EAV.

Estimación de carga viral

Para cada muestra se registró el CT de RdRp como una aproximación a la carga viral y ésta se determinó con una curva estándar utilizando un calibrador comercial, Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Standard®, número de catálogo SKU: COVID19, que contiene 200.000 copias/ml de ARN viral de los genes E, N, ORF1ab, RdRP y S.

Utilizando la curva estándar, que considera en su cálculo no sólo el proceso de RT-PCR sino también la extracción de ácidos nucleicos, pudimos determinar con precisión la carga viral entre los CT 16 y 37. El límite superior de cuantificación es en el CT 16 y corresponde a una carga viral de 670.438.914 copias/ml. El límite inferior de cuantificación es en el CT 37 y corresponde a 1.523 copias/ml. El límite de detección (LDD) se fijó en CT = 40 ya que CT > 40 corresponde a una muestra negativa. El CT 40 está fuera del rango para calcular con precisión la carga viral a partir de la curva estándar. Si extrapolamos los valores de la curva, en CT 40 la concentración correspondería a aproximadamente 238 copias/ml, por lo que es probable que el LDD del ensayo esté alrededor de esa cifra.

Cabe destacar que la carga viral estimada a partir de los valores de CT es sólo una aproximación y que no considera la variabilidad propia de los distintos fluidos como la cantidad de células y volúmenes. Sin embargo, al llevar la detección de genoma viral a número de copias/mL, con ayuda de una curva estándar, nos permite hacer comparable una muestra con otra. La comparación de las cargas virales estimadas se realizó con los logaritmos, por tener menor variabilidad o incertidumbre que el valor absoluto en copias/ml.

El resultado del RT-qPCR se clasificó como positivo, indeterminado y negativo. Una muestra se definió como positiva con CT ≤ 37, indeterminada con valores de CT > 38 a 40 y negativa con CT > 40 o sin amplificación.

Análisis de datos

Se realizó un análisis estadístico descriptivo, incluyendo promedios y porcentajes. Las comparaciones bivariables de variables categóricas y continuas se realizaron mediante pruebas de χ^2 y t de student. Las variables con-

tinuas se expresaron como media y desviación estándar y se compararon mediante t-test pareado, de dos colas y la prueba paramétrica U-test Mann-Whitney indicada para tamaños muestrales pequeños y con distribución probablemente distinta de lo normal. Para estimar la sensibilidad, la especificidad, los valores predictores positivos (VPP), los valores predictores negativos (VPN), los cocientes de probabilidad, kappa de Cohen (coeficiente K) y sus intervalos de confianza (IC) de 95%, se excluyeron las muestras con resultado indeterminado. Se utilizó como estándar de oro el RT-qPCR en HNF. Se consideró estadísticamente significativo un valor de p de dos colas < 0,05. Para los análisis gráficos, se utilizó el paquete Prism 6.

Tamaño muestral

El tamaño muestral requerido para la validación de RT-qPCR SARS-CoV-2 utilizando una nueva matriz como la saliva, se basó en la recomendación del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) y el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) de incluir al menos 50 muestras verdaderamente positivas (VP) (detectadas positivamente conjuntamente por el método de referencia y candidato) y 50 muestras negativas detectadas por el método de referencia^{8,9}.

Aprobación ética

Este proyecto fue revisado y aprobado por el Comité Ético Científico de Ciencias de la Salud de la Pontificia Universidad Católica de Chile (ID200630020).

Resultados

Participantes

Durante el período de estudio, se reclutaron 536 individuos, entre 18 y 90 años, de los cuales 82,7% eran provenientes de las unidades de tomas de muestras. La edad media de los participantes fue de 41,5 años ± 14,9 y 262 eran mujeres (48,9%). Cincuenta y nueve participantes fueron diagnosticados con COVID-19 con un promedio de edad 43,5 ± 16,1 (22 - 83 años). Veintiocho eran mujeres (47,4%).

Muestreo de saliva y aceptabilidad

El volumen de saliva espontáneo recogido por 528 participantes fue en promedio 1,4 ml con una mediana de 1,5 ml (0,1-7,0 ml). El volumen promedio de saliva en 53 muestras positivas fue de 1,1 ml (0,1-3,0 ml), sin diferencias con el volumen recogido en las muestras negativas. Cuarenta (88,9%) de los 45 participantes que completaron la encuesta para casos de COVID-19 respondieron que preferían la saliva como muestra diagnóstica en comparación con HNF.

Rendimiento de RT-qPCR en muestras de saliva para el diagnóstico de COVID-19

Entre los 536 sujetos estudiados, la tasa de positividad de HNF fue de 11% (59 muestras), seis muestras fueron indeterminadas y 471 muestras negativas. En las muestras de saliva, la tasa de positividad fue de 10% (54 muestras), 2 indeterminadas y 480 negativas. La concordancia general fue de 526/536 (98%) entre los dos tipos de muestra. De las 10 muestras discordantes, 4 muestras de saliva fueron negativas con su par de HNF positivas, 1 muestra fue indeterminada con su par de HNF positiva y 5 fueron negativas con su par de HNF indeterminadas (Tabla 1).

Cincuenta y nueve sujetos fueron diagnosticados con COVID-19 por HNF y 54 por muestras de saliva. De los 59 sujetos positivos, 42,4% provenía de las unidades de toma de muestra con orden médica de RPC COVID-19 y 57,6% de consulta en servicios de urgencia. La sensibilidad general de RT-qPCR en saliva fue 91,5% (IC 95%: 81,32-97,19%), la especificidad 100% (IC 95%: 99,23-100%), el VPP 100%, el VPN 98,2% (IC 95%: 87-99,20%), el LR negativo 0,08 (IC 95%: 0,04-0,20) y tuvo una precisión de 98,47% (IC 95%: 97,04-99,33%). Kappa de Cohen: 0,95.

La sensibilidad de la RPC en la saliva se redujo a 66,6% cuando el valor de CT en HNF fue ≥ 30 , mientras que cuando el valor de CT en HNF fue < 30 , la sensibilidad aumentó al 96%.

Análisis de CT y carga viral

Se analizaron en las muestras pareadas los valores de CT de RdRp, como aproximación de la carga viral de SARS-CoV-2, incluyendo resultados positivos e indeterminados ($n = 65$). Los valores promedios de CT en HNF y saliva fueron de $23,98 \pm 7,65$ (rango 14,29-40) y $27,97 \pm 5,45$ (rango 14,85-40), respectivamente, con una diferencia de 3,99 (IC 95%: 1,56 a 6,41), $p < 0,0001$ (Figura 1a). En 55 (84,6%) muestras pareadas, el valor de CT en HNF fue más bajo que en saliva, sugiriendo una carga viral más alta mientras que en 10 (18%) pares de muestra, la carga fue más alta en las muestras de saliva (Figura 2).

La carga viral se analizó sólo en muestras positivas, el promedio en HNF fue $\text{Log } 7,05 \pm 1,68$ en comparación con $\text{Log } 5,78 \pm 1,42$ en saliva, $p < 0,0001$ (Figura 1b).

Tabla 1. Resultados de RT-qPCR de SARS-CoV-2 en 536 muestras pareadas de HNF y saliva

		HNF			Total
		Positivo	Negativo	Indeterminado	
Saliva	Positivo	54	0	0	54
	Negativo	4	471	5	480
	Indeterminado	1	0	1	2
	Total	59	471	6	536

HNF = hisopado nasofaríngeo.

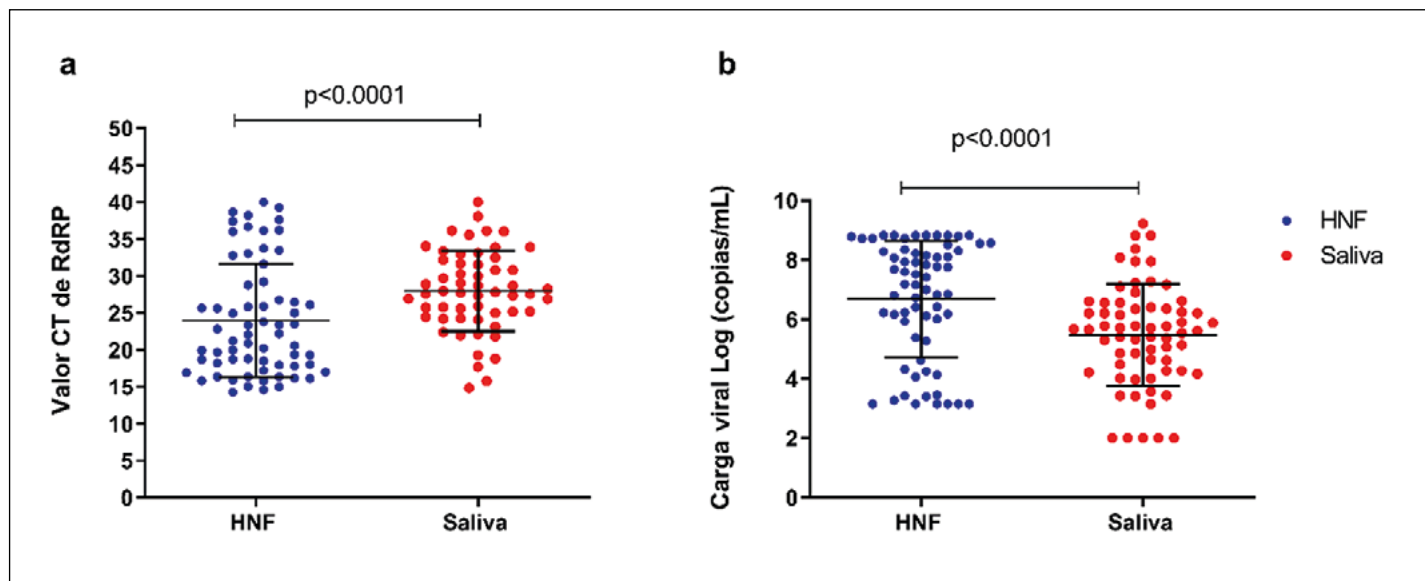


Figura 1. Comparación de los valores de CT y de carga viral del SARS-CoV-2 en muestras pareadas de HNF y saliva. **(a)** Los valores de CT del gen RdRp en HNF (puntos azules) y saliva (puntos rojos) en 65 pares de muestras, incluidos resultados positivos e indeterminados. El promedio de CT en HNF es de 23,98 y en saliva es de 27,97; **(b)** Carga viral en 59 pares de muestras. La CV media en HNF es Log 7,05 copias/ml, la CV media en saliva es Log 5,78 copias/ml. Las líneas horizontales son la media $\pm$ desviación estándar, CT = cycle threshold, HNF = hisopado nasofaríngeo, RdRP = ARN polimerasa dependiente de ARN.

La media de CT en HNF, cuando tanto las muestras de HNF como las de saliva fueron positivas, fue menor en comparación a cuando sólo las muestras de HNF fueron positivas ($21,86 \pm 5,71$ vs. $29,40 \pm 9,45$, $p = 0,0580$) (Figura 3). Nueve (15%) de los HNF positivos y 17 (31%) de las salivas positivas tuvieron un CT ≥ 30 ; IC 95%: 0,47 a 30,96, $p = 0,043$.

Pacientes con COVID-19

De los 59 casos de COVID-19, presentaron síntomas 56 (94,9%) pacientes. De éstos, 53 (95%) fueron positivos

tanto en HNF como en saliva. Dos de los tres pacientes asintomáticos con HNF positivo tuvieron resultados negativos en saliva.

Al momento del diagnóstico, los sujetos sintomáticos presentaban en promedio $3,13 \pm 3,01$ días de síntomas, 37 (66%) se tomaron la RPC dentro de los primeros tres días del inicio de la enfermedad, 15 (27%) entre 4 y 7 días y 4 (7,1%) después de 7 días de síntomas.

El tipo y la proporción de síntomas en los 56 pacientes sintomáticos se muestran en la Tabla 2. Los síntomas más comunes fueron mialgias y cefalea. Los síntomas menos frecuentes fueron dolor abdominal y vómitos.

Carga viral según sintomatología

Entre los 56 pacientes sintomáticos, el promedio de CT en HNF fue $22,09 \pm 5,98$ (rango 14,29-36,2) y en saliva fue $27,54 \pm 5,15$ (rango 14,85-40), con una diferencia de 5,45 (IC 95%: 3,33 a 7,57) ($p < 0,0001$). La carga viral promedio en HNF en pacientes sintomáticos fue Log $7,16 \pm 1,59$ vs. Log $5,72 \pm 1,37$ copias/ml, $p < 0,0001$ en saliva. El valor promedio de CT en HNF en sujetos asintomáticos fue de $30,21 \pm 8,78$, más alto que en los sujetos sintomáticos, aunque no se realizó el análisis estadístico por ser sólo tres sujetos.

La media de los valores de CT según el tipo de síntoma se muestran en la Tabla 2. En HNF los sujetos con odinofagia tuvieron la carga viral más alta, promedio Log $7,98 \pm 0,84$ copias/ml, y el valor más bajo de CT, $18,99 \pm 3,34$, $p = 0,025$. Los sujetos sintomáticos que presentaron náuseas (promedio CV Log $5,85 \pm 1,57$ copias/ml y CT $27,06 \pm 5,82$) tuvieron el valor de CV más baja y CT más alto al comparar con el valor promedio en los sintomáticos ($p = 0,025$). Los sujetos con vómitos (promedio CV Log $4,56 \pm 1,97$ copias/ml y CT $31,86 \pm 7,32$) también mostraron cargas virales más bajas, aunque no se realizó análisis estadístico por ser sólo tres sujetos. En la saliva, esto también se observó, aunque sin significación estadística.

Carga viral según días de evolución

Los valores de CT en HNF y saliva fueron incrementando en la medida que aumentaron los días de síntomas. Tanto para HNF como para saliva, el valor más bajo de CT ocurrió un día antes del inicio de los síntomas en un sujeto, como se observa en la Figura 4a. Durante los primeros tres días de síntomas, en el HNF la media de CV fue Log $7,65 \pm 1,56$ y en saliva Log $5,98 \pm 1,59$. Después de siete días, en HNF disminuyó a Log $5,08 \pm 1,52$ y en saliva a Log $4,4 \pm 0,47$ con una diferencia estadísticamente significativa con $p = 0,0119$ y $p = 0,0308$, respectivamente. Los valores promedios de CT y CV entre HNF y saliva fueron estadísticamente diferentes dentro de los primeros siete días de los síntomas (Figura 4b). Los valores medios de CT y CV en HNF y saliva según los días de síntomas se muestran en la Tabla 3.

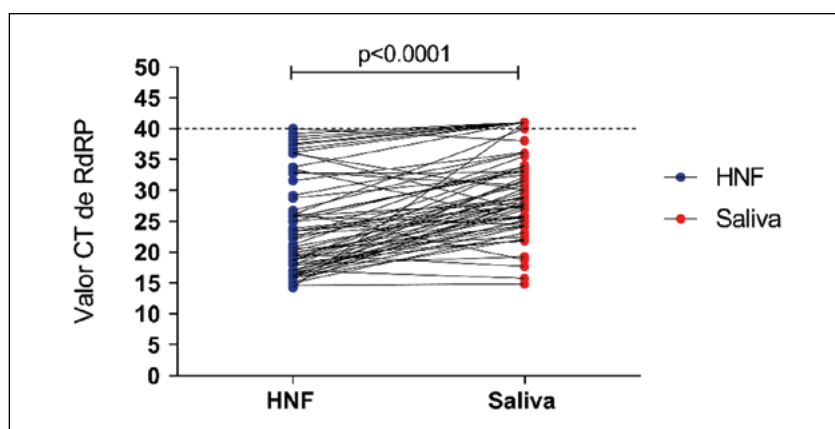


Figura 2. Comparación de los valores de CT de RT-qPCR para SARS-CoV-2 en 65 pares de muestras de HNF y saliva. Valor de CT de RdRP para muestras pareadas de HNF (puntos azules) y saliva (puntos rojos). Cada línea representa el espécimen correspondiente emparejado. La línea discontinua en CT = 40 corresponde al punto de corte del ensayo, CT = cycle threshold, HNF = hisopado nasofaríngeo, RdRP = ARN polimerasa dependiente de ARN.

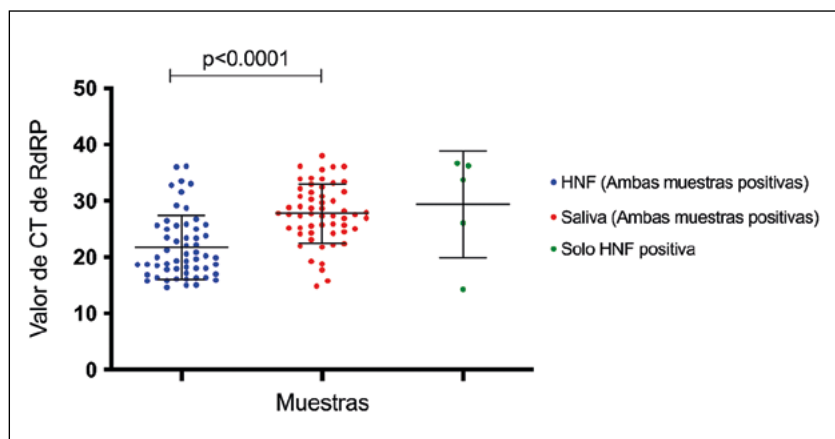


Figura 3. Comparación de los valores de CT de RdRP entre 59 muestras pareadas de HNF y saliva en casos de COVID-19. Valores de CT en HNF cuando tanto el HNF como la saliva fueron positivos (puntos azules), valores de CT de saliva cuando tanto HNF como saliva fueron positivos (puntos rojos) y valores de CT en HNF cuando sólo el HNF fue positivo (puntos verdes). Las líneas horizontales indican la media y la desviación estándar. La media para cada grupo es: $21,86 \pm 5,71$; $27,56 \pm 5,1$ y $29,40 \pm 9,45$, para HNF (ambos positivos), saliva (ambos positivos) e HNF (sólo HNF positivos), respectivamente. CT = cycle threshold, HNF = hisopado nasofaríngeo, RdRP = ARN polimerasa dependiente de ARN.

Tabla 2. Frecuencia de síntomas y valores de CT en 56 pacientes sintomáticos al momento del diagnóstico de COVID-19

Síntomas	n	(%)	Valor CT HNF promedio $\pm$ DE	Valor CT saliva promedio $\pm$ DE
Sintomáticos	56	(100)	22,09 $\pm$ 6,04 ^{a,b}	27,77 $\pm$ 5,38
Mialgias	46	(82,1)	21,63 $\pm$ 5,73	27,85 $\pm$ 5,21
Cefalea	40	(71,4)	21,51 $\pm$ 5,73	27,6 $\pm$ 5,62
Fiebre	34	(60,7)	21,78 $\pm$ 6,31	28,52 $\pm$ 5,67
Tos	34	(60,7)	21,57 $\pm$ 6,42	26,97 $\pm$ 4,88
Astenia	32	(57,1)	22,74 $\pm$ 5,84	28,74 $\pm$ 4,46
Coriza	25	(44,6)	21,69 $\pm$ 6,15	29,17 $\pm$ 4,14
Anorexia	25	(44,6)	22,07 $\pm$ 5,76	28,91 $\pm$ 4,73
Odinofagia	22	(39,3)	18,99 $\pm$ 3,34 ^a	26,56 $\pm$ 3,85
Calofríos	22	(39,3)	21,96 $\pm$ 6,30	28,13 $\pm$ 4,54
Anosmia	15	(26,8)	21,93 $\pm$ 6,00	29,74 $\pm$ 4,87
Ageusia	14	(25,0)	21,88 $\pm$ 6,03	29,46 $\pm$ 5,42
Dolor torácico	11	(19,6)	23,69 $\pm$ 6,91	29,53 $\pm$ 5,03
Diarrea	10	(17,9)	25,90 $\pm$ 5,73	27,61 $\pm$ 5,21
Náuseas	9	(16,1)	27,06 $\pm$ 5,82 ^b	30,32 $\pm$ 4,99
Disnea	8	(14,2)	23,55 $\pm$ 7,69	28,80 $\pm$ 3,93
Disfonía	8	(14,2)	18,71 $\pm$ 3,34	29,97 $\pm$ 3,15
Dolor abdominal	7	(12,5)	22,60 $\pm$ 5,75	29,20 $\pm$ 5,57
Vómitos	3	(5,4)	31,86 $\pm$ 7,32	29,40 $\pm$ 0,78

^aDiferencia 3,1 (IC 95%: -5,8211 a -0,3789, p = 0,026); ^bdif 4,97 (IC 95%: 0,6551 a 9,2849; p = 0,025).

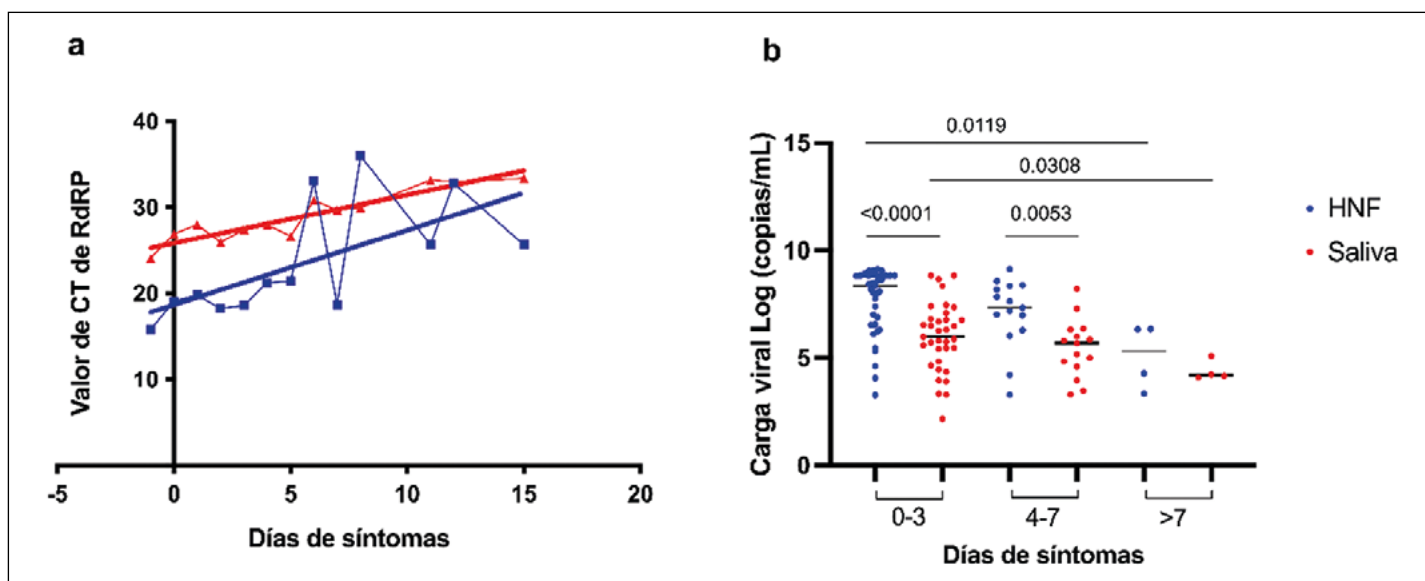


Tabla 3. Comparación de los valores de CT de RdRP y carga viral en 56 muestras pareadas de HNF y saliva en pacientes sintomáticos según los días de evolución al momento del diagnóstico

Días de síntomas	CT en HNF promedio $\pm$ DE	CT en saliva promedio $\pm$ DE	IC 95% valor p	Carga viral HNF (Log, copias/mL) promedio $\pm$ DE	Carga viral de saliva (Log, copias/mL) promedio $\pm$ DE	IC 95% valor p
0-3	20,83 $\pm$ 5,7 ^a (n = 37)	26,84 $\pm$ 5,68 ^b (n = 35)	3,33 a 8,69 p < 0,0001	7,65 $\pm$ 1,56 ^c	5,98 $\pm$ 1,59 ^d	-2,41 a -0,93 p < 0,0001
4-7	23,1 $\pm$ 5,53 (n = 15)	28,71 $\pm$ 4,63 (n = 15)	1,80 a 9,42 p = 0,0053	7,1 $\pm$ 1,61	5,46 $\pm$ 1,35	-2,75 a -0,52 p = 0,0053
> 7*	30,01 $\pm$ 5,21 ^a (n = 4)	32,36 $\pm$ 1,61 ^b (n = 4)	p = 0,482	5,08 $\pm$ 1,52 ^c	4,4 $\pm$ 0,47 ^d	p = 0,4857

^aDiferencia estadística entre el valor de CT de HNF de los primeros 3 días y > 7 días de síntomas p = 0,0132. ^bdiferencia entre el valor de CT en saliva de los primeros 3 días y > 7 días de síntomas p = 0,0252; ^cdiferencia entre la CV de HNF de los primeros 3 días y > 7 días de síntomas p = 0,0119; ^ddiferencia entre la CV de saliva de los primeros 3 días y > 7 días de síntomas p=0,0308. *Para la comparación estadística de promedios con la serie de > 7 días se utilizó la prueba paramétrica Mann-Whitney.

Discusión

El avance de la pandemia ha exigido que los servicios de salud cuenten con métodos capaces de diagnosticar oportunamente los casos y que se puedan aplicar a gran escala. La posibilidad de uso de la saliva como muestra alternativa al HNF para el diagnóstico del SARS-CoV-2, surge al principio de la pandemia tomando en cuenta que en las glándulas salivales existen receptores ACE2, utilizados por el virus SARS-CoV-2 para su entrada a las células, teniendo en ellas una replicación activa¹⁰. La presencia del virus SARS-CoV-2 se ha demostrado en diferentes fluidos distintos de las vías respiratorias, siendo mayor en saliva, lágrimas y cerumen¹¹.

Varios estudios han evaluado el rendimiento de RT-qPCR utilizando saliva en el intento de favorecer el uso de esta muestra para el diagnóstico de COVID-19^{3,4,12-14}. Los estudios iniciales se realizaron en pacientes hospitalizados^{3,15,16}, pero dada la necesidad de identificar oportunamente a los individuos infectados en la comunidad, se ha estudiado también en pacientes ambulatorios. Los resultados son variables, pero demuestran una menor sensibilidad en saliva en comparación con HNF, oscilando entre 51 y 94%^{4,12-14,16-20}. En el presente estudio, basado en pacientes ambulatorios y población principalmente sintomática, demostramos una sensibilidad de 91%, de acuerdo con los resultados de Kandel y Marx, quienes reportaron una sensibilidad de 85,2 y 91%, respectivamente^{19,21}.

La menor sensibilidad de RT-qPCR utilizando saliva puede estar determinada por la menor carga viral en este fluido en comparación con el HNF. En nuestro estudio, la saliva tuvo un CT promedio 3,99 más alto y una carga viral estimada al menos 18 veces menor que en HNF, lo que ha sido observado por varios autores^{18,19,22}. Sin embargo, hubo un 18% de muestras en que la carga viral fue mayor en saliva, aunque sólo en la mitad de ellos la diferencia

fue mayor a 1 Log, valor considerado significativo generalmente. Esta diferencia puede estar dada por aspectos pre-analíticos del procedimiento como la variabilidad entre individuos, días de evolución de enfermedad, calidad de la muestra de HNF y la variabilidad normal de la excreción viral en los sujetos, describiéndose cambios más dinámicos en la carga viral del HNF que en la saliva en el tiempo¹⁴. La carga viral en HNF cuando la saliva fue negativa, fue menor en comparación con la carga viral en HNF cuando ambas muestras fueron positivas. Cuando el HNF tuvo un CT ≥ 30 y la carga viral < a 115.000 copias/mL, un tercio de las muestras de saliva fueron negativas, lo que significa que, cuando la carga viral en la nasofaringe es baja, un tercio de los casos de COVID-19 se podrían perder usando saliva. Esta proporción puede parecer significativa cuando se considera el uso de saliva como muestra para el diagnóstico de COVID-19. En los intentos de correlacionar el aislamiento viral con la carga viral, se observó que no hay replicación viral en muestras con una carga viral inferior a 1×10^6 copias/mL y valores de CT superiores a 24 o 34. La positividad del cultivo disminuye a medida que los valores de CT aumentan. Se ha visto que menos de 3 a 8% de las muestras con CT ≥ 35 muestran replicación viral en cultivo celular pudiendo considerarse infecciosas²³⁻²⁵. La persistencia del virus viable depende de la duración de la infección. Un estudio observó que, en pacientes asintomáticos con RPC positiva más allá de los 20 días desde el diagnóstico inicial, ninguno tenía cultivos positivos de SARS-CoV-2²⁶. El estudio de Hiroi mostró que los pacientes con CT > 30 y más de 10 días de síntomas tenían cultivo viral negativo²⁷. Por lo tanto, es muy poco probable que los pacientes con COVID-19 diagnosticados por HNF positivo y con RPC negativa en saliva, situación en que la carga viral es baja, sean infectantes. Encontramos que los casos de COVID-19 que se pierden al usar saliva, corresponden principal-

mente a pacientes con cargas virales bajas en sus tractos respiratorios superiores, por debajo del umbral para ser considerados infecciosos y por lo tanto contagiosos. En consecuencia, desde el punto de vista de la transmisión, la menor sensibilidad observada en las muestras de saliva en comparación con el HNF no sería relevante.

Otros factores que pueden afectar a la sensibilidad de la RT-PCR en la saliva son la presencia, tipo y duración de los síntomas. La sensibilidad de la RT-PCR en pacientes sintomáticos es mayor, disminuyendo de 94,7 a 88% en pacientes asintomáticos²⁸; sin embargo, las cifras no son tan diferentes cuando se compara entre sujetos asintomáticos y oligosintomáticos²⁹. La diferente sensibilidad de la RT-PCR en sintomáticos vs asintomáticos se debe probablemente a la mayor carga viral presente en pacientes sintomáticos, ya sean niños o adultos²⁸⁻³¹; sin embargo, esta diferencia entre sintomáticos y asintomáticos no parece ser tan clara en los niños³². A pesar de la menor sensibilidad en sujetos asintomáticos, la sensibilidad sigue siendo lo suficientemente alta, entre 78 y 91%, para la detección del virus, dependiendo de la frecuencia con que se realicen las pruebas. Con pruebas periódicas, al menos semanalmente, la detección de casos positivos mejora³³. Algunos estudios incluso han demostrado que la RPC en saliva tiene una sensibilidad más alta que en el HNF para el tamizaje de pacientes asintomáticos, 92 y 86%, respectivamente³⁴. Así, la saliva es una muestra adecuada para utilizar, ya sea para la vigilancia activa de los casos, tanto en adultos como en la población pediátrica, o para el diagnóstico en casos sospechosos de COVID-19. En nuestro estudio sólo tres de los 59 pacientes positivos eran asintomáticos y sólo uno dio positivo por saliva, por lo que no podemos sacar conclusiones sobre las diferencias en la carga viral entre estas dos poblaciones.

Otro determinante de la sensibilidad es la duración de los síntomas al momento del muestreo debido a la variación de la carga viral en el tiempo. A medida que aumenta el número de días desde el inicio de los síntomas, la carga viral disminuye. Se ha demostrado que la carga de SARS-CoV-2 disminuye después de siete días en comparación con los primeros tres días de síntomas, tanto en HNF como en saliva^{4,6,22,35}. En nuestro estudio, observamos cargas virales más altas desde un día antes del inicio de los síntomas hasta tres días después, tanto en la saliva como en el HNF. También encontramos que la diferencia significativa en la carga viral entre saliva e HNF se observa durante los primeros siete días de síntomas, pero después de la primera semana esta diferencia tiende a desaparecer, siendo los promedios más similares entre HNF y saliva. Considerando que el número de muestras positivas con más de siete días de síntomas en nuestro estudio es muy pequeño, no es posible asegurar completamente que se pierde esta diferencia en el tiempo. Sin embargo, es posible que así ocurra, ya que otros autores

han observado que hay una mayor reducción de la carga viral en la nasofaringe a lo largo del tiempo en comparación a la saliva^{14,17,22}. La excreción del SARS-CoV-2 en la nasofaringe ha demostrado tener una duración más corta en comparación con otras muestras como el esputo, las heces y la orina, aunque no hay pruebas suficientes para compararlo con la saliva³⁶.

En los sujetos del estudio, el síntoma más frecuente fue la mialgia, seguida de fiebre y tos. No hubo diferencias en las cargas virales (medidas como CT) entre estos síntomas, pero los pacientes que presentaron odinofagia en el momento del diagnóstico tenían una carga viral significativamente mayor en HNF, probablemente debido a una gran replicación a nivel faríngeo, lo que explicaría esta sintomatología. Chua y cols., encontraron que los niños con tos, expectoración y cefalea tenían cargas más altas³¹. Por otro lado, las cargas virales significativamente más bajas las observamos en los sujetos con síntomas gastrointestinales. No pudimos mostrar diferencias significativas en la carga viral de la saliva según la sintomatología. Por lo tanto, el tipo de síntomas al momento de la toma de muestra de un paciente también podría influir en la sensibilidad de la RPC.

Los métodos de recolección de saliva y el uso de medios de transporte también son factores que influyen en el rendimiento de la RPC de SARS-CoV-2. Utilizamos un método muy simple para recolectar la saliva que consiste en salivar en un tubo con medio de transporte. Métodos más complejos como la obtención de saliva con lavado orofaríngeo, la recogida de saliva en la boca durante 1 o 2 minutos, el carraspeo antes de la toma de muestras o el rollo de algodón, han mostrado una sensibilidad similar o incluso menor a la determinada por nosotros, 86%, 82,9% y 66,7%³⁷⁻⁴⁰. Descubrimos que recolectar saliva con un método simple como el salivar, sin dispositivos especiales, sin exigir un volumen mínimo, es tan bueno como los demás procedimientos y más fácil de realizar. Además, la mayoría de los participantes del estudio prefirieron el muestreo de saliva ya que era fácil de recolectar, no causaba molestia alguna y no los ponía nerviosos en comparación con el HNF. Por otro lado, demostramos que sólo se necesita un pequeño volumen de saliva para el buen rendimiento de la RT-qPCR, lo que es relevante para niños pequeños e incluso para adultos que, en su mayoría, pudieron recolectar menos de dos ml de saliva.

El uso de medios de transporte no ha demostrado ser relevante para la sensibilidad sino para el procesamiento, ya que la saliva recolectada sin medio de transporte agrega trabajo adicional y manipulación de las muestras para disminuir la viscosidad y prevenir la formación de coágulos. Sin embargo, los estudios en los que la saliva se recoge sin medio de transporte han demostrado una sensibilidad muy buena^{5,18,20}. El uso o no de medios de transporte virales en la recolección de saliva podría ser un factor

para considerar en los laboratorios que utilizan métodos de extracción automatizados en los que los canales pueden bloquearse con muestras de saliva muy espesas^{3,5,18}. Según algunos autores, el uso de MTU al recolectar saliva, ofrece muchas ventajas sobre un HNF, porque no es invasivo, conveniente (especialmente para los niños), implica un trabajo mínimo y se presta bien para los programas de detección masiva y permite una mejor conservación de la muestra para fines de aislamiento viral^{41,42}.

Conclusión

La saliva demostró ser una muestra comparable al HNF para el diagnóstico de casos de COVID-19 utilizando RT-qPCR. Este estudio valida la saliva como una muestra adecuada para la identificación de individuos contagiosos, por lo que recomendamos su uso. Sin embargo, considerando que este estudio se basó en una población adulta ambulatoria, donde prácticamente todos eran sintomáticos, las conclusiones sólo se pueden aplicar

a este entorno de pacientes. De todos modos, su utilidad en poblaciones distintas a la aquí estudiada, como sujetos asintomáticos o pediátricos, se encuentra ampliamente validada en la literatura científica. Además, es fácil de recolectar, no corre el riesgo de quiebre de *stock* de materiales, no necesita personal capacitado, requiere pequeños volúmenes y se puede usar fácilmente en la población pediátrica. La saliva es probablemente una excelente muestra para niños e individuos que requieren vigilancia continua de COVID-19, favoreciendo la adherencia al muestreo.

Agradecimientos. Agradecemos sinceramente a los participantes del estudio por su generosa colaboración y a las enfermeras encargadas de reclutar a los participantes, tomar el Consentimiento Informado y las muestras, particularmente a Alejandra Patiño y Zunny Pizarro. Del mismo modo, agradecemos a los médicos jefes de la Unidad de Medicina de Urgencias del Centro Médico San Joaquín y de la Clínica San Carlos de Apoquindo, Luis Enberg y Felipe Maluenda, respectivamente, por su apoyo.

Referencias bibliográficas

- 1.- WHO. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Disponible en <https://covid19.who.int/>. Último acceso el 22 de mayo de 2022.
- 2.- Hanson K E, Caliendo A M, Arias C A, Englund J A, Lee M J, Loeb M, et al. Infectious Diseases Society of America guidelines on the diagnosis of COVID-19. *Clin Infect Dis*. 2020 Jun 16; ciae760. <https://doi.org/10.1093/cid/ciae760>.
- 3.- Wyllie A L, Fournier J, Casanovas-Massana A, Campbell M, Tokuyama M, Vijayakumar P, et al. Saliva or nasopharyngeal swab specimens for detection of SARS-CoV-2. *N Engl J Med* 2020; 383: 1283-6. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2016359>.
- 4.- Williams E, Bond K, Zhang B, Putland M, Williamson D. Saliva as a noninvasive specimen for detection of SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol*. 2020; 58: e00776-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00776-20>.
- 5.- Vogels C, Watkins A E, Harden C A, Brackney D E, Shafer J, Wang J, et al. SalivaDirect: A simplified and flexible platform to enhance SARS-CoV-2 testing capacity. *Med (N Y)*. 2021; 2: 263-80.e6. <https://doi.org/10.1016/j.medj.2020.12.010>.
- 6.- Iwasaki S, Fujisawa S, Nakakubo S, Kamada K, Yamashita Y, Fukumoto T, et al. Comparison of SARS-CoV-2 detection in nasopharyngeal swab and saliva. *J Infect*. 2020; 81: e145-e147. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.05.071>.
- 7.- To K K, Tsang O T, Yip C C, Chan K H, Wu T C, Chan J M, et al. Consistent detection of 2019 novel coronavirus in saliva. *Clin Infect Dis*. 2020; 71: 841-3. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa149>.
- 8.- EPI2-A2. User protocol for evaluation of qualitative test performance; Approved Guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008; 28 (3). https://clsi.org/media/1433/ep12a2_sample.pdf.
- 9.- Instituto de Salud Pública de Chile. Protocolo de validación para la detección del virus SARS-CoV-2 en muestras de saliva mediante RT-PCR en tiempo real. Disponible en: <https://www.ispch.cl/wp-content/uploads/2021/02/ProtocoloValidacionDeteccionCovid-19022021A.pdf>. Último acceso el 22 de mayo de 2022.
- 10.- Matuck B F, Dolnikoff M, Duarte-Neto A N, Maia G, Gomes S C, Sendyk D I, et al. Salivary glands are a target for SARS-CoV-2: a source for saliva contamination. *J Pathol*. 2021; 254: 239-43. <https://doi.org/10.1002/path.5679>.
- 11.- Hanege F M, Kocoglu E, Kalcioğlu M T, Celik S, Cag Y, Esen F, et al. SARS-CoV-2 presence in the saliva, tears, and cerumen of COVID-19 patients. *Laryngoscope*. 2021; 131:E1677-E1682. <https://doi.org/10.1002/lary.29218>.
- 12.- Trabajo-Sanmartín C, Adelantado M, Navascués A, Guembe M J, Rodrigo-Rincón I, Castilla J, et al. Self-collection of saliva specimens as a suitable alternative to nasopharyngeal swabs for the diagnosis of SARS-CoV-2 by RT-qPCR. *J. Clin. Med*. 2021; 10: 299. <https://doi.org/10.3390/jcm10020299>.
- 13.- Tsujimoto Y, Terada J, Kimura M, Moriya A, Motohashi A, Izumi S, et al. Diagnostic accuracy of nasopharyngeal swab, nasal swab and saliva swab samples for the detection of SARS-CoV-2 using RT-PCR. *Infect Dis (London)*. 2021; 53: 581-9. <https://doi.org/10.1080/23744235.2021.1903550>.
- 14.- Huber M, Schreiber P W, Scheier T, Audigé A, Buonomano R, Rudiger A, et al. High efficacy of saliva in detecting SARS-CoV-2 by RT-PCR in adults and children. *Microorganisms* 2021; 9: 642. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030642>.
- 15.- Labbé A C, Benoit P, Gobeille Paré S, Coutlée F, Lévesque S, Bestman-Smith J, et al. Comparison of saliva with oral and nasopharyngeal swabs for SARS-CoV-2 detection on various commercial and laboratory-developed assays. *J Med Virol* 2021; 93: 5333-8. <https://doi.org/10.1002/jmv.27026>.
- 16.- Jamal A J, Mozafarhashjin M, Coomes E, Powis J, Li A X, Paterson A, et al. Toronto 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; 72: 1064-6. <https://doi.org/10.1093/cid/ciae848>.
- 17.- Kim S E, Lee J Y, Lee A, Kim S, Park K H, Jung S I, et al. Viral load kinetics of SARS-CoV-2 infection in saliva in Korean patients: a prospective multi-center comparative Study. *J Korean Med Sci* 2020; 35: e287. <https://doi.org/10.3346/jkms.2020.35.e287>.

- 18.- Landry M L, Criscuolo J, Peaper D R
Challenges in use of saliva for detection of SARS-CoV-2 RNA in symptomatic outpatients. *J Clin Virol.* 2020; 130: 104567. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104567>.
- 19.- Kandel C, Zheng J, McCready J, Serbanescu M A, Racher H, Desaulnier M, et al. Detection of SARS-CoV-2 from saliva as compared to nasopharyngeal swabs in outpatients. *Viruses.* 2020; 12:1314. <https://doi.org/10.3390/v12111314>.
- 20.- Vaz S N, Santana D S, Netto E M, Pedroso C, Wang W K, Santos F D A, et al. Saliva is a reliable, non-invasive specimen for SARS-CoV-2 detection. *Braz J Infect Dis.* 2020; 24: 422-7. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.08.001>.
- 21.- Marx G E, Biggerstaff B J, Nawrocki C C, Totten S E, Travanty E A, Burakoff A W, et al; Colorado Department of Public Health and Environment COVID-19 Laboratory Response Team; Centers for Disease Control and Prevention COVID-19 Laboratory Response Team Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 on self-collected saliva or anterior nasal specimens compared with healthcare personnel-collected nasopharyngeal specimens. *Clin Infect Dis.* 2021; 73(Suppl 1): S65-S73. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab330>.
- 22.- Justo A F O, Bueno M S, Barbosa G R, Perosa A H, Carvalho J M, Bellei N. Comparison of viral load between saliva and nasopharyngeal swabs for SARS-CoV-2: the role of days of symptoms onset on diagnosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2021; 21; 116: e210018. <https://doi.org/10.1590/0074-02760210018>.
- 23.- Bullard J, Dust K, Funk D, Strong J E, Alexander D, Garnett L, et al. Predicting infectious Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 from diagnostic samples. *Clin Infect Dis* 2020; 71: 2663-6. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa638>.
- 24.- Singanayagam A, Patel M, Charlett A, Lopez Bernal J, Saliba V, Ellis J, et al. Duration of infectiousness and correlation with RT-PCR cycle threshold values in cases of COVID-19, England, January to May 2020. *Euro Surveill.* 2020; 25:2001483. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.32.2001483>.
- 25.- Jaafar R, Aherfi S, Wurtz N, Grimaldier C, Van Hoang T, Colson P, et al. Correlation between 3790 quantitative polymerase chain reaction-positives samples and positive cell cultures, including 1941 Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 isolates. *Clin Infect Dis* 2021; 72: e921. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1491>.
- 26.- Sohn Y, Jeong S J, Chung W S, Hyun J H, Baek Y J, Cho Y, et al. Assessing viral shedding and infectivity of asymptomatic or mildly symptomatic patients with COVID-19 in a later phase. *J Clin Med* 2020; 9: 2924. <https://doi.org/10.3390/jcm9092924>.
- 27.- Hiroi S, Kubota-Koketsu R, Sasaki T, Morikawa S, Motomura K, Nakayama EE, et al. Infectivity assay for detection of SARS-CoV-2 in samples from patients with COVID-19. *J Med Virol.* 2021; 93: 5917-23. <https://doi.org/10.1002/jmv.27145>.
- 28.- Miguères M, Mengelle C, Dimeglio C, Didier A, Alvarez M, Delobel P, et al. Saliva sampling for diagnosing SARS-CoV-2 infections in symptomatic patients and asymptomatic carriers. *J Clin Virol* 2020; 130: 104580. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104580>.
- 29.- Tutuncu E E, Ozgur D, Karamese M Saliva samples for detection of SARS-CoV-2 in mildly symptomatic and asymptomatic patients. *J Med Virol* 2021; 93:2932-2937. <https://doi.org/10.1002/jmv.26821>.
- 30.- Han M S, Seong M W, Kim N, Shin S, Cho S I, Park H, et al. Viral RNA load in mildly symptomatic and asymptomatic children with COVID-19, Seoul, South Korea. *Emerg Infect Dis* 2020; 26: 2497-9. <https://doi.org/10.3201/eid2610.202449>.
- 31.- Chua G T, Wong J S C, To K K W, Lam I C S, Yau F Y S, Chan WH, et al. Saliva viral load better correlates with clinical and immunological profiles in children with coronavirus disease 2019. *Emerg Microbes Infect.* 2021; 10: 235-41. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1878937>.
- 32.- Yee R, Truong T T, Pannaraj P S, Eubanks N, Gai E, Jumarang J, et al. Saliva is a promising alternative specimen for the detection of SARS-CoV-2 in children and adults. *J Clin Microbiol.* 2021; 59: e02686-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.02686>.
- 33.- Zhang K, Shoukat A, Crystal W, Langley JM, Galvani AP, Moghadas SM. Routine saliva testing for the identification of silent coronavirus disease 2019 (COVID-19) in healthcare workers. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2021; 42: 1189-93. <https://doi.org/10.1017/ice.2020.1413>.
- 34.- Yokota I, Hattori T, Shane P Y, Konno S, Nagasaka A, Takeyabu K, et al. Equivalent SARS-CoV-2 viral loads by PCR between nasopharyngeal swab and saliva in symptomatic patients. *Sci Rep* 2021; 11:4500. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84059-2>.
- 35.- Tirupathi R, Ramparas T R, Wadhwa G, Areti S, Kaur J, Salim S, et al. Viral dynamics in the upper respiratory tract (URT) of SARS-CoV-2. *Infez Med* 2020; 28: 486-99. PMID: 33257622.
- 36.- Zhurakivska K, Troiano G, Pannone G, Caponio V C A, Lo Muzio L An overview of the temporal shedding of SARS-CoV-2 RNA in clinical specimens. *Front Public Health* 2020; 8: 487. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00487>.
- 37.- Fernández-González M, Agulló V, de la Rica A, Infante A, Carvajal M, García JA, et al. Performance of saliva specimens for the molecular detection of SARS-CoV-2 in the community setting: does sample collection method matter? *J Clin Microbiol* 2021; 59: e03033-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.03033-20>.
- 38.- Ku C W, Shivani D, Kwan J Q T, Loy S L, Erwin C, Ko K K K, et al. Validation of self-collected buccal swab and saliva as a diagnostic tool for COVID-19. *Int J Infect Dis* 2021; 104: 255-61. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.12.080>.
- 39.- Melo Costa M, Benoit N, Dormoi J, Amalvict R, Gomez N, Tissot-Dupont H, et al. Salivette, a relevant saliva sampling device for SARS-CoV-2 detection. *J Oral Microbiol.* 2021;13: 1920226. <https://doi.org/10.1080/20002297.2021.1920226>.
- 40.- Manabe Y C, Reuland C, Yu T, Azamfirei R, Hardick J P, Church T, et al. Ambulatory COVID Team. Self-collected oral fluid saliva is insensitive compared with nasal-opharyngeal swabs in the detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in outpatients. *Open Forum Infect Dis.* 2020; 8: ofaa648. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa648>.
- 41.- Berenger B M, Conly J M, Fonseca K, Hu J, Louie T, Schneider A R, et al. Saliva collected in universal transport media is an effective, simple and high-volume amenable method to detect SARS-CoV-2. *Clin Microbiol Infect.* 2021; 27: 656-7. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.10.035>.
- 42.- Pasomsub E, Watcharananan S P, Boonyawat K, Janchompoo P, Wongtabtim G, Sukswan W, 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: 285.e1-285.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.05.001>.