



Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas

TESIS DOCTORAL

Rendimiento de diferentes métodos y muestras biológicas para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 en el entorno comunitario

VANESA AGULLÓ RE

Directora de la Tesis

Dra. Dña. Mar Masiá Canuto

Codirectora de la Tesis

Dra. Dña. Marta Fernández González

Universidad Miguel Hernández de Elche

- 2022 -

La presente Tesis Doctoral, titulada “Rendimiento de diferentes métodos y muestras biológicas para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 en el entorno comunitario”, se presenta bajo la modalidad de **tesis por compendio** de las siguientes **publicaciones**:

- Fernández-González M*, **Agulló V***, de la Rica A, Infante A, Carvajal M, García JA, Gonzalo-Jiménez N, Cuartero C, Ruiz-García M, de Gregorio C, Sánchez M, Masiá M, Gutiérrez F. **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 Apr; 59(4): e03033-20. doi: 10.1128/JCM.03033-20. Según el JCR (*journal citation report*) del año 2020 es un revista con un factor de impacto de 5,948 y se sitúa en el cuartil 1 (22/136) de su categoría, Microbiología.

*Marta Fernández-González y Vanesa Agulló han contribuido igualmente en este trabajo.

- **Agulló V***, Fernández-González M*, Ortiz de la Tabla V, Gonzalo-Jiménez N, García JA, Masiá M, Gutiérrez F. **Evaluation of the rapid antigen test Panbio COVID-19 in saliva and nasal swabs in a population-based point-of-care study.** J Infect. 2021 May;82(5):186-230. doi: 10.1016/j.jinf.2020.12.007. Según el JCR del año 2020 es un revista con un factor de impacto de 6,072 y se sitúa en el cuartil 1 (10/93) de su categoría, Enfermedades Infecciosas.

*Vanesa Agulló y Marta Fernández-González han contribuido igualmente en este trabajo.

- Masiá M, Fernández-González M, Sánchez M, Carvajal M, García JA, Gonzalo-Jiménez N, Ortiz De La Tabla V, **Agulló V**, Candela I, Guijarro J, Gutiérrez JA, De Gregorio C, Gutiérrez F. **Nasopharyngeal Panbio COVID-19 antigen performed at point-of-care has a high sensitivity in symptomatic and asymptomatic patients with higher risk for transmission and older age.** Open Forum Infect Dis. 2021 Feb 8(3):ofab059. doi: 10.1093/ofid/ofab059. Según el JCR del año 2020 es un revista con un factor de impacto de 3,835 y se sitúa en el cuartil 2 (37/93) de su categoría, Enfermedades Infecciosas.





La Dra. Dña. Mar Masiá Canuto, directora, y la Dra. Dña. Marta Fernández González, codirectora de la tesis doctoral titulada **“Rendimiento de diferentes métodos y muestras biológicas para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 en el entorno comunitario”**.

INFORMAN:

Que Dña. Vanesa Agulló Re ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado **“Rendimiento de diferentes métodos y muestras biológicas para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 en el entorno comunitario”** conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmamos para los efectos oportunos, en Sant Joan d’Alacant a 28 de febrero de 2022

Directora de la tesis

Dra. Dña. Mar Masiá Canuto

Codirectora de la tesis

Dra. Dña. Marta Fernández González



El Prof. D. Vicente F. Gil Guillén Coordinador del Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas.

INFORMA:

Que Dña. Vanesa Agulló Re ha realizado bajo la supervisión de nuestro Programa de Doctorado el trabajo titulado **“Rendimiento de diferentes métodos y muestras biológicas para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 en el entorno comunitario”** conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmo para los efectos oportunos, en Sant Joan d’Alacant a 28 de febrero de 2022

Prof. D. Vicente F. Gil Guillén

Coordinador del Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas



AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a las personas que, de un modo u otro, han contribuido con su apoyo a la realización de esta tesis. De manera especial:

A la Dra. Mar Masiá por la dirección impecable de este trabajo, por su dedicación, apoyo y estímulo, que me ha permitido llegar hasta aquí.

Al Dr. Félix Gutiérrez por su confianza e inestimable ayuda en la elaboración de esta tesis, por su motivador afán investigador, y por ser para mí un ejemplo del trabajo bien hecho.

A la Dra. Marta Fernández sin cuyo excelente trabajo no hubiera sido posible la realización de la tesis. Gracias por tu gran apoyo, paciencia y dedicación, a la que nunca podré corresponder como merecerías, y, sobre todo, gracias por tu cariño y amistad, que me llevo para siempre.

Ha sido un privilegio formar parte del Grupo de Investigación de Enfermedades Infecciosas y VIH/SIDA del Hospital General de Elche, y compartir el día a día con brillantes compañeros a los que agradezco de manera sincera su apoyo y cariño durante este proceso: Sergio, Jose, Paula, Ángela, Lucía, Guillermo, Rafa, Laura, María, Yolanda, Fina, Fernando, Sacra, Cati, Araceli, Jenny, Alba, Gabriel, Susi, Amalia. De manera especial a Javier, por acompañarme y motivarme durante este tiempo, este camino no habría sido lo mismo sin ti. A Jose Alberto, por su gran trabajo en esta investigación, por sus consejos y paciencia, y su sentido del humor, tan necesario en muchos momentos. Y a Mar, por su gran aportación en este trabajo, y por hacer agradables los días de tanta incertidumbre.

A la Dra. Victoria Ortiz de la Tabla por el trabajo realizado, y por sus buenos consejos.

A la Dra. Elena García-Payá, por sus consejos y su gran ayuda, siempre que la he necesitado. Ha sido para mí un ejemplo de capacidad de trabajo y compañerismo, y sin duda, una gran amiga.

A los pacientes. Particularmente a todos aquellos que, de forma desinteresada, se ofrecen voluntarios para participar en estudios de investigación clínica, con la esperanza de colaborar en la construcción de un futuro mejor.

Mi más sentido agradecimiento es para mi familia. A mis padres, por confiar en mí, por los valores y principios que me han inculcado, y por su ejemplo de esfuerzo y honestidad. A Roberto, muchas gracias por todo. Por creer en mí, por apoyarme y darme fuerzas. Sin ti, no lo hubiera conseguido. Y a mis hijas, el motor de mi vida, por su comprensión y paciencia. Espero que este trabajo les sirva para valorar la perseverancia y el esfuerzo.

¡Gracias a todos!





ÍNDICE



1. RESUMEN EN INGLÉS Y CASTELLANO.....	17
2. INTRODUCCIÓN.....	25
2.1. Características del SARS-CoV-2.....	27
2.2. Epidemiología del SARS-CoV-2.....	29
2.3. Diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2.....	32
2.3.1. Detección de ácidos nucleicos mediante RT-PCR.....	32
2.3.2. Prueba de detección de antígenos.....	
2.3.3. Pruebas serológicas.....	
3. HIPÓTESIS.....	37
4. OBJETIVOS.....	41
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	45
5.1. Diseño.....	47
5.2. Sujetos y ámbito de estudio.....	47
5.3. Protocolo de actuación.....	47
5.3.1. Reclutamiento de pacientes y recogida de datos demográficos y clínico-epidemiológicos.....	47
5.3.2. Proceso de toma de muestras.....	48
5.4. Procedimientos microbiológicos.....	50
5.4.1. Prueba rápida de detección de antígenos.....	50
5.4.2. Detección de ARN del SARS-CoV-2.....	52
5.5. Análisis estadístico de los datos.....	53
6. RESULTADOS.....	55
6.1. Características generales de los participantes.....	57
6.2. Evaluación del rendimiento de la RT-PCR en saliva para detección del SARS-CoV-2.....	59
6.2.1. Características de los pacientes y tasas de positividad..	59
6.2.2. Sensibilidades de las diferentes muestras para la detección del SARS-CoV-2 y concordancia entre las muestras de saliva y nasofaríngeas.....	61
6.2.3. Rendimiento de las diferentes muestras de saliva para la detección de SARS-CoV-2 según valores de Ct y presencia de síntomas.....	62

6.3.	Evaluación del rendimiento de la prueba rápida de antígenos.....	65
6.3.1.	Rendimiento de la prueba de antígeno por tipo de muestra y lugar de atención al paciente.....	65
6.3.2.	Rendimiento de la prueba de antígeno en muestras nasofaríngeas según el valor de Ct en la RT-PCR, la edad y el sexo.....	65
6.3.3.	Rendimiento de la prueba de antígeno en muestras nasofaríngeas en pacientes sintomáticos.....	66
6.3.4.	Rendimiento de la prueba de antígeno en muestras nasofaríngeas en pacientes asintomáticos.....	67
6.3.5.	Rendimiento de la prueba de antígeno en muestra nasal, saliva y muestra nasal + saliva.....	72
7.	DISCUSIÓN	75
8.	CONCLUSIONES	89
9.	ANEXOS	93
-	Anexo 1: Cuestionario clínico-epidemiológico y consentimiento informado.....	95
-	Anexo 2: Instrucciones para una correcta toma de muestra de saliva.....	97
10.	REFERENCIAS	99
11.	ARTÍCULOS	107
-	ARTÍCULO I. <i>Performance of saliva specimens for the molecular detection of SARS-CoV-2 in the community setting: Does sample collection method matter?</i>	109
-	ARTÍCULO II. <i>Nasopharyngeal Panbio COVID-19 Antigen Performed at point-of-care has a high sensitivity in symptomatic and asymptomatic patients with higher risk for transmission and older age</i>	121
-	ARTÍCULO III. <i>Evaluation of the rapid antigen test Panbio COVID-19 in saliva and nasal swabs in a population-based point-of-care study</i>	131

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

- ACE-2 (Enzima convertidora de angiotensina 2)
- ADN (Ácido desoxirribonucleico)
- AEMPS (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios)
- AG (Antígeno)
- AR (Auto-recolección)
- ARN (Ácido ribonucleico)
- CAP (Centro de Atención Primaria)
- COVID-19 (Enfermedad por coronavirus 2019)
- Ct (Ciclo umbral de positividad, del inglés *cycle threshold*)
- DIS (Días desde el inicio de los síntomas)
- EPI (Equipo de protección individual)
- EPOC (Enfermedad pulmonar obstructiva crónica)
- FDA (*Food and Drug Administration*)
- FN (Falso negativo)
- FP (Falso positivo)
- HGUE (Hospital General Universitario de Elche)
- IC (Intervalo de confianza)
- Ind (Indeterminado)
- IgM (Inmunoglobulina M)
- IgG (Inmunoglobulina G)
- LOF (Lavado orofaríngeo)
- MI (Mililitro)
- Neg (Negativo)
- NF (Nasofaríngeo)
- NPA (Porcentaje de concordancia negativa, del inglés *negative percent agreement*)
- OMS (Organización Mundial de la Salud)
- OPA (Porcentaje de concordancia general, del inglés *overall percent agreement*)
- OR (Odds ratio)
- Pos (Positivo)
- PPA (Porcentaje de concordancia positiva, del inglés *positive percent agreement*)

Q1 (cuartil 1)

Q3 (cuartil 3)

RIC (Rango intercuartílico)

RS (Recolección supervisada)

RT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa)

SARS-CoV-2 (coronavirus tipo-2 causante del síndrome respiratorio agudo severo)

T_m (Temperatura de melting)

TN (verdadero negativo)

TP (verdadero positivo)

μl (Microlitro)



1. RESUMEN Y ABSTRACT



RESUMEN EN CASTELLANO:

Objetivo: En esta investigación se evaluó el rendimiento de distintas muestras biológicas y métodos diagnósticos para detectar la infección por SARS-CoV-2 con el fin de optimizar los recursos en el entorno comunitario. El objetivo principal fue la evaluación del rendimiento de la muestra de saliva para la detección de SARS-CoV-2 mediante la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) a tiempo real y con la prueba rápida de detección de antígeno (Panbio COVID-19 Ag-RDT), en el entorno comunitario, comparado con la técnica de referencia, RT-PCR de exudado nasofaríngeo. Los objetivos secundarios fueron la evaluación del rendimiento del antígeno (Panbio COVID-19 Ag-RDT), para la detección del SARS-CoV-2 en el punto de atención al paciente en muestra de exudado nasofaríngeo y exudado nasal, comparándolo con la técnica de referencia, RT-PCR de exudado nasofaríngeo. Se estudió también el rendimiento de distintos métodos de recogida de la muestra de saliva para la detección de SARS-CoV-2 por RT-PCR.

Métodos: Se llevó a cabo un estudio transversal prospectivo que incluyó pacientes ambulatorios que acudían a puntos habituales de atención al paciente, concretamente 3 centros de Atención Primaria (CAP) y un Servicio de Urgencias, para realizar una prueba PCR para SARS-CoV-2, debido a que presentaban síntomas compatibles con la Covid-19 o habían estado expuestos a la enfermedad por contacto estrecho con una persona Covid-positiva. En Atención Primaria se tomaron muestras de saliva con distintos métodos de recolección, exudado nasal y dos exudados nasofaríngeos consecutivos, y se realizó, en el mismo punto de atención al paciente, la prueba rápida de antígeno Panbio Covid-19 Ag-RDT de forma paralela en la muestra de saliva, muestra nasal y exudado nasofaríngeo. La saliva restante y el segundo exudado nasofaríngeo siguieron el procedimiento habitual para la realización de la RT-PCR para la detección de SARS-CoV-2. En el servicio de Urgencias se tomaron dos muestras de exudado nasofaríngeo, una para la realización del test rápido de antígenos en el mismo punto de atención al paciente, y la otra para diagnóstico molecular de SARS-CoV-2. Para el análisis estadístico, calculamos la concordancia entre la PCR en saliva y la PCR en muestra nasofaríngea, y el estudio de sensibilidad, considerando como positivo el global de positivos en cualquiera de las muestras. Calculamos también la sensibilidad de la prueba de antígeno en las distintas muestras.

Resultados: Se incluyeron un total de 913 pacientes, 690 desde CAP y 223 desde el Servicio de Urgencias. La mediana de edad fue de 41 años y 423 eran hombres. El 32,3% estaban asintomáticos y la RT-PCR fue positiva en 196 (21,5%) muestras nasofaríngeas.

Para la evaluación del rendimiento de la RT-PCR en saliva para detección del SARS-CoV-2, se recolectaron y analizaron muestras pareadas de saliva e hisopo nasofaríngeo de 577 pacientes y 120 (20,8%) dieron resultado positivo para ARN de SARS-CoV-2. La sensibilidad fue mayor para las muestras con un valor de ciclo umbral de positividad (Ct, del inglés *cycle threshold*) más bajo, y el mejor rendimiento de la RT-PCR en saliva se observó para la tomada mediante recolección supervisada (RS), con sensibilidades (IC del 95%) del 100% (85,9-100) en individuos sintomáticos, y del 88,9% (50,7-99,4) en individuos asintomáticos con valores de Ct \leq 30.

Para la evaluación de la prueba rápida de antígeno Panbio COVID-19 en muestra nasofaríngea se incluyeron todos los pacientes. El porcentaje de concordancia positiva (PPA, del inglés *positive percent agreement*) (IC del 95 %) de la prueba de antígeno en hisopos nasofaríngeos fue del 60,5 % (53,3-67,4). En pacientes sintomáticos, el PPA fue del 95 % para Ct \leq 25, y del 85 % para Ct $<$ 30. El rendimiento también fue dependiente de la edad, con un PPA del 100% en pacientes sintomáticos $>$ 50 años con Ct $<$ 25. En pacientes asintomáticos, el PPA fue del 86% para Ct $<$ 25. Para la evaluación de la prueba rápida de antígeno Panbio COVID-19 en saliva y frotis nasal se incluyeron 659 pacientes con muestra nasal, de los cuales 610 (92,6%) tenían además una muestra de saliva. La prueba de antígeno fue positiva en 59 (9%), 28 (4,6%) y 60 (9,1%) de las muestras nasales, saliva y cualquiera de las dos (nasal+saliva), respectivamente. El PPA (IC 95 %) fue del 44,7 % (36,1–53,6) en muestra nasal, 23,1 % (16,2–31,9) en saliva y 49,6 % (40,4–58,8) en nasal+saliva. El mejor rendimiento de la prueba se observó para la combinación de muestra nasal+saliva en pacientes sintomáticos con $<$ 7 días de síntomas y Ct \leq 25, con PPA (IC 95%) del 92% (78-98) y 85,1% (71,1-93,3) para Ct \leq 30. Los resultados muestran que la sensibilidad general de Panbio Ag-RDT fue menor en muestra nasal y saliva que en exudado nasofaríngeo, particularmente en pacientes asintomáticos, aunque la especificidad fue del 100% en todas las muestras. La sensibilidad dependía en gran medida de los valores de Ct y de la presencia y duración de los síntomas.

Conclusión: La saliva es una muestra aceptable para la detección de ARN de SARS-CoV-2 en el entorno comunitario. Las muestras recolectadas bajo supervisión tienen un rendimiento comparable al exudado nasofaríngeo, y pueden identificar de manera efectiva a las personas

con mayor riesgo de transmisión en condiciones de la vida real. La prueba de antígeno Panbio COVID-19 realizada en muestra nasofaríngea en el punto de atención al paciente tiene una elevada sensibilidad en pacientes sintomáticos con cargas virales altas y de mayor edad, y es útil para identificar a los pacientes asintomáticos con mayor riesgo de transmisión. Las muestras nasales y la saliva no son buenas opciones para el cribado o vigilancia del SARS-CoV-2 con la prueba rápida de detección de antígenos, debido al bajo rendimiento en pacientes asintomáticos. Sin embargo, la combinación de saliva y muestra nasal podría ser una alternativa adecuada al exudado nasofaríngeo para el diagnóstico de pacientes sintomáticos en entornos sin disponibilidad de personal capacitado, o sin condiciones seguras.



RESUMEN EN INGLÉS (ABSTRACT):

Objective: This study evaluated the performance of different biological samples and diagnostic methods to detect SARS-CoV-2 infection in order to optimize resources in the community setting. The main objective was the evaluation of the performance of the saliva sample for the detection of SARS-CoV-2 by the molecular technique of real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and by the rapid antigen detection test (Panbio COVID-19 Ag-RDT), in the community setting, compared with RT-PCR in nasopharyngeal swab (NPS) as reference standard. The secondary objectives were the performance of the antigen test (Panbio COVID-19 Ag-RDT), for the detection of SARS-CoV-2 at point-of-care in nasopharyngeal and nasal swabs, by comparison with the RT-PCR in NPS as reference standard, and the performance of saliva specimens collected with different methods for the detection of SARS-CoV-2 by RT-PCR.

Methods: This is a prospective cross-sectional study that included outpatients attending in regular patient care points, specifically 3 Primary Care centers (PCC) and an Emergency Department to test SARS-CoV-2 with PCR, due to they had symptoms compatible with Covid-19 or they were a close contact of a Covid-positive person. In Primary Care, a saliva sample, with a different collection method, supervised collection, oropharyngeal washing and self-collection), a nasal swab and two consecutive NPSs were taken consecutively, and the rapid antigen test was performed in parallel at the point-of-care in the saliva, nasal and nasopharyngeal swabs. The remaining saliva and the second NPS followed the usual procedure for the detection of SARS-CoV-2 by RT-PCR. In the Emergency Department, two samples of nasopharyngeal swab were taken, one to perform the rapid antigen test at the point-of-care, and the other for molecular diagnosis of SARS-CoV-2. For the statistical analysis, agreement between the PCR in saliva and the PCR in the nasopharyngeal swab was calculated. Positive results of either NPS or saliva specimens were considered true positives for calculations of sensitivity. Sensitivity of the antigen test in the different samples was also calculated.

Results: Nine hundred and thirteen patients were included, 690 from PCC and 223 from the Emergency Department. The median age was 41 years and 423 were men. 32.3% were asymptomatic and RT-PCR was positive in 196 (21.5%) nasopharyngeal samples.

For evaluation of the performance of RT-PCR in saliva for detection of SARS-CoV-2, matched NPS and saliva sample pairs were collected and analyzed from 577 patients, and 120 (20.8%) tested positive for RNA of SARS-CoV-2. Sensitivity was higher for samples with lower Ct, and the best RT-PCR performance in saliva was observed for saliva by supervised collection, with sensitivities (95% CI) of 100% (85.9-100) in symptomatic patients and 88.9% (50.7-99.4) in asymptomatic individuals with Ct values ≤ 30 .

All patients were included for evaluation of the Panbio COVID-19 rapid antigen test in NPS. The positive percent agreement (PPA) (95% CI) of the NPS antigen test was 60.5% (53.3-67.4). In symptomatic patients, the PPA was 95% for Ct ≤ 25 and 85% for cut-off Ct < 30 . Performance was also age-dependent, with a PPA of 100% in symptomatic patients > 50 years old with Ct < 25 . In asymptomatic patients, the PPA was 86% for Ct < 25 . For the evaluation of the rapid Panbio COVID-19 antigen test in saliva and nasal swab, 659 patients with a nasal sample were included, of which 610 (92.6%) had a saliva sample. The antigen test was positive in 59 (9%), 28 (4.6%) and 60 (9.1%) nasal, saliva and either (nasal+saliva) samples, respectively. The PPA (95% CI) was 44.7% (36.1–53.6) in the nasal sample, 23.1% (16.2–31.9) in the saliva, and 49.6% (40.4–58.8) in the nasal+saliva. The best performance of the test was observed for the nasal+saliva sample combination in symptomatic patients with < 7 days of symptoms and Ct ≤ 25 , with PPA (95% CI) of 92% (78-98) and 85.1% (71.1-93.3) for Ct ≤ 30 . The results show that the overall sensitivity of Panbio Ag-RDT was lower in nasal swab and saliva than in nasopharyngeal swab, particularly in asymptomatic patients, although the specificity was 100% in all samples. Sensitivity depended largely on Ct values and the presence and duration of symptoms.

Conclusion: Saliva is an acceptable specimen for the detection of RNA of SARS-CoV-2 in the community setting. Samples collected under supervision perform comparably to NPS, and are able to effectively identify individuals at higher risk of transmission under real-life conditions. The nasopharyngeal Panbio COVID-19 antigen test at point-of-care has a good sensitivity in symptomatic patients with high viral loads and older age, and it was useful in identifying asymptomatic patients with higher risk of transmission. Nasal and saliva samples are not good options for screening or surveillance of SARS-CoV-2 with the antigen detection rapid test, due to the low performance observed in asymptomatic patients. However, the combination of saliva and nasal swabs could be a suitable alternative to nasopharyngeal swab for the diagnosis

of symptomatic patients in settings without the availability of trained personnel, or without safe conditions.



2. INTRODUCCIÓN



Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández



2.1. CARACTERÍSTICAS DEL SARS-COV-2

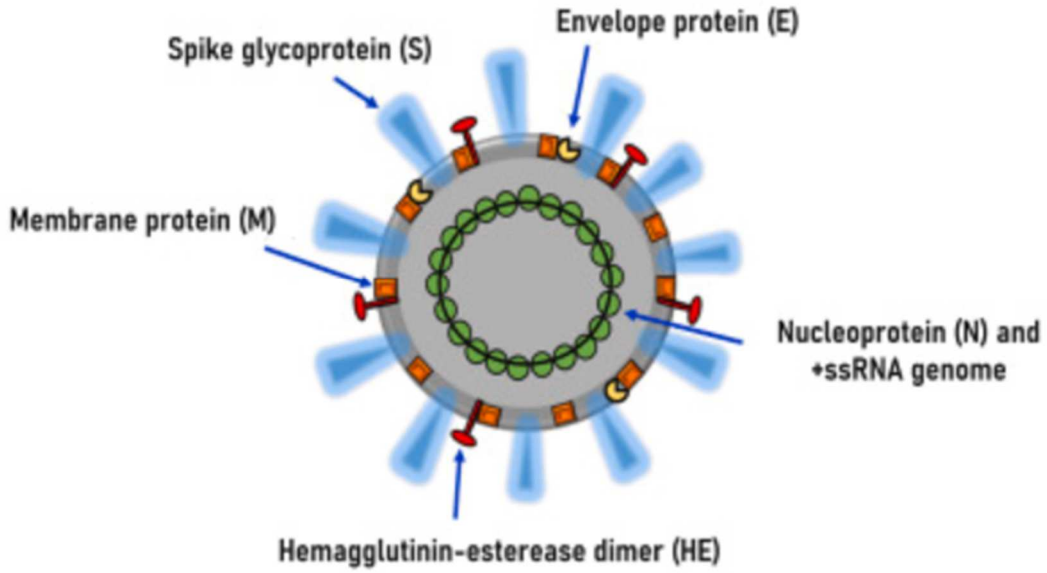
El coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo, (SARS-CoV-2, del inglés *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*), se detectó por primera vez en diciembre de 2019 en la ciudad de Wuhan (China). Es el causante de la enfermedad conocida como COVID-19 (del inglés, *CoronaVirus Disease 2019*), en la que la mayoría de personas contagiadas presentan síntomas de intensidad leve o moderada, como fiebre, tos, disnea, mialgia y fatiga, entre otros. En los casos graves se produce neumonía, síndrome de dificultad respiratoria aguda, y sepsis. La expansión mundial del virus hizo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) la reconociera como pandemia el 11 de marzo de 2020, y desde entonces ha evolucionado de una manera muy rápida.

El SARS-Cov-2 pertenece taxonómicamente a la familia de los coronavirus (*Coronaviridae*), al género *Betacoronavirus* y al subgénero *Sarbecovirus*, que contiene varias especies que causan en humanos enfermedades desde leves a graves. El SARS-CoV-2 es el séptimo coronavirus conocido que ha infectado a personas después del 229E, NL63, OC43, HKU1, MERS-CoV y el anterior SARS-CoV [1-3]. Khailany et al. [4] caracterizaron el genoma del SARS-CoV-2 basado en 95 secuencias a las que se podía acceder desde *GenBank*, *Nayional Microbiology Data Center* (NMDC) y *Genome Warehouse*. El genoma completo del SARS-CoV-2 tiene alrededor de 30 kb de ARN monocatenario. El gen ORF1ab codifica una poliproteína que se divide en proteínas no estructurales (poliproteína 1ab y otras 16 proteínas), y el resto del genoma se compone de 4 genes (gen S, gen E, gen M y gen N), que codifican proteínas estructurales: la proteína S (glicoproteína de la espícula, del inglés *spike protein*), la proteína E (proteína de la envoltura), la proteína M (proteína de membrana) y la proteína N (proteína de la nucleocápside) (figura 1) [5].

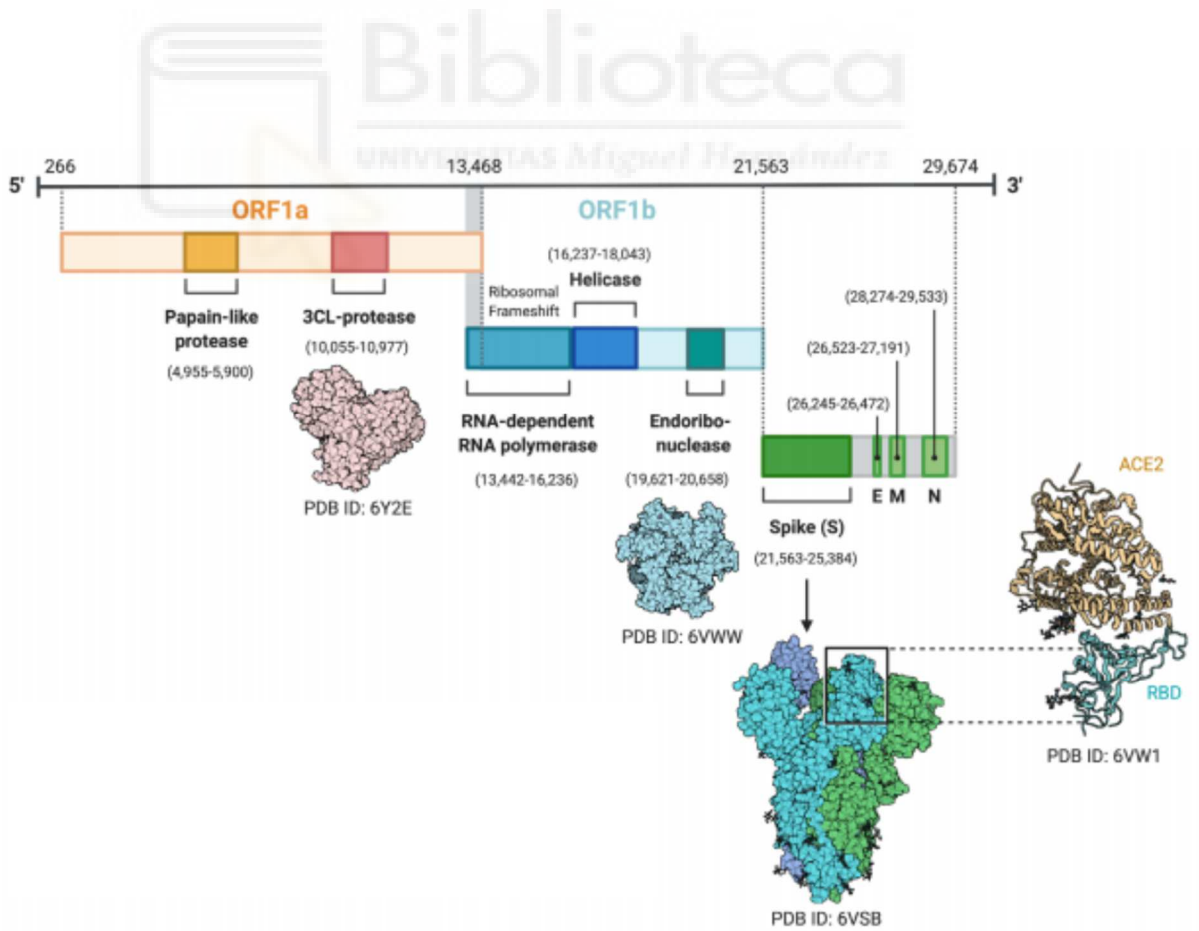
La proteína S contiene el dominio de unión RBD (del inglés, *Receptor Binding Domain*) al receptor celular, que es la proteína ACE-2 de las células humanas, por lo tanto es la proteína determinante en la entrada del virus a la célula huésped. Walls et al. [6] demostraron una similitud significativa en la secuencia entre la glicoproteína S del SARS-CoV-2 y la glicoproteína S SARS-CoV, y fue comparable la afinidad en la unión de las proteínas S de los dos virus del SARS al receptor ACE-2 (enzima convertidora de angiotensina 2) de la superficie de la célula huésped.

Figura 1. (A) Estructura morfológica del SARS-CoV-2. (B) Estructura genómica del SARS-CoV-2 [7]

A



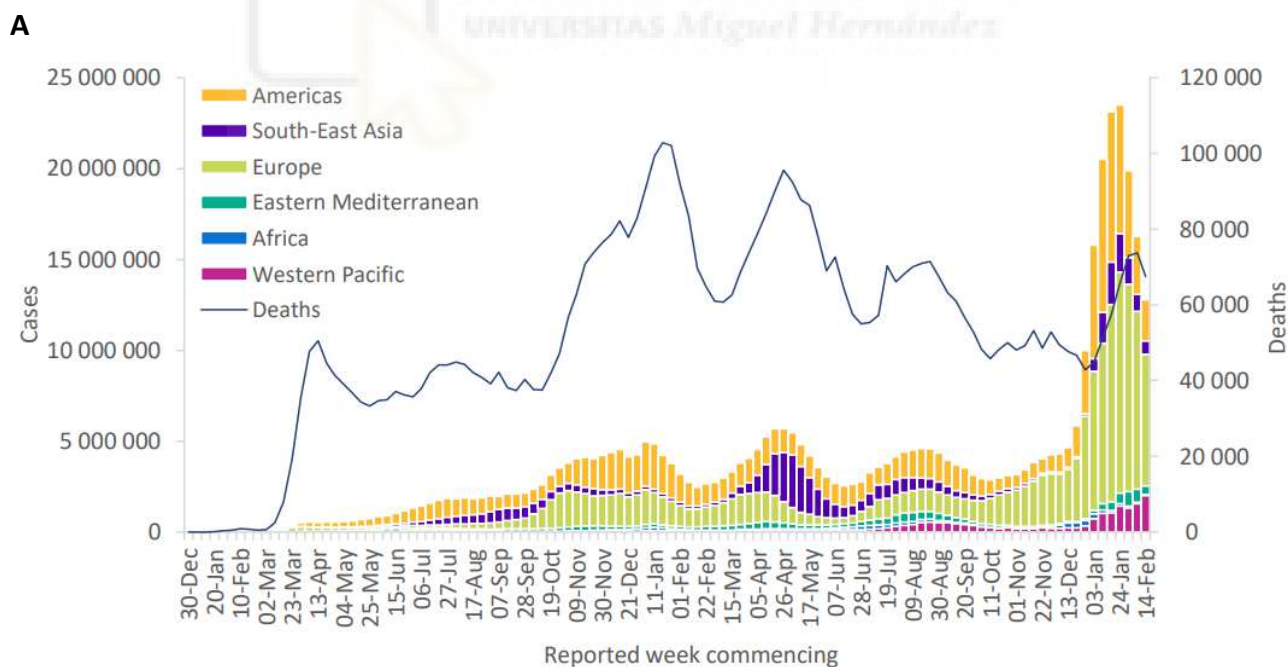
B



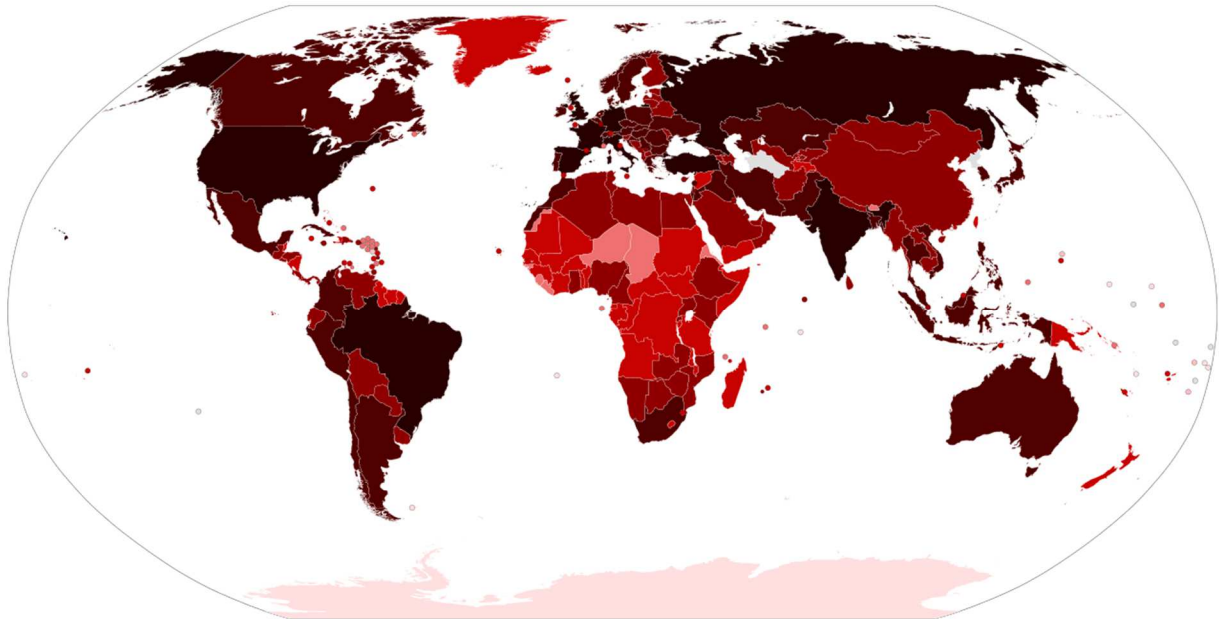
2.2. EPIDEMIOLOGÍA DEL SARS-COV-2

La pandemia de COVID-19, tras su declaración, se convirtió en pocas semanas en un problema de Salud Pública mundial desencadenando una crisis sanitaria con un enorme impacto sanitario y socio-económico. La necesidad de un diagnóstico rápido y certero de la infección, por las grandes implicaciones epidemiológicas que conlleva, ha supuesto un gran desafío para los profesionales sanitarios. Desde el inicio de la pandemia hasta agosto de 2020, fecha en que se planteó este proyecto, se habían notificado en el mundo más de 180 millones de casos de la enfermedad en 258 países, y más de 4 millones de fallecidos. Actualmente ya se han superado los 400 millones de casos en todo el mundo y casi 6 millones de fallecidos (datos actualizados de la OMS) (figura 2).

Figura 2. (A) Casos de COVID-19 por regiones notificadas semanalmente y muertes en todo el mundo, a 20 de febrero de 2022 (Actualización Epidemiológica Semanal de la COVID-19 de la OMS). (B) Mapa de casos confirmados de Covid-19 a 18 de febrero de 2022.



B



■ 100 000+ casos ■ 10 000–99 999 casos ■ 1000–9999 casos ■ 100–999 casos ■ 10–99 casos ■ 1–9 casos □ No se han reportado casos

Fuente: COVID-19 Data Repository by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University.

El principal modo de transmisión del SARS-CoV-2 ocurre entre personas y se puede producir por diferentes vías, siendo la principal a través de un contacto estrecho por la inhalación de pequeñas gotas o aerosoles respiratorios expulsadas por una persona infectada hasta las vías respiratorias superiores e inferiores de una persona susceptible. Otra vía de transmisión es por contacto indirecto a través de las manos u objetos contaminados con las secreciones respiratorias de la persona infectada con las mucosas de las vías respiratorias o conjuntiva.

La rápida propagación de la pandemia de Covid-19 y la aparición de nuevas variantes en todo el mundo requiere la adopción urgente de medidas preventivas eficaces. El diagnóstico microbiológico del SARS-CoV-2 tiene un doble objetivo, por un lado un objetivo clínico que permite llegar al diagnóstico etiológico en pacientes con infección respiratoria aguda, esencial para identificar personas que puedan beneficiarse de un tratamiento específico, y por otro lado, un objetivo epidemiológico con el fin de identificar pacientes contagiosos para frenar la transmisión. En este sentido, es clave establecer el papel en la transmisión de las personas infectadas de forma asintomática. Por todo esto, entre las medidas preventivas eficaces, es

muy importante un diagnóstico precoz y efectivo que permita el aislamiento rápido de las personas infectadas, lo que es de vital importancia tanto para el manejo individual de la enfermedad como para el control de la pandemia. Esto ha supuesto un enorme reto para los sistemas de salud, con una gran demanda asistencial y de recursos. El Ministerio de Sanidad notificó que, desde el inicio de la pandemia hasta el 27 de agosto de 2020, en España se realizaron más de 6,4 millones de pruebas PCR para SARS-CoV-2 (figura 3). Esta prueba se ha evaluado principalmente en muestras nasofaríngeas, que implican la necesidad de personal sanitario para la realizar las tomas y medidas adecuadas de protección por el elevado riesgo de transmisión durante su recolección. Por otra parte, la realización de PCR requiere una infraestructura sofisticada y tiene un elevado precio. Por ello es fundamental encontrar nuevas estrategias de optimización de las técnicas diagnósticas, para que el sistema sanitario alcance una capacidad diagnóstica adecuada y coste-efectiva, y para facilitar la realización de la prueba a gran escala.

Figura 3. Número total de pruebas PCR realizadas en España hasta el 27 de agosto de 2020



PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

GOBIERNO DE ESPAÑA
MINISTERIO DE SANIDAD

TOTAL PCRs REALIZADAS HASTA EL 27 DE AGOSTO DE 2020				
CCAA	TOTAL A 27/08/2020	DEL 21/08 AL 27/08/2020	Incremento porcentual	Tasa PCR por 1000 hab
ANDALUCÍA	538.402	55.327	11%	63,74
ARAGÓN	210.199	18.920	10%	158,71
ASTURIAS, PRINCIPADO DE	217.710	13.173	6%	213,44
BALEARS, ILLES	216.327	22.254	11%	180,49
CANARIAS	221.157	19.430	10%	99,61
CANTABRIA	113.306	10.692	10%	194,70
CASTILLA Y LEÓN	371.364	33.104	10%	154,55
CASTILLA-LA MANCHA	225.609	18.070	9%	110,68
CATALUÑA	1.209.836	105.691	10%	158,99
COMUNIDAD VALENCIANA	583.580	49.459	9%	116,75
EXTREMADURA	108.538	13.081	14%	102,12
GALICIA	335.263	27.806	9%	124,23
MADRID, COMUNIDAD DE	1.154.932	99.828	9%	172,75
MURCIA, REGIÓN DE	139.767	15.404	12%	93,52
NAVARRA, COM. FORAL DE	153.457	11.991	8%	235,17
PAÍS VASCO	543.115	46.036	9%	248,92
RIOJA, LA	64.654	5.770	10%	205,59
CEUTA	4.585	333	8%	54,30
MELILLA	4.732	225	5%	56,14
ESPAÑA	6.416.533	566.594	10%	136,23

Fuente: Consejerías de Sanidad de las Comunidades Autónomas. Datos suministrados al Ministerio de Sanidad

2.3. DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR SARS-COV-2

Entre los métodos directos de diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 destacan la detección de genes virales específicos a través de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en el tiempo real (RT-PCR, del inglés *reverse transcription polymerase chain reaction*)) o de antígenos virales, mediante ensayos de flujo lateral, frente a los métodos indirectos o serológicos, que detectan los anticuerpos producidos por el sistema inmunitario en respuesta a la infección viral (pruebas de inmunoglobulina M (IgM)/inmunoglobulina G (IgG)).

2.3.1. Detección de ácidos nucleicos mediante RT-PCR

El diagnóstico de infección activa por SARS-CoV-2 se realiza fundamentalmente con la detección directa de ARN viral mediante técnicas de amplificación de ácidos nucleicos mediante RT-PCR en tiempo real o una técnica molecular equivalente. La RT-PCR es una técnica que produce resultados en unas pocas horas con un alto rendimiento, y se basa en dos reacciones consecutivas: en primer lugar, la conversión de ARN en ADN complementario (ADNc) a través de una enzima de transcripción inversa, y en segundo lugar, la amplificación de la muestra de ADNc por reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores específicos de genes y sondas de hidrólisis marcadas con fluorescencia [8,9]. El primer paso produce plantillas de ADN que se utilizarán en el segundo paso, donde el número de copias del ADN aumenta a lo largo de ciclos térmicos repetidos. Los cebadores específicos de genes guían la segunda reacción para que únicamente se amplifique la región seleccionada en el genoma, mientras que las sondas producen señales fluorescentes en cada amplificación exitosa de las regiones diana, lo que permite un sistema de reacción cuantificable [10]. La RT-PCR se considera la técnica de referencia para la detección de SARS-Cov-2 debido a su capacidad para medir directamente genes virales en lugar de biomarcadores secundarios como antígenos o anticuerpos.

La muestra recomendada para esta técnica es ARN extraído de muestras del tracto respiratorio superior, generalmente exudado nasofaríngeo tomado mediante hisopo. La toma de este tipo de muestra es incómoda y molesta para el paciente, pudiendo provocar incluso tos y estornudos, lo que podría suponer una exposición a aerosoles infecciosos del personal sanitario.

Una de las posibles estrategias de optimización es investigar el uso de muestras alternativas al exudado nasofaríngeo, especialmente aquellas que sean fáciles de obtener y que minimicen el riesgo, como la saliva o el hisopo nasal, y que podría llevar a un cambio sustancial en el proceso de toma de muestra, con la auto-recolección por parte del paciente.

Los primeros estudios que investigaron el uso de saliva para detección de SARS-CoV-2 sugirieron que puede ser una alternativa aceptable al exudado nasofaríngeo [11-13]. Sin embargo, se han publicado resultados heterogéneos al respecto, con sensibilidades en el rango del 30%-100% [14-17]. Por otra parte, la mayoría de estudios que han evaluado la detección del SARS-CoV-2 en saliva se han realizado en pacientes ingresados por Covid-19, y algunos estuvieron limitados por la falta de recogida simultánea de muestra nasofaríngea y saliva, y por la composición reducida de las cohortes, que incluían principalmente adultos y pacientes sintomáticos [18,19]. Todo ello ha limitado la generalización de los hallazgos. Además, los procedimientos para recolectar muestras de saliva han diferido sustancialmente entre los estudios, desde la recogida supervisada por personal sanitario [11-15] hasta la auto-recolección no supervisada [20-22]. Estas diferencias en el muestreo de saliva pueden explicar los diferentes resultados de los estudios publicados.

En el entorno comunitario, el uso de saliva puede ser particularmente atractivo por la facilidad de recolección y el reducido equipo requerido, pero la información publicada es escasa e inconsistente. Si bien los hallazgos de un estudio en 45 pacientes respaldan el potencial de estas muestras para detectar el SARS-CoV-2 en pacientes ambulatorios [15], se ha encontrado una sensibilidad reducida comparada con la del exudado nasofaríngeo en una cohorte reciente en el entorno comunitario, lo que genera inquietud sobre el uso de saliva en este marco [22,23]. Por lo tanto, para recomendar la muestra de saliva como un tipo de muestra alternativo para la detección del SARS-CoV-2 en el entorno comunitario, se necesitan estudios clínicos más amplios.

2.3.2. Prueba de detección de antígenos

Con el avance de la pandemia han surgido otras pruebas de diagnóstico directo alternativo a la RT-PCR, como la prueba rápida de detección de antígenos (*Antigen Rapid diagnostic test, Ag-RDT*) basada en la detección de proteínas virales específicas de SARS-CoV-2 producidas por la replicación viral en las secreciones respiratorias (www.ecdc.europa.eu). La mayoría de ellos se

basan en la técnica de inmunocromatografía de difusión (*lateral-flow*) y se presentan en pequeños kits que contienen todo el material necesario para hacer las determinaciones individualmente. Esta prueba presenta varias ventajas potenciales sobre los métodos moleculares [24]. A diferencia de la RT-PCR, la prueba rápida de antígeno es relativamente económica, sencilla de realizar y fácil de interpretar, no requiere infraestructura y permite obtener resultados en unos pocos minutos [25] en el mismo punto de atención al paciente, lo que facilita tomar decisiones inmediatas sobre el aislamiento y las intervenciones terapéuticas en las personas infectadas. Además, las pruebas de antígenos son capaces de identificar a las personas infectadas poco después de la infección, cuando la carga viral y la probabilidad de transmisión son más altas [28]. A pesar de la menor sensibilidad en comparación con los ensayos moleculares, la posibilidad de repetición de pruebas con un procedimiento de bajo coste, y la detección en tiempo real de los pacientes más infecciosos [26,27] hacen del antígeno una prueba potencialmente muy valiosa en términos de vigilancia, para rastrear y prevenir la propagación de la infección [28,29].

La información sobre el rendimiento de la prueba de antígeno en el lugar de atención al paciente es limitada. La sensibilidad de los test de antígenos de primera generación es en general baja [30]. Además, la mayoría de estudios se han realizado con un número relativamente bajo de muestras, y los que tienen datos clínicos disponibles incluyeron principalmente pacientes sintomáticos [25,31-33], por lo que la principal incertidumbre es la precisión de la prueba en pacientes asintomáticos y en rangos extremos de edad, como niños o ancianos. Para poder evaluar el rendimiento real de una prueba en el lugar de atención al paciente, se debe realizar en condiciones de la vida real, incluyendo pacientes de forma consecutiva y obtener resultados in situ.

El dispositivo de prueba rápida de antígeno Panbio COVID-19 (Ag-RTD) (Abbott Rapid Diagnostic Jena GmbH, Jena, Alemania) se ha comercializado para la detección cualitativa del antígeno SARS-CoV-2 en muestras de hisopos nasofaríngeos, con alta sensibilidad y especificidad, aunque menor en comparación con los ensayos moleculares. Una cuestión relevante sería si el uso de muestras alternativas podría ser adecuado para detectar el SARS-CoV-2 mediante esta técnica, ya que igual que para la RT-PCR, la toma de exudado nasofaríngeo requiere profesionales capacitados y equipo de protección individual (EPI). La disponibilidad de

una muestra más simple que incluso podría ser auto-recolectada, como hisopos nasales o saliva, facilitaría aún más el procedimiento y permitiría realizar pruebas a gran escala.

2.3.3. Pruebas serológicas

Las técnicas serológicas se basan en la detección de anticuerpos del SARS-CoV-2, generalmente IgG o IgM, en el suero de las personas infectadas por SARS-CoV-2 o vacunadas contra la COVID-19. Los niveles de IgM aumentan durante la primera semana después de la infección por SARS-CoV-2, alcanzan su punto máximo después de 2 semanas y luego vuelven a caer a niveles mínimos en la mayoría de las personas. IgG es detectable después de una semana y se mantiene en un nivel alto durante un período prolongado [34], y puede ser útil para proteger contra la reinfección. Por tanto, el hecho de que los anticuerpos no aparecen hasta varios días después de la infección hace que su uso en el diagnóstico de la enfermedad aguda sea muy limitado. Su mayor utilidad es evaluar la protección contra la exposición viral subsiguiente, el rastreo de contactos, y diferenciar serológicamente un individuo que ha pasado la infección de forma natural (pues presentará anticuerpos IgG frente al antígeno N y frente al antígeno S) de un individuo que solo ha sido vacunado, que presentará únicamente anticuerpos IgG frente al antígeno S, ya que las vacunas existentes en la actualidad solo generan respuesta inmunitaria frente al antígeno S.

Para intentar resolver estas cuestiones, específicamente la utilidad de muestras y métodos alternativos a la PCR nasofaríngea con el fin de facilitar el diagnóstico de la infección a nivel comunitario, planteamos una investigación cuyo objetivo es evaluar el rendimiento de la saliva para detectar SARS-CoV-2 mediante RT-PCR, y el rendimiento de la prueba rápida de detección de antígenos en distintas muestras, en una cohorte prospectiva de pacientes ambulatorios, adultos y niños, con sospecha de COVID-19 y con un amplio espectro clínico de la enfermedad, incluyendo casos asintomáticos, y comparándolos con la técnica de referencia (RT-PCR en exudado nasofaríngeo). Secundariamente, se ha evaluado el rendimiento de la prueba rápida Panbio COVID-19 en el punto de atención al paciente en condiciones de la vida real y distintos escenarios clínicos (centros de atención primaria y servicio de urgencias), y la precisión de la prueba en pacientes sintomáticos y asintomáticos, y en muestras nasofaríngea, nasal y saliva.





3. HIPÓTESIS



3. HIPÓTESIS

La saliva y los test rápidos de detección de antígenos son, respectivamente, una muestra y una técnica diagnóstica adecuadas para la detección de SARS-CoV-2 en el entorno comunitario, y con ellas se puede identificar eficazmente a las personas con mayor riesgo de transmisión, lo que permite recomendar su uso a gran escala como alternativa al exudado nasofaríngeo y a la PCR en el diagnóstico de la enfermedad de Covid-19, y por tanto facilitar y simplificar el cribado a nivel comunitario y mejorar la relación coste-efectividad del diagnóstico.







Biblioteca
UNIVERSITAS

4. OBJETIVOS



4. OBJETIVOS

El **objetivo general** fue evaluar el rendimiento de la muestra de saliva y del test rápido de antígenos realizado en el punto de atención para la detección del SARS-CoV-2 en el entorno comunitario.

Los **objetivos específicos** fueron los siguientes:

- Evaluar el rendimiento de la RT-PCR en saliva comparado con la RT-PCR en muestra nasofaríngea.
- Evaluar el rendimiento de la prueba del antígeno Panbio Covid-19 Ag-RDT realizado en los puntos habituales de atención al paciente en las muestras de exudado nasofaríngeo, saliva y muestra nasal comparado con la prueba RT-PCR en muestra nasofaríngea.
- Estudiar la relación entre variables clínicas y microbiológicas y el rendimiento de distintas muestras y técnicas diagnósticas.
- Evaluar el rendimiento de distintos métodos de recolección de saliva para la detección del SARS-CoV-2.







5. MATERIAL Y MÉTODOS



5.1. DISEÑO

Se realizó un estudio transversal en el marco de una cohorte prospectiva de pacientes que acuden a un centro de atención primaria (CAP) o al servicio de urgencias por síntomas compatibles con la Covid-19 o por contacto estrecho, para realizar una prueba de PCR para SARS-CoV-2.

5.2. SUJETOS Y ÁMBITO DE ESTUDIO

El ámbito del estudio comprendía tres CAP de los Departamentos de Salud 17 y 20 de la provincia de Alicante y el servicio de urgencias del Hospital General Universitario de Elche (HGUE). Para este estudio se invitó a participar a todos los pacientes que acudían al CAP para la realización de la prueba PCR para determinar la presencia de SARS-CoV-2, según prescripción médica, o al servicio de urgencias del HGUE por síntomas compatibles con la Covid-19 y que cumplían los siguientes **criterios de inclusión**: pacientes sintomáticos o personas asintomáticas expuestas al SARS-CoV-2 como contacto estrecho, (según el Ministerio de Sanidad, a nivel comunitario se considera contacto estrecho a cualquier persona que haya estado en el mismo lugar que un caso, a una distancia <2 metros, durante un tiempo total acumulado >15 minutos en 24 horas), que aceptaron participar y firmaron el consentimiento informado.

Los **criterios de exclusión** para no participar en el estudio fueron el rechazo de la toma de muestras por parte del paciente, no cumplir con los requisitos de contacto estrecho o tener un resultado positivo previo de PCR para SARS-CoV-2, y la indicación de repetir la prueba para finalizar el aislamiento.

Esta investigación fue aprobada por el Comité Técnico Asesor Institucional COVID-19 del HGUE.

5.3. PROTOCOLO DE ACTUACIÓN

5.3.1. Reclutamiento de pacientes y recogida de datos demográficos y clínico-epidemiológicos

El reclutamiento de pacientes se llevó a cabo entre septiembre y octubre de 2020. En los CAP se invitó a participar de forma consecutiva a los pacientes candidatos que acudían para realizar una prueba de RT-PCR por presentar síntomas de COVID-19 o por ser contactos asintomáticos

de casos Covid-positivos, y en el Servicio de Urgencias se incluyeron también de forma consecutiva a los pacientes que acudían con síntomas compatibles con la Covid-19. Todos los pacientes evaluados en Atención Primaria que cumplían los criterios de inclusión y aceptaron participar en el estudio, firmaron el consentimiento informado. A continuación, rellenaron un cuestionario clínico-epidemiológico (anexo 1), mediante el cual se recopilaron los datos demográficos y clínicos. El cuestionario incluyó información sobre 6 síntomas específicos y su temporalidad y el número de días desde el inicio de los síntomas. Los datos clínicos de los pacientes que acudieron a urgencias se obtuvieron a través de consulta de las historias clínicas electrónicas, así como las comorbilidades de todos los participantes en el estudio.

5.3.2. Proceso de toma de muestras

En Atención Primaria, a todos los participantes se les pidió que recolectaran saliva en un recipiente vacío estéril de 100 ml, y se les dio instrucciones concretas en cada centro. A continuación, personal de enfermería cualificado y con equipo de protección individual (EPI) obtuvo una muestra nasal y dos muestras nasofaríngeas consecutivas de acuerdo con el procedimiento estándar recomendado y utilizando el mismo tipo de hisopo nasofaríngeo en todos los CAP.

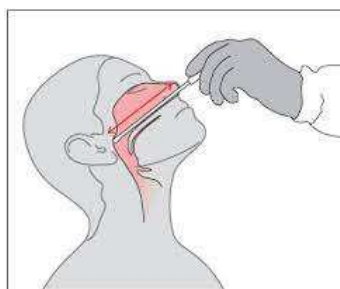
Para evaluar las diferencias en los métodos de recolección, las muestras de saliva se obtuvieron de forma diferente en cada uno de los centros participantes mediante asignación aleatoria: en el centro A la saliva se recogió bajo la supervisión del personal sanitario (**recolección supervisada, RS**) que instruyó al paciente para producir y acumular saliva en la boca durante 1 a 2 minutos, moviendo la boca y pasando la punta de la lengua por las mejillas y encías, para luego escupir repetidamente un mínimo de 1 ml de saliva en el recipiente de recolección; en el centro B, las muestras de saliva se obtuvieron después de **lavado orofaríngeo (LOF)**, que consistió en enjuagar la boca con 2 ml de solución salina y escupir la solución en el recipiente de recogida; y en el centro C, las muestras de saliva se recolectaron de forma independiente por el paciente (**auto-recolección, AR**), siguiendo las siguientes instrucciones escritas: “Para recolectar saliva, incline la cabeza hacia adelante para permitir que la saliva se acumule en la parte delantera de la boca y escupa hasta un mínimo de 1 ml de saliva (media cucharadita) en el recipiente de recolección “. El transporte, almacenamiento y procesamiento de las muestras, se estandarizaron en los tres centros para reducir la variabilidad.

En el servicio de urgencias se incluyeron pacientes consecutivos que acudían con clínica compatible con la Covid-19. Personal cualificado y con el correspondiente EPI tomó dos muestras de exudado nasofaríngeo de forma consecutiva.

En todos los puntos de atención al paciente el personal de enfermería realizó la toma de muestras siguiendo el mismo procedimiento y utilizando el mismo tipo de hisopo. Para la toma de muestra nasofaríngea se pasó un hisopo flexible con minitip a través de la fosa nasal del paciente hasta que se alcanzó la nasofaringe posterior, se dejó en su lugar durante varios segundos para absorber las secreciones y luego se extrajo lentamente mientras se giraba (figura 4A). Para la toma de muestra nasal se procedió de la misma forma, pero en este caso el hisopo se mantuvo en la fosa nasal (figura 4B). Todos los hisopos se conservaron en un medio de transporte estéril que contenía 3 ml de una solución salina de guanidina (Mole Bioscience, SUNGO Europe BV, Amsterdam, Países Bajos). Después de la recolección, las muestras para diagnóstico molecular por PCR, (la saliva restante y el otro exudado nasofaríngeo), fueron transportadas diariamente dentro de las 2 horas posteriores a la recolección de la muestra, siguiendo el proceso habitual, al laboratorio de Microbiología correspondiente. Las muestras nasofaríngeas se analizaron inmediatamente, y las muestras de saliva se congelaron (-20 °C) y se analizaron dentro de las 2 semanas posteriores a la recolección.

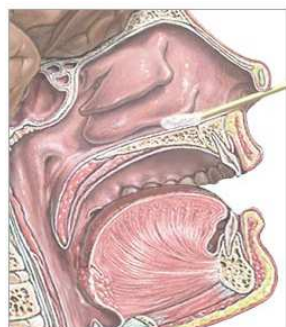
Figura 4. Procedimiento de toma de muestras. (A) Exudado nasofaríngeo. (B) Exudado nasal (Fuente: ADAM).

A



Sawiec P, et al. *Med. Prakt.*, 2020, 5: 105-109

B



5.4. PROCEDIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS

El diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 se llevó a cabo a partir de las muestras obtenidas mediante la realización en paralelo de dos técnicas diagnósticas, una prueba rápida de detección de antígenos virales y una prueba de diagnóstico molecular o reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.

5.4.1. Prueba rápida de detección de antígenos

La detección de antígenos se llevó a cabo en uno de los dos exudados nasofaríngeos, en las muestras nasales, y en las muestras de saliva obtenidas en los CAP de forma paralela, en el mismo lugar de atención al paciente, minutos después de la recolección (figura 5). En uno de exudados nasofaríngeos obtenidos en el servicio de urgencias, también se realizó la prueba de detección de antígenos en el mismo lugar de recogida inmediatamente después de la toma de muestras.

Figura 5. Realización en paralelo de la prueba rápida de detección de antígenos en muestra nasofaríngea, nasal y saliva en el punto de atención al paciente.



La evaluación antigénica en todas las muestras se realizó mediante el Panbio COVID-19 Ag RTD (Panbio™ Covid-19 Ag-Rapid Test Device, Abbott Rapid Diagnostic Jena GmbH, Jena, Alemania) una prueba inmunocromatográfica con una tira de membrana prerrevestida con anticuerpos contra la nucleocápside del SARS CoV-2. El kit se utilizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (figura 6). Resumiendo, se sumergieron los hisopos nasales y nasofaríngeos en 2 tubos de extracción que contenían 300 µL de tampón del kit. Se empapó un tercer hisopo en la muestra de saliva y luego se sumergió en un tercer tubo con 300 µL. Los 3 tubos estaban listos para ser aplicados al dispositivo de antígeno correspondiente. Para la interpretación de los resultados, la presencia de solo la línea de control (C) y ninguna línea de prueba (T) dentro

de la ventana de resultados indicó un resultado negativo. La presencia de la línea de prueba (T) y la línea de control (C) dentro de la ventana de resultados, independientemente de la línea que apareciera primero, indicó un resultado positivo. Si la línea de control (C) no es visible dentro de la ventana de resultados después de realizar la prueba, el resultado se consideró no válido (figura 7).

Figura 6. Procedimiento de la prueba Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device

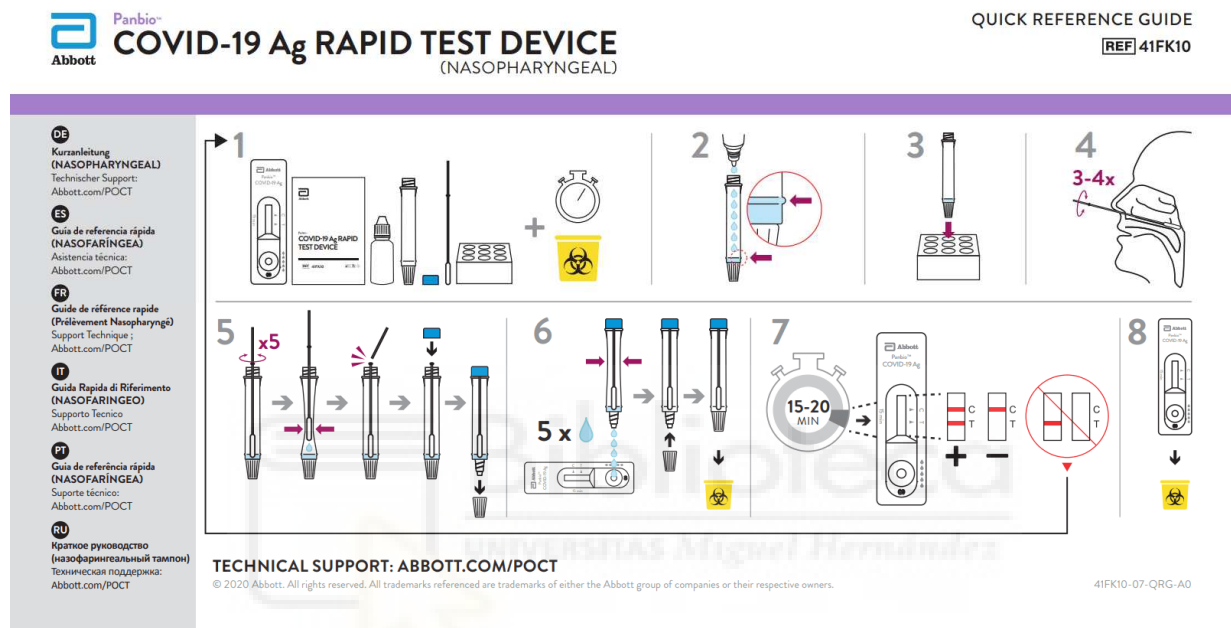
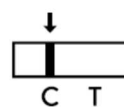


Figura 7. Interpretación de la prueba de antígeno Panbio™ COVID-19 Ag-RTD.

NEGATIVA

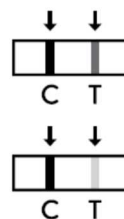
La presencia de solo la línea de control (C) y ninguna línea de prueba (T) dentro de la ventana de resultados indica un resultado negativo.



POSITIVA

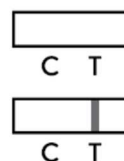
La presencia de la línea de prueba (T) y la línea de control (C) dentro de la ventana de resultados, independientemente de la línea que aparezca primero, indica un resultado positivo.

⚠ **Precaución:** La presencia de cualquier línea de prueba (T), no importa cuán débil sea, indica un resultado positivo.



NO VÁLIDA

Si la línea de control (C) no está visible dentro de la ventana de resultados después de realizar la prueba, el resultado se considera inválido. Es posible que las instrucciones no se hayan seguido correctamente. Se recomienda volver a leer las instrucciones de uso antes de volver a analizar la muestra con un nuevo dispositivo de prueba.



5.4.2. Detección de ARN del SARS-CoV-2.

Se utilizó una RT-PCR a tiempo real para detectar la presencia de ácidos nucleicos del SARS-CoV-2 en las muestras obtenidas. Las muestras de exudado nasofaríngeo se analizaron inmediatamente. Las muestras de saliva se descongelaron a temperatura ambiente y se homogeneizaron con la punta de una pipeta automática antes de su procesamiento.

A. Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de ácidos nucleicos se realizó utilizando 300 µl de muestra (exudado nasofaríngeo o saliva) en un instrumento de purificación de ácidos nucleicos Chemagic 360 (PerkinElmer España SL, Madrid, España) basado en la tecnología de microesferas magnéticas.

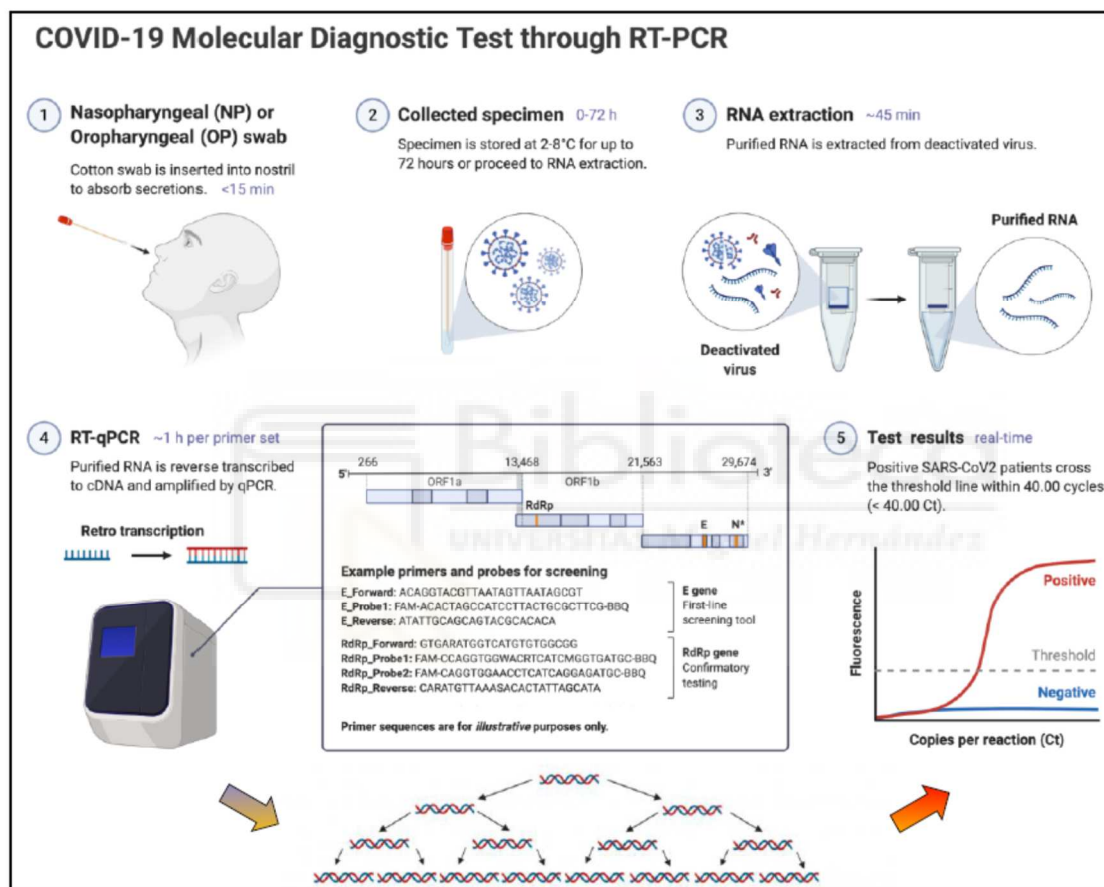
B. RT-PCR en tiempo real

En la RT-PCR en tiempo real se retrotranscribe una cadena de ARN en ADNc usando una enzima llamada transcriptasa inversa, y posteriormente se produce una amplificación selectiva de una región específica del ADN (región específica del virus), que a través de la utilización de sondas fluorescentes se identifican los productos de la PCR, para ser analizados posteriormente mediante el análisis de las curvas/picos generados por la diferencia de la temperatura de fusión (temperatura de melting, T_m). Las sondas que se unen a una parte de los fragmentos amplificados donde se encuentra la región que queremos detectar están diseñadas para separarse de esta secuencia complementaria a una temperatura específica en la que se produce un aumento de la fluorescencia. Dicha temperatura es específica para el virus. Las reacciones se caracterizan por el punto en el tiempo durante el proceso en el que se detecta por primera vez la amplificación del virus. Cuanto mayor sea el número de copias de inicio del ácido nucleico objetivo, antes se observará un aumento significativo de la fluorescencia (figura 8).

Para la detección de ARN de SARS-CoV-2 se utilizó un ensayo de RT-PCR en tiempo real dirigido al gen E (kit de gen E LightMix Modular SARS-CoV (COVID19); TIB Molbiol, Berlín, Alemania; distribuido por Roche). Se utilizaron 10 µl del eluido obtenido tras la purificación de ácidos nucleicos. Las pruebas se realizaron de acuerdo con las directrices del fabricante en un analizador cobas z 480 (Roche, Basilea, Suiza).

No hay disponibilidad de estándares de cuantificación de la carga viral, pero la técnica de RT-PCR proporciona una estimación semicuantitativa. En este sentido, el número de ciclos de amplificación en RT-PCR (ciclo umbral de positividad, *cycle threshold* (Ct)) se ha evaluado como una medida sustituta de la concentración de ARN y se correlaciona inversamente con la carga viral. Según el fabricante, un valor Ct de ≤ 40 por PCR se considera un resultado positivo.

Figura 8. Esquema del funcionamiento de la prueba RT-PCR [35]



5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Las variables continuas se expresaron como mediana (Q1 a Q3) y las categóricas como porcentajes. Para la comparación de dos grupos en las variables continuas se utilizó la prueba de Wilcoxon o t de Student y para la de tres o más grupos se utilizó el análisis de varianza de Kruskal-Wallis (ANOVA). Para la comparación de grupos en las variables categóricas se utilizó el test de chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher.

Se calcularon los porcentajes de concordancia positiva, negativa y general (*positive percent agreement* [PPA], *negative percent agreement* [NPA] y *overall percent agreement* [OPA]) para

comparar el resultado de la RT-PCR en las muestras de saliva recogidas por distintos métodos (RS, LOF y AR) con RT-PCR en muestra nasofaríngea. Los resultados positivos de las muestras nasofaríngeas o de saliva se consideraron resultados verdaderos positivos para los cálculos de sensibilidad, por lo que para esta muestra el PPA y la sensibilidad no son necesariamente equivalentes. Los pacientes con un resultado indeterminado por RT-PCR para una muestra nasofaríngea o saliva no fueron considerados para los cálculos de concordancia. También se calcularon los PPA, NPA (en este caso equivalentes a sensibilidad y especificidad), y OPA para comparar el resultado del antígeno Panbio Covid-19 en muestras nasofaríngeas, nasales y saliva con RT-PCR en exudado nasofaríngeo como estándar de referencia. La concordancia en el rendimiento se evaluó mediante el coeficiente kappa de Cohen (k).

El rendimiento de las muestras de saliva también se evaluó estratificando por la presencia de síntomas. Dada la creciente evidencia de una relación positiva entre los valores bajos de Ct y la probabilidad de cultivar virus viable y, por lo tanto, con potencial infeccioso, también evaluamos el rendimiento de las muestras de saliva de acuerdo con los valores de Ct para muestras nasofaríngeas con diferentes puntos de corte que se han asociado con mayores probabilidades de cultivo viral positivo (≤ 25 y ≤ 30) [29].

El rendimiento de la prueba de antígeno en muestra nasofaríngea también se evaluó estratificando por edad, sexo, valor de Ct en RT-PCR y duración de los síntomas. Se realizó una regresión logística multivariante para evaluar los predictores de la sensibilidad de la prueba de antígeno en pacientes sintomáticos.

Los análisis estadísticos se realizaron con el software R, versión 4.0.3. El porcentaje de concordancia positiva o negativa y los coeficientes kappa (κ) se calcularon utilizando el paquete *caret* [36]. Para el análisis gráfico se utilizó el paquete *ggplot2* [37].

Para el objetivo principal del estudio de idoneidad de la saliva para el diagnóstico molecular, se planeó incluir 133 pacientes por brazo, para conseguir un poder estadístico del 80% para detectar una diferencia de sensibilidad del 10% entre los diferentes métodos de recolección.

El tamaño muestral estimado en la evaluación de la prueba de antígeno en muestra nasofaríngea para una sensibilidad de al menos el 91,4% (según el fabricante), una precisión del 2,5%, y una potencia estadística del 80% fue de 762 pacientes. Para una especificidad de al menos el 97%, el tamaño de muestra requerido fue de 377 pacientes.



Biblioteca
UNIVERSITAS JAWA Barat

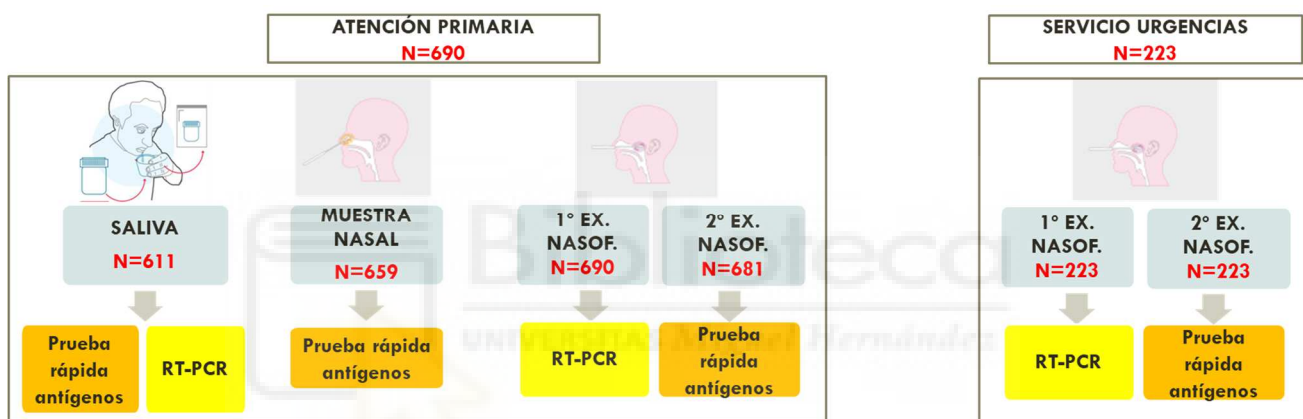
6. RESULTADOS



6.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PARTICIPANTES

Durante el período de estudio, se incluyeron un total de 913 pacientes, 690 (75,6%) desde Centros de Atención Primaria y 223 (24,4%) desde el Servicio de Urgencias. A todos ellos se les tomó una primera muestra nasofaríngea para realización de RT-PCR. Además, en 904 (99%) de los participantes se recogió un segundo hisopo nasofaríngeo para la realización de la prueba de antígeno, en 659 (72%) un hisopo nasal para la prueba de antígeno y en 611 (67%) se tomó una muestra de saliva para realizar ambas técnicas (figura 9).

Figura 9. Esquema del proceso de toma de muestras.



Las características de los participantes en el estudio se muestran en la tabla 1. La mediana de edad (Q1-Q3) fue de 41 (23-56) años y 423 (46,3%) eran hombres. Las comorbilidades más frecuentes fueron dislipidemia en 80 (22,2%) pacientes, hipertensión en 124 (17,0%) y diabetes en 60 (8,2%). En cuanto a la presencia de síntomas, 617 (67,6%) participantes eran sintomáticos y 296 (32,4%) permanecían asintomáticos. La mediana (Q1-Q3) de tiempo desde el inicio de los síntomas fue de 3 (2-5) días, y los síntomas más frecuentes fueron tos (50,1%), seguido de fiebre (46,8%), dolor de garganta (31,9%) y congestión nasal (31,3%). La mediana (Q1-Q3) de los valores de Ct fue de 24 (16-30), 22 (16-29) en pacientes sintomáticos y 28 (21-32) en asintomáticos ($p = 0,012$). Agrupando por edad, la mediana de Ct fue de 21 (15-27) en pacientes ≥ 50 años y 26 (18-31) en < 50 años ($p = 0,02$). Los datos están expresados en medianas (rango intercuartílico, RIC) para las variables continuas y las variables categóricas están representadas por número y (%).

Resultados

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes

Variable	Todos los pacientes (N = 913)	Sintomáticos (N = 617)	Asintomáticos (N = 296)	P
Edad (años) mediana (Q1–Q3)	40,6 (23–55,6)	41 (24–56,3)	39,9 (20,4–52,5)	0,086
Sexo (hombre)	423 (46,3)	289 (46,8)	134 (45,3)	0,671
Comorbilidades				
Dislipidemia	80 (22,2)	63 (24,3)	17 (16,7)	0,124
Hipertensión	124 (17,0)	96 (19,0)	28 (12,4)	0,033
Diabetes	60 (8,2)	49 (9,7)	11 (4,9)	0,029
Cardiomiopatía	55 (7,6)	43 (8,5)	12 (5,3)	0,171
Obesidad	42 (5,8)	25 (5,1)	17 (7,6)	0,228
EPOC	25 (3,4)	20 (4,0)	5 (2,2)	0,277
Cáncer activo	17 (2,3)	14 (2,8)	3 (1,3)	0,295
Lugar de atención al paciente				
Centro de Atención Primaria	690 (75,6)	416 (67,4)	274 (92,6)	<0,001
Servicio de Urgencias	223 (24,4)	201 (32,6)	22 (7,4)	<0,001
Detección de SARS-CoV-2				
ARN SARS-CoV-2 positivo ^a	196 (21,5)	156 (25,3)	40 (13,5)	<0,001
Ct, mediana (Q1–Q3)	24 (16–30)	22 (16–29)	28 (21–32)	0,012
Ct 0–20	78 (40,0)	68 (43,9)	10 (25,0)	0,10
Ct 21–25	29 (14,9)	24 (15,5)	5 (12,5)	
Ct 26–30	40 (20,5)	28 (18,1)	12 (30,0)	
Ct 31–35	40 (20,5)	30 (19,4)	10 (25,0)	
Ct >35	8 (4,1)	5 (3,2)	3 (7,5)	
Resultado de antígeno positivo (cualquiera NF-nasal-saliva)	120 (13,1)	106 (17,2)	14 (4,7)	<0,001
Resultado de antígeno en NF positivo	118 (12,9)	105 (17,2)	13 (4,5)	<0,001
Síntomas				
Nº de días con síntomas		3 (2–5)		
Tos		309 (50,1)		
Fiebre		289 (46,8)		
Dolor de garganta		196 (31,9)		
Congestión nasal		193 (31,3)		
Disnea		115 (18,6)		
Anosmia/ageusia		53 (8,8)/44 (7,1)		
Otros: malestar/dolor de cabeza		104 (17)/140 (23)		

Abreviaturas: EPOC, enfermedad pulmonar obstructiva crónica; Ct, umbral de ciclo de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa; NF, nasofaríngeo; ARN, ácido ribonucleico.

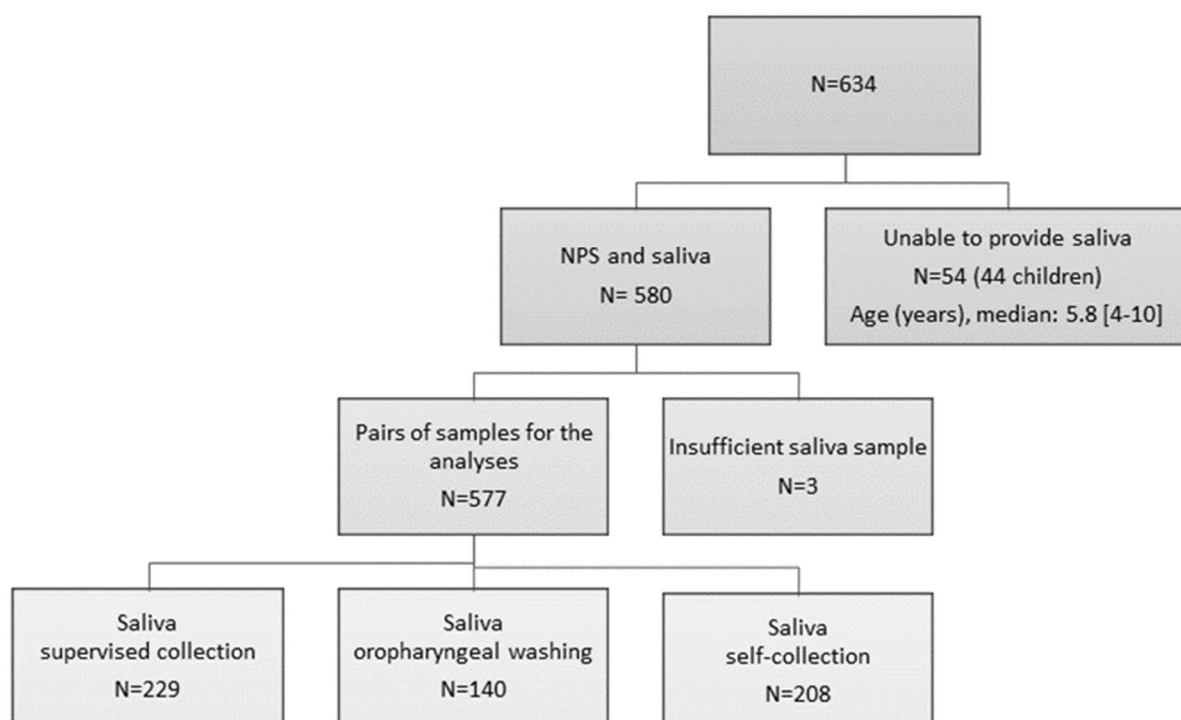
^aRealizado en muestras nasofaríngeas.

6.2. EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA RT-PCR EN SALIVA PARA DETECCIÓN DEL SARS-COV-2

6.2.1. Características de los pacientes y tasas de positividad.

Para la investigación principal sobre el rendimiento de la PCR en saliva, se invitó a 634 pacientes (103 niños) a participar en el estudio entre el 15 de septiembre y el 29 de octubre de 2020. Cincuenta y cuatro pacientes (mediana de edad [Q1 a Q3], 5,8 [4 a 10] años; 44 niños) no pudieron proporcionar muestras de saliva, y 3 (0,5%) de las muestras fueron insuficientes para realizar el análisis en el laboratorio, por lo que finalmente se incluyeron un total de 577 pares de muestras de exudado nasofaríngeo y saliva (229 RS, 140 LOF, 208 AR) (figura 10). Las características demográficas y clínicas de los pacientes según el método de recogida de saliva se muestran en la tabla 2. Hubo 120 (20,8%) resultados positivos para ARN de SARS-CoV-2 en muestra nasofaríngea o saliva, 50 (21,8%) en la recolección SV, 28 (20%) en el LOF y 42 (20,2%) en el grupo de AR. Las muestras nasofaríngeas y de saliva de 2 (0,3%) y 9 (1,6%) pacientes respectivamente, generaron resultados no válidos por fallo del control interno.

Figura 10. Diagrama de flujo del estudio



Resultados

Tabla 2. Características demográficas y clínicas de los pacientes según los métodos de recolección de muestras de saliva.

	Cohorte general		Recogida supervisada (RS)		Lavado orofaríngeo (LOF)		Auto-recolección (AR)	
	Todos los pacientes	ARN SARS-CoV-2 positivo	Todos los pacientes con RS ^a	ARN SARS-CoV-2 positivo	Todos los pacientes con LOF	ARN SARS-CoV-2 positivo	Todos los pacientes con AR	ARN SARS-CoV-2 positivo
Nº pacientes	577	120 (20,8)	229	50 (21,8)	140	28 (20)	208	42 (20,2)
Sexo, hombre	251 (43,5)	57 (47,5)	91 (39,7)	22 (44)	66 (47,1)	13 (46,4)	94 (45,2)	22 (52,4)
Edad (años), mediana (Q1-Q3)	39 (24-51)	42 (28-54)	39 (21-48)	42 (29-49)	36 (23-51)	41 (27-54)	40 (27-54)	41 (28-57)
Nº (%) de pacientes de edad:								
0-14	59 (10,2)	5 (4,2)	28 (12,2)	3 (6)	16 (11,4)	1 (3,6)	15 (7,2)	1 (2,4)
15-50	368 (63,8)	79 (65,8)	152 (66,4)	35 (70)	87 (62,1)	18 (64,3)	129 (62)	26 (61,9)
50-65	105 (18,2)	26 (21,7)	40 (17,5)	10 (20)	26 (18,6)	8 (28,6)	39 (18,8)	8 (19)
>65	45 (7,8)	10 (8,3)	9 (3,9)	2 (4)	11 (7,9)	1 (3,6)	25 (12)	7 (16,7)
Nº (%) con las siguientes comorbilidades:								
Hipertensión	42 (7,3)	13 (10,8)	17 (7,4)	3 (6)	12 (8,6)	2 (7,1)	13 (6,2)	8 (19)
Dislipidemia	37 (6,4)	15 (12,5)	17 (7,4)	5 (10)	11 (7,9)	5 (19,2)	9 (4,3)	5 (11,9)
Diabetes	19 (3,3)	9 (7,5)	10 (4,4)	3 (6)	4 (2,9)	3 (10,7)	5 (2,4)	3 (7,1)
Cardiomiopatía	17 (2,9)	3 (2,5)	9 (3,9)	0 (0)	7 (5)	2 (7,1)	1 (0,5)	1 (2,4)
Obesidad	25 (4,3)	10 (8,3)	9 (3,9)	2 (4)	8 (5,7)	3 (10,7)	8 (3,8)	5 (11,9)
Presencia de síntomas el día de la toma de muestras								
Nº (%) sintomáticos	336 (58,2)	86 (71,7)	145 (63,3)	37 (74)	68 (48,6)	17 (60,7)	123 (59,1)	32 (76,2)
Días con síntomas, mediana (Q1-Q3)	4 (3-6)	5 (3-7)	3 (2-5)	4 (2-7)	4 (3-5)	4 (3-6)	4 (3-6)	5 (3-7)
Sensibilidad de las muestras de saliva (IC 95%)								
Global	76,7% (67,9-83,7)		86% (72,6-93,7)*		75% (54,8-88,6)		66,7% (50,4-80)	
Pacientes sintomáticos	77,9% (67,4-85,9)		89,2% (73,6-96,5)**		70,6% (44-88,6)		68,8% (49,9-83,3)	
Pacientes asintomáticos	73,5% (55,3-86,5)		76,9% (46-93,8)		81,8% (47,8-96,8)		60% (27,4-86,3)	
Ct ≤ 25 ^b	96,7% (87,5-99,4)		100% (85,9-100)		93,3% (66-99,7)		93,3% (66-99,7)	
Ct ≤ 30	91,6% (82,9-96,3)		97,4% (84,9-99,9)		81% (57,4-93,7)		91,3% (70,5-98,5)	
Ct > 30	43,2% (27,5-60,4)		45,5% (18,1-75,4)		57,1% (20,2-88,2)		36,8% (17,2-61,4)	

^aLos asteriscos indican las diferencias significativas entre recolección supervisada y auto-recolección (*P = 0,028, **P=0,035).

^bCt de la RT-PCR para hisopos nasofaríngeos (o muestras de saliva en caso de muestra nasofaríngea negativa y saliva positiva).

6.2.2. Sensibilidades de las diferentes muestras para la detección del SARS-CoV-2 y concordancia entre las muestras de saliva y nasofaríngeas.

En la tabla 3 se muestra el resultado cualitativo para el ARN del SARS-CoV-2 obtenido en muestras nasofaríngeas y saliva según los distintos métodos de recogida. La figura 11 muestra la concordancia de los resultados positivos de la prueba entre la muestra nasofaríngea y los diferentes tipos de muestras de saliva (hubo 6 muestras de saliva con resultado positivo que tuvieron un resultado negativo en la muestra nasofaríngea). La sensibilidad para las muestras nasofaríngeas fue por lo tanto del 95% (IC 95%, 88,9-97,9), y entre las muestras de saliva, la RS mostró la mejor tasa de detección de casos (43 de 50 pacientes infectados), con una sensibilidad significativamente mayor que las muestras AR (86% [IC 95%, 72,6-93,7] versus 66,7% [IC 95%, 50,4-80]; $p=0,027$). El método de LOF detectó 21 de 28 individuos (sensibilidad, 75% [IC 95%, 54,8-88,6]) (tabla 1). La mayor sensibilidad se obtuvo al combinar la muestra nasofaríngea con la saliva recolectada bajo supervisión (sensibilidad, 97,5% [IC 95%, 92,3-99,3]). La tabla 4 muestra la concordancia de los tres tipos diferentes de muestras de saliva con la muestra nasofaríngea. La mejor concordancia se encontró para las muestras del grupo RS, con un coeficiente kappa de 0,85. Para los grupos LOF y AR, el coeficiente kappa fue 0,76.

Tabla 3. Comparación de los resultados cualitativos de hisopos nasofaríngeos y muestras de saliva según el método de recolección.

Resultado de exudado nasofaríngeo ^a	Nº de muestras de saliva con el resultado indicado, tomado por:								
	Recolección supervisada (n=229)			Lavado orofaríngeo (n=140)			Auto-recolección (n=208)		
	Pos	Neg	Ind	Pos	Neg	Ind	Pos	Neg	Ind
Pos	39	7	0	18	7	0	28	14	0
Neg	4	171	7	2	110	2	0	166	0
Ind	0	1		1	0		0	0	

^aPos, positivo; Neg, negativo; Ind, indeterminado.

Figura 11. Positividad para ARN de SARS-CoV-2 en exudado nasofaríngeo (NPS, *nasopharyngeal swabs*) y en las diferentes muestras de saliva incluidos los valores de Ct de especímenes discordantes. El asterisco indica una muestra de saliva positiva para la cual se confirmó un hisopo nasofaríngeo negativo 6 días después.

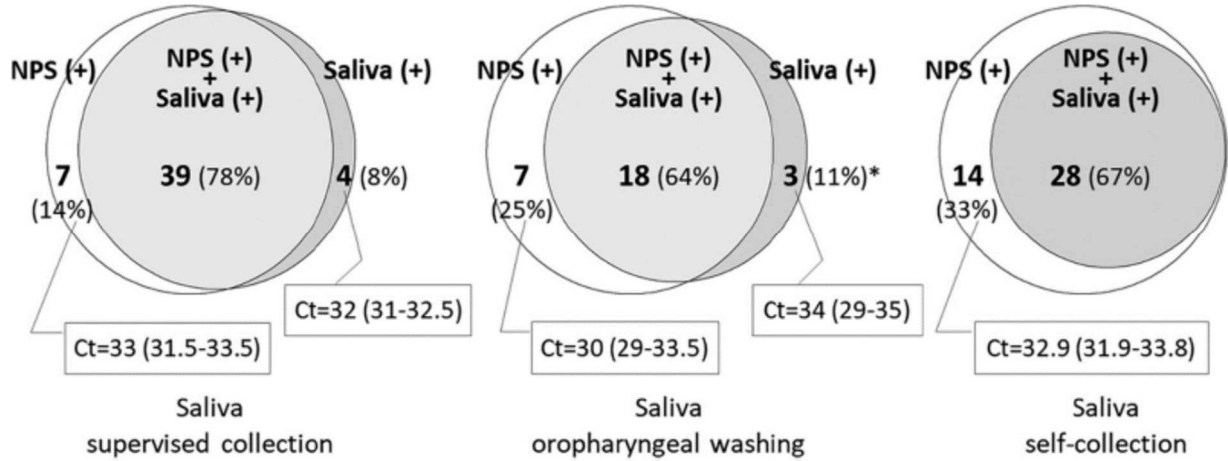


Tabla 4. Concordancia de las distintas muestras de saliva con la muestra nasofaríngea

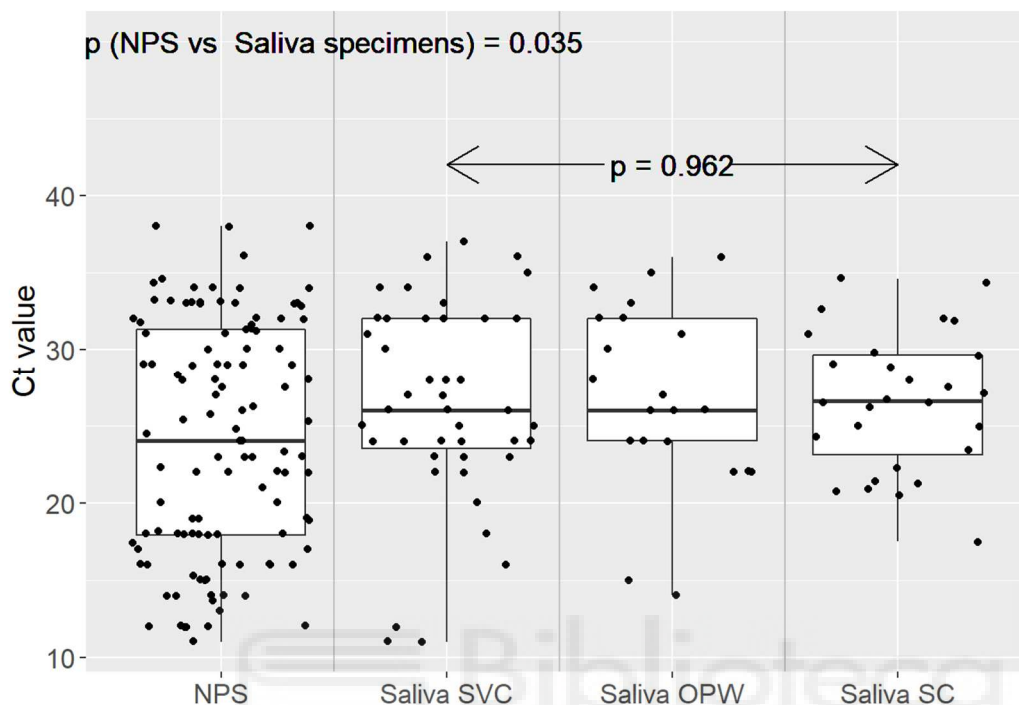
Tipo de Saliva	% concordancia (IC 95%)			Índice de concordancia Kappa (IC 95%)
	PPA (IC 95%)	NPA (IC 95%)	OPA (IC 95%)	
Recolección supervisada	84,8% (70,5-93,2)	97,7% (93,9-99,3)	95% (91-97,4)	0,85 (0,76-0,93)
Lavado orofaríngeo	72% (50,4-87,1)	98,2% (93,1-99,7)	93,4% (87,5-96,8)	0,76 (0,61-0,91)
Auto-recolección	66,7% (50,4-80)	100% (97,2-100)	93,3% (88,7-96,1)	0,76 (0,64-0,88)

PPA, Positive percent agreement; NPA, Negative percent agreement; OPA, Overall percent agreement

6.2.3. Rendimiento de las diferentes muestras de saliva para la detección de SARS-CoV-2 según valores de Ct y presencia de síntomas.

Al estudiar los valores de Ct en las muestras pareadas, observamos que las medianas de los valores de Ct fueron significativamente más bajas en las muestras nasofaríngeas que en sus correspondientes muestras de saliva ($p=0,035$), aunque en 19 (15,8%) pacientes, la saliva mostró un valor de Ct más bajo que la muestra nasofaríngea correspondiente. Las medianas de Ct en los tres tipos de muestras de saliva no fueron significativamente diferentes entre sí ($p= 0,962$) (figura 12).

FIGURA 12. Valores de Ct para muestras pareadas de hisopos nasofaríngeos y muestras de saliva de todos los individuos positivos. Cada punto representa el valor Ct (en la RT-PCR) para una muestra positiva: muestra nasofaríngea (n=113), saliva obtenida bajo recolección supervisada (RS) (n=43), saliva obtenida después del lavado orofaríngeo (LOF) (n=21), o saliva obtenida por auto-recolección (AR) (n= 28).



Los valores de Ct de los resultados positivos discordantes para la detección de SARS-CoV-2 entre muestras pareadas de hisopo nasofaríngeo y saliva se muestra en la figura 11. Las medianas (Q1 a Q3) de Ct para resultados positivos únicamente en muestra nasofaríngea o únicamente en saliva fueron 33 (31 a 34) y 32 (29 a 33,5), respectivamente.

Las sensibilidades de las diferentes muestras para la detección del SARS-CoV-2 según los valores de Ct se muestran en la figura 13. Las sensibilidades de las muestras de saliva fueron más altas con valores de Ct más bajos, así, para valores de Ct ≤ 25 , las medianas (IC 95%) fueron del 100% (85,9-100), 93,3% (66-99,7) y 93,3% (66-99,7) para las muestras de saliva recogidas mediante RS, LOF y AR, respectivamente, y disminuyeron mínimamente a 97,4% (84,9-99,9), 81% (57,4-93,7) y 91,3% (70,5-98,5), respectivamente, para valores de Ct ≤ 30 . La figura 14 muestra la sensibilidad por tipo de muestra según los valores de Ct y la presencia de síntomas.

Para los mismos valores de Ct no hubo diferencias significativas en la sensibilidad de las distintas muestras entre pacientes con y sin síntomas activos. El mayor rendimiento de la RT-PCR se observó para muestras nasofaríngeas, seguido de cerca por la saliva RS, con sensibilidades (IC 95%) de 98,4% (90,2-99,9) y 100% (85,9-100), respectivamente, en pacientes

Resultados

sintomáticos, y 95,2% (74,1-99,8) y 88,9% (50,7-99,4), respectivamente, en individuos asintomáticos con valores de Ct ≤ 30 .

FIGURA 13. Sensibilidades de las diferentes muestras para la detección del SARS-CoV-2 según el valor Ct en muestras nasofaríngeas. En los casos con muestra nasofaríngea negativa y saliva positiva, se tomó el valor Ct de la muestra de saliva.

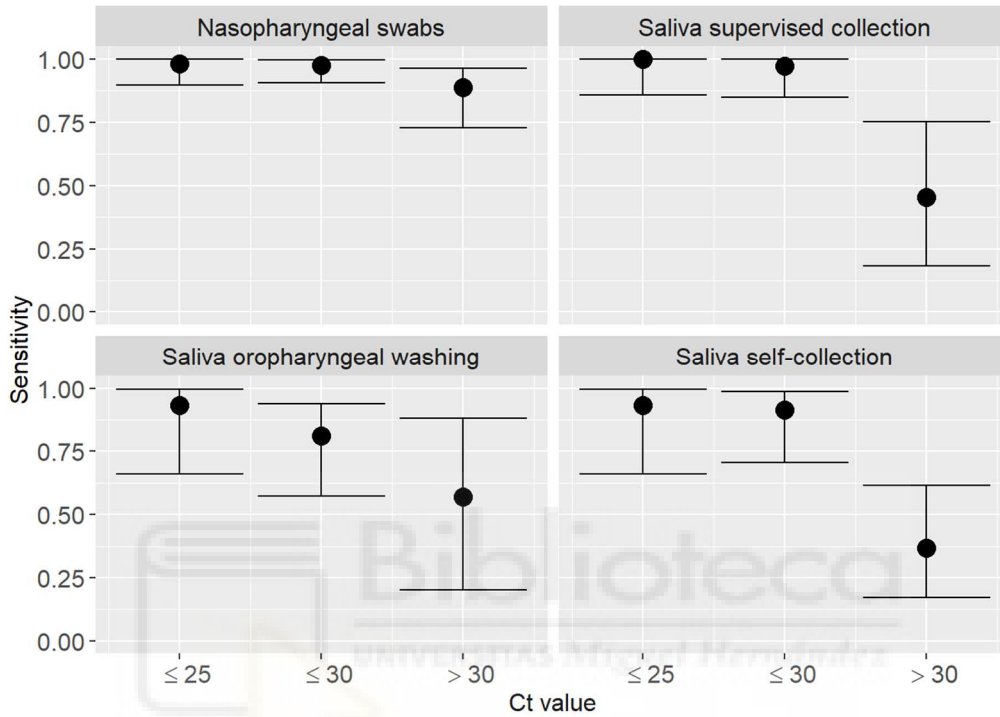
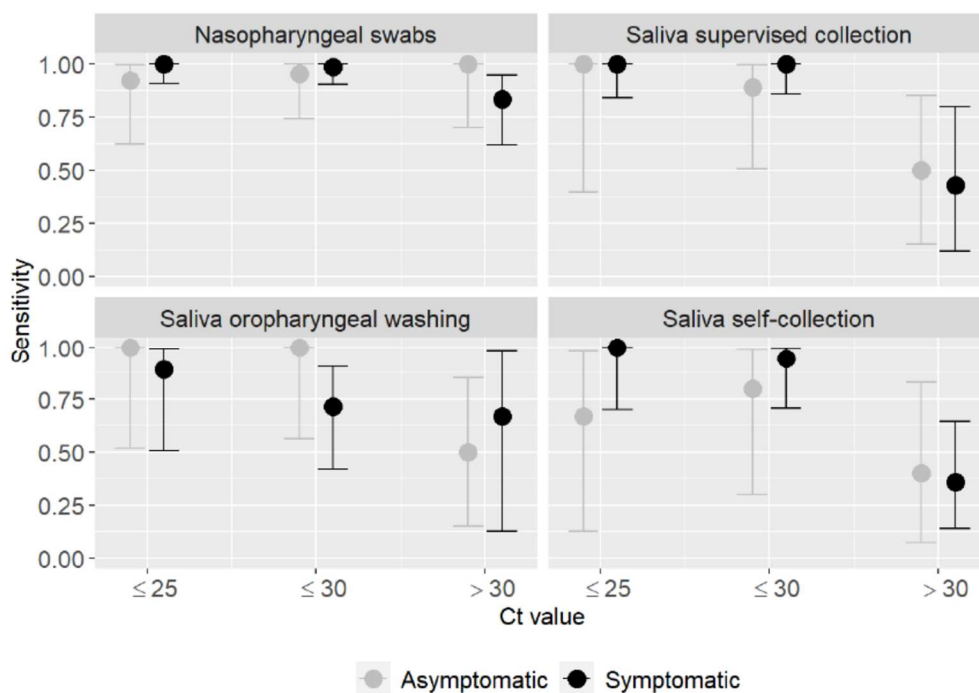


Figura 14. Sensibilidad de las diferentes muestras para detección de SARS-CoV-2 según los valores de Ct y la presencia de síntomas.



6.3. EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA PRUEBA RÁPIDA DE ANTÍGENOS

Para la evaluación del rendimiento de la prueba de antígenos se incluyeron todos los pacientes con una segunda muestra de exudado nasofaríngeo (n=904), con una muestra nasal (n=659) o con muestra de saliva (n=611) (figura 9).

6.3.1. Rendimiento de la prueba de antígeno por tipo de muestra y lugar de atención al paciente.

El ARN del SARS-CoV-2 se detectó en 196 (21,5%) muestras mediante RT-PCR, y el test de antígeno resultó positivo en 120 (13,1%) muestras. El rendimiento de la prueba de antígeno según el tipo de muestra se muestra en la figura 15 y tabla 5. Para el hisopo nasofaríngeo el PPA y NPA generales de la prueba de antígeno fueron 60,5% (IC 95%, 53,3-67,4) y 100% (IC 95%, 99,3-100), respectivamente. Para la saliva, el PPA fue del 23,1% (IC 95%, 16,2-31,9), y en las muestras nasales el PPA fue del 44,7% (IC 95%, 36,1-53,6).

Basándonos en el lugar de atención al paciente la PPA para el hisopo nasofaríngeo en Urgencias fue del 69% (IC 95%, 55,3-80,1) y en Atención Primaria, la PPA fue del 56,9% (IC 95%, 48,2-65,3) (tabla 5).

6.3.2. Rendimiento de la prueba de antígeno en muestras nasofaríngeas según el valor de Ct en la RT-PCR, la edad y el sexo.

El rendimiento de la prueba de antígeno según el Ct en muestra nasofaríngea se muestra en la figura 16A. En el análisis, que incluyó a todos los pacientes, se observó una disminución gradual de la sensibilidad al aumentar los valores de Ct, con una disminución más prominente con valores de Ct >28. El PPA fue del 94% (IC 95%, 85-98) para Ct ≤25 y del 80% (IC 95%, 67-85) para Ct <30.

La tabla 6 y la figura 16B muestran el rendimiento de la prueba de antígeno según el grupo de edad. La PPA aumentó con la edad, con menor sensibilidad entre niños y adultos jóvenes (PPA 38,1% [IC 95%, 24-54,3] entre 15-30 años), y mayor sensibilidad en pacientes mayores (PPA 72,4% [IC 95%, 52,5-86,6] para ≥65 años).

En cuanto al sexo, no se encontraron diferencias notables en el rendimiento de la prueba de antígeno. El PPA en los hombres fue del 63,4% (IC 95%, 53,1-72,6) y en las mujeres fue del 57,4% (IC 95%, 46,8-67,5) (tabla 3).

6.3.3. Rendimiento de la prueba de antígeno en muestras nasofaríngeas en pacientes sintomáticos.

Un total de 617 (67,6%) pacientes presentaron síntomas clínicos. La mediana de edad (Q1-Q3) fue de 41 (24-56) años y 289 (46,8%) eran hombres (tabla 1). Analizando las muestras nasofaríngeas, en 156 (25,3%) pacientes la RT-PCR fue positiva y en 105 (17,2%) la prueba de antígeno fue positiva. El PPA (IC 95%) en las muestras nasofaríngeas fue del 67,3% (59,3–74,5). El PPA según el tipo de muestra en pacientes sintomáticos se muestra en la figura 15.

El rendimiento de la prueba de antígeno en muestra nasofaríngea según el Ct se muestra en la figura 16A y en la tabla 6. Al aumentar el valor del Ct la sensibilidad disminuyó más lentamente en pacientes sintomáticos, pero de nuevo se observó una disminución más rápida a partir de valores de $Ct > 28$. El PPA fue del 95% (IC 95%, 87-98) para $Ct \leq 25$ y del 85% (77-91) para $Ct < 30$. Además, el rendimiento de la prueba de antígeno aumentó con la edad, con un PPA del 79,3% (IC 95%, 66,3–88,4) en pacientes sintomáticos > 50 años.

La figura 16B muestra el rendimiento de la prueba de antígeno en muestra nasofaríngea según el número de días con síntomas. El PPA fue de aproximadamente el 80% para un período inferior a 7 días desde el inicio de los síntomas y disminuyó durante los días siguientes. Según las características de los síntomas, la mayor sensibilidad se observó para malestar general y ageusia, con un PPA del 75% cada una, seguida de dolor de garganta, con PPA del 73%, y tos, congestión nasal y disnea, las 3 con PPA del 69%. El PPA para la tríada de tos, fiebre y malestar general fue del 89%.

La figura 17 muestra el rendimiento de la prueba de antígeno de acuerdo con la presencia de síntomas, edad, Ct y días tras el inicio de los síntomas. El PPA más alto de la prueba se observó para $Ct < 25$, que fue mayor de 90% para mayores de 15 años, 100% para mayores de 50 años y 95% para una duración de los síntomas < 7 días.

Se realizó una regresión logística multivariante para explorar los factores independientes asociados con el rendimiento de la prueba de antígeno entre pacientes sintomáticos,

incluyendo la edad, el sexo, los valores de Ct y la duración de los síntomas categorizados en <7 o ≥ 7 días. El modelo mostró que el PPA se asoció de forma independiente con la edad, con una razón de probabilidades (OR) de 1,20 (IC 95%, 1,03-1,40) para cada período de 5 años de edad, con la duración de los síntomas, con una OR de 3,99 (1,22–13,06) para <7 días, e inversamente con el Ct, con una OR de 0,66 (IC 95%, 0,57-0,76).

6.3.4. Rendimiento de la prueba de antígeno en muestras nasofaríngeas en pacientes asintomáticos.

Un total de 296 pacientes eran asintomáticos, con una mediana de edad (Q1-Q3) de 40 (20-53) años, y 134 (45,3%) eran hombres. El PPA según el tipo de muestra en pacientes asintomáticos se muestra en figura 15. Un total de 39 (13,2%) pacientes tuvieron una RT-PCR positiva y 13 (4,4%) una prueba de antígeno positiva en muestra nasofaríngea. El PPA en esta muestra fue del 33,3% (IC 95%, 19,6-50,3) y el coeficiente kappa de Cohen fue de 0,46 (IC 95%, 0,30-0,63).

Las figuras 16 A, 17 A y la tabla 6 muestran el rendimiento de la prueba de antígeno en pacientes asintomáticos según el valor de Ct y la edad. De nuevo se observó una disminución en la sensibilidad con el aumento de Ct, pero fue mucho más pronunciada que en los pacientes sintomáticos, principalmente para valores de Ct > 20 (figura 16A). Sin embargo, para valores bajos de Ct, la sensibilidad fue elevada para todos los grupos de edad, con un PPA general del 86% (IC 95%, 56-97) para Ct ≤ 25 .

Figura 15. Rendimiento de la prueba rápida de detección de antígeno Panbio COVID-19 según el tipo de muestra.

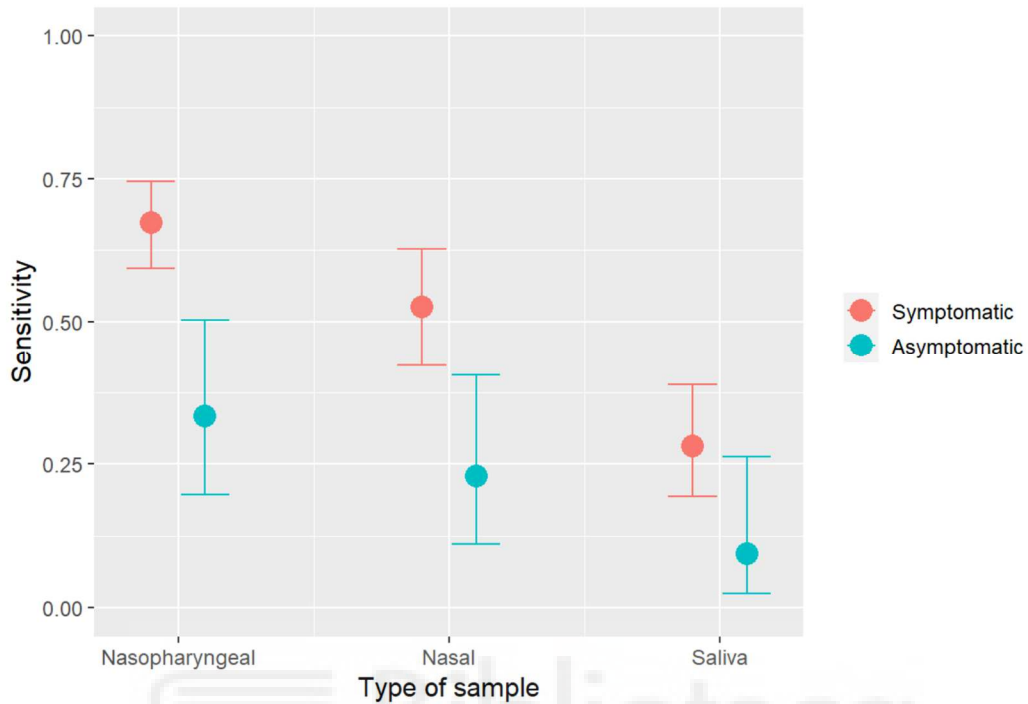


Tabla 5. Rendimiento de la prueba rápida de antígeno Panbio COVID-19 por tipo de muestra y lugar de atención al paciente.

Variable	VP	FP	VN	FN	PPA (IC del 95%)	NPA (IC del 95%)	OPA (IC del 95%)	Kappa (IC del 95%)
Tipo de muestra								
Muestra NF	118	0	709	77	60,5% (53,3–67,4)	100% (99,3–100)	91,5% (89,4–93,2)	0,71 (0,65–0,77)
Muestra nasal	59	0	527	73	44,7% (36,1–53,6)	100% (99,1–100)	88,9% (86,2–91,2)	0,56 (0,48–0,65)
Muestra de saliva	28	0	490	93	23,1% (16,2–31,9)	100% (99–100)	84,8% (81,6–87,6)	0,33 (0,23–0,42)
Sitio de atención								
Atención primaria	78	0	544	59	56,9% (48,2–65,3)	100% (99,1–100)	91,3% (88,9–93,3)	0,68 (0,60–0,75)
Servicio de Urgencias	40	0	165	18	69% (55,3–80,1)	100% (97,2–100)	91,9% (87,3–95)	0,77 (0,67–0,87)

Abreviaturas: IC, intervalo de confianza; COVID-19, enfermedad por coronavirus 2019; FN, falso negativo; FP, falso positivo; NF, nasofaríngeo; NPA, porcentaje de concordancia negativa; OPA porcentaje de concordancia general; PPA, porcentaje de concordancia positiva; VN, verdadero negativo; VP, verdadero positivo.

NOTA: A menos que se especifique, todos los análisis se han realizado en muestras NF.

Tabla 6. Rendimiento de la prueba rápida de detección de antígenos Panbio COVID-19 en muestras nasofaríngeas según diferentes factores.

Variable	VP	FP	VN	FN	PPA (IC 95%)	NPA (IC 95%)	OPA (IC 95%)	Kappa (IC 95%)
Sexo								
Hombre	64	0	317	37	63,4% (53,1–72,6)	100% (98,5–100)	91,1% (87,9–93,6)	0,72 (0,64–0,81)
Mujer	54	0	392	40	57,4% (46,8–67,5)	100% (98,8–100)	91,8% (88,9–94)	0,69 (0,60–0,77)
Edad								
≤14 años	10	0	107	8	55,6% (31,3–77,6)	100% (95,7–100)	93,6% (87,4–97)	0,68 (0,48–0,88)
15–30 años	16	0	145	26	38,1% (24–54,3)	100% (96,8–100)	86,1% (80,1–90,6)	0,49 (0,33–0,65)
31–50 años	42	0	244	27	60,9% (48,4–72,2)	100% (98,1–100)	91,4% (87,6–94,1)	0,71 (0,61–0,81)
51–65 años	29	0	111	8	78,4% (61,3–89,6)	100% (95,8–100)	94,6% (89,3–97,5)	0,85 (0,74–0,95)
>65 años	21	0	102	8	72,4% (52,5–86,6)	100% (95,5–100)	93,9% (87,9–97,1)	0,80 (0,67–0,93)
Individuos sintomáticos								
General	105	0	456	51	67,3% (59,3–74,5)	100% (99–100)	91,7% (89,1–93,7)	0,75 (0,69–0,82)
≤3 DIS	49	0	273	13	79% (66,5–87,9)	100% (98,3–100)	96,1% (93,3–97,8)	0,86 (0,79–0,93)
≤4 DIS	65	0	334	18	78,3% (67,6–86,3)	100% (98,6–100)	95,7% (93,1–97,3)	0,85 (0,79–0,92)
≤5 DIS	76	0	364	22	77,6% (67,8–85,1)	100% (98,7–100)	95,2% (92,8–96,9)	0,85 (0,78–0,91)
≤6 DIS	81	0	382	23	77,9% (68,5–85,2)	100% (98,8–100)	95,3% (92,9–96,9)	0,85 (0,79–0,91)
≥7 DIS	24	0	74	28	46,2% (32,5–60,4)	100% (93,9–100)	77,8% (69,3–84,5)	0,50 (0,36–0,64)
Ct ≤25	87	0	0	5	95% (87–98)			
Ct ≤30	102	0	0	18	85% (77–91)			
Ct ≤35	105	0	0	45	70% (62–77)			
Individuos asintomáticos								
General	13	0	253	26	33,3% (19,6–50,3)	100% (98,1–100)	91,1% (87,1–94)	0,46 (0,30–0,63)
Ct ≤25	12	0	0	2	86% (56–97)			
Ct ≤30	13	0	0	13	50% (32–68)			
Ct ≤35	13	0	0	23	36% (21–54)			

Abreviaturas: IC, intervalo de confianza; COVID-19, enfermedad por coronavirus 2019; Ct, umbral de ciclo de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa; DIS, días desde el inicio de los síntomas; FN, falso negativo; FP, falso positivo; PPA, porcentaje de concordancia positivo; NPA, porcentaje de concordancia negativo; OPA, porcentaje de concordancia general; VN, verdadero negativo; VP, verdadero positivo. NOTA: A menos que se especifique, todos los análisis se han realizado en muestras NF.

Resultados

Figura 16. Rendimiento de la prueba rápida de detección de antígenos Panbio COVID-19 en muestras nasofaríngeas en diferentes escenarios. (A) Rendimiento según valores de umbral de ciclo (Ct). (B) Rendimiento según edad.

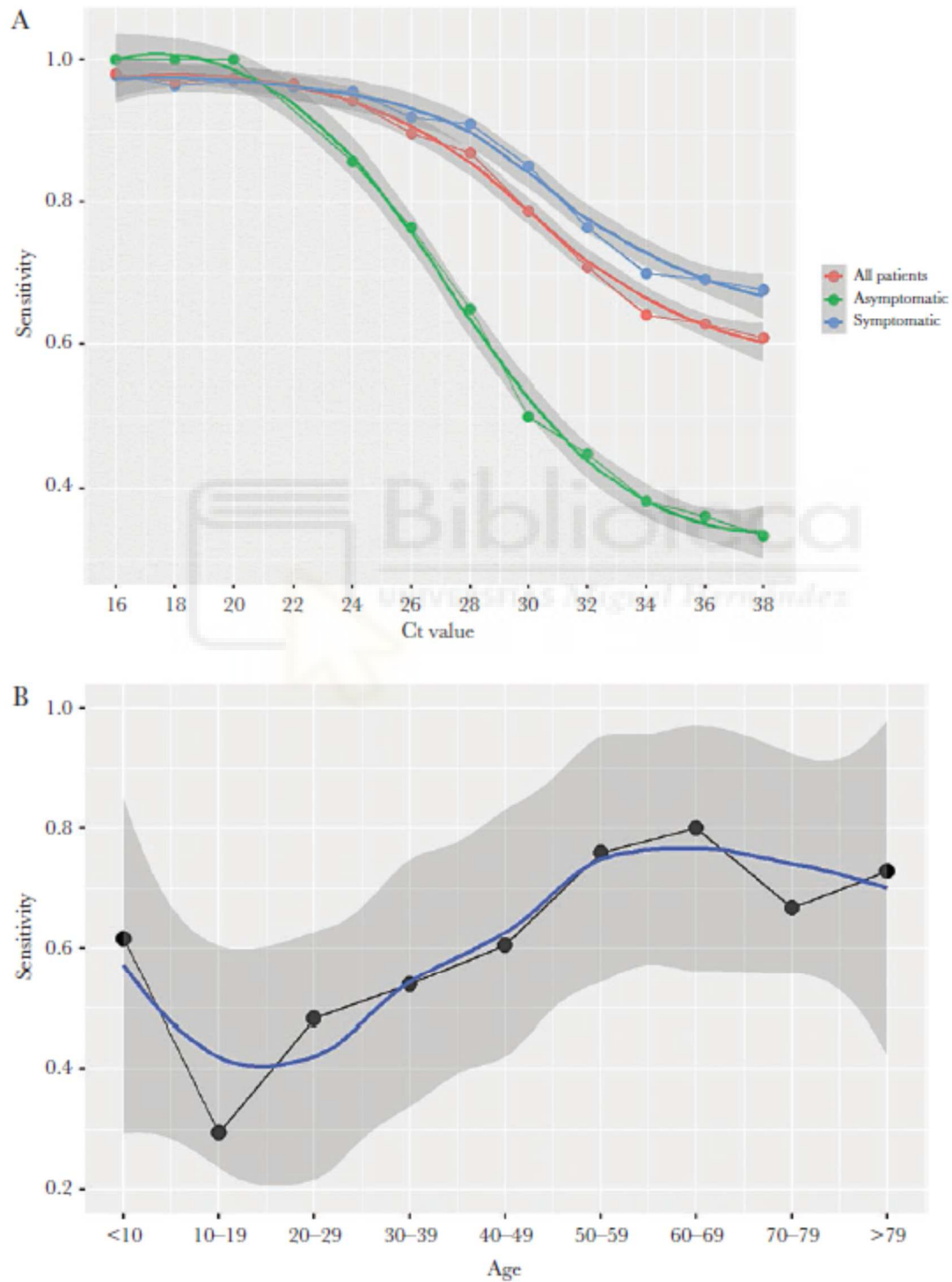
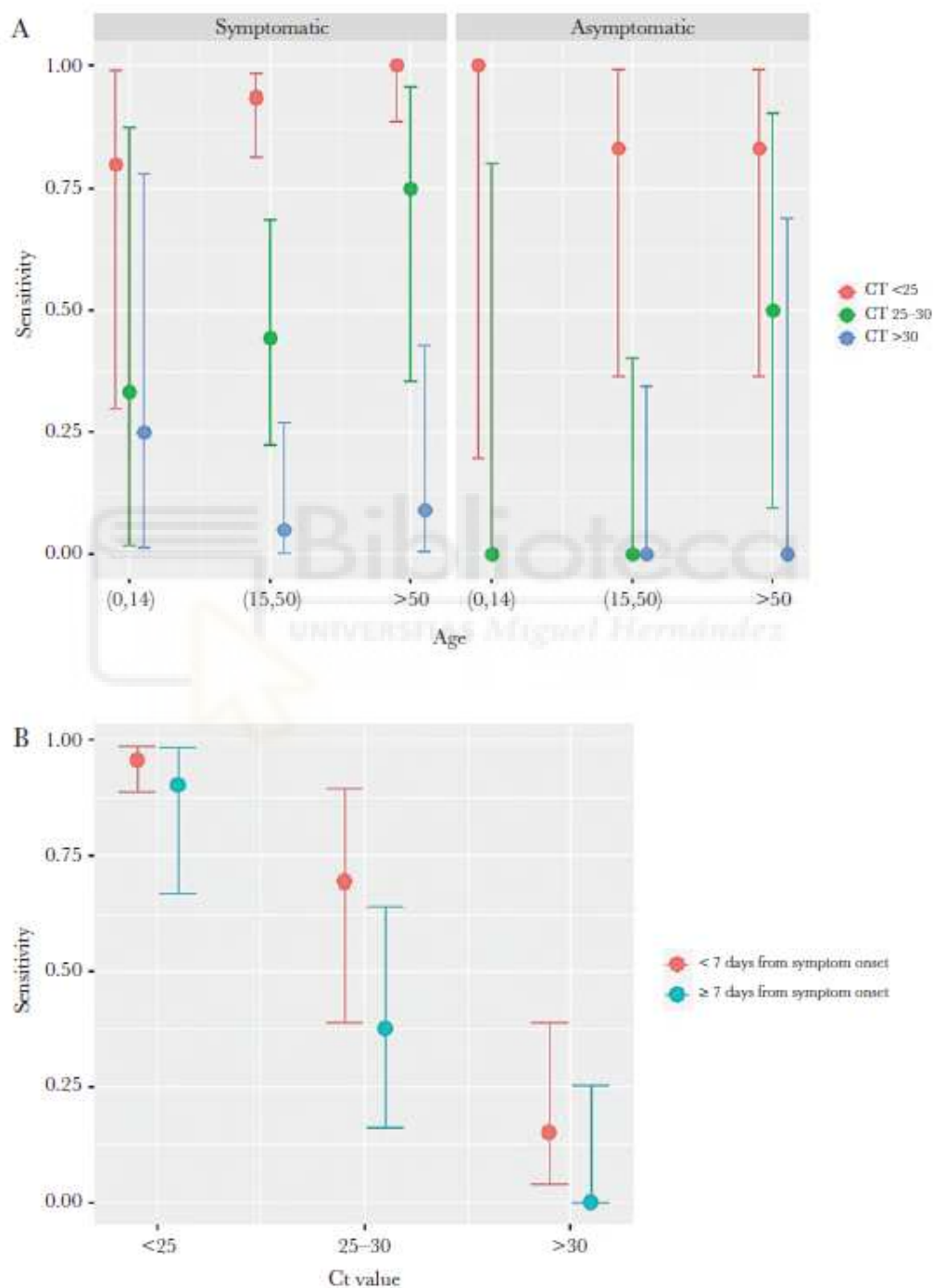


Figura 17. Rendimiento de la prueba rápida de detección de antígenos Panbio COVID-19 en muestras nasofaríngeas después de la estratificación por diferentes factores. (A) Rendimiento estratificado por la presencia de síntomas, edad y valores de umbral de ciclo (Ct). (B) Rendimiento estratificado por duración de los síntomas y edad.



6.3.5. Rendimiento de la prueba de antígeno en muestra nasal, saliva y muestra nasal + saliva.

Para evaluar el rendimiento de la prueba de antígeno en muestra nasal y saliva, incluimos en el análisis a 659 pacientes con muestras nasales, de los cuales 610 (92,6%) tenían también muestra de saliva. De ellos, 265 (40,2%) pacientes estaban asintomáticos y 394 (59,8%) tenían síntomas, con una mediana de duración (Q1-Q3) de 3 (2-5) días. La mediana de edad (Q1-Q3) fue de 38 (21-50) años, 76 (11,5%) tenían ≤ 14 años, 45 (7,6%) > 65 años, 372 (56,4%) eran mujeres y 157 (23,8%) tenían alguna comorbilidad. La hipertensión fue la más frecuente estando presente en 46 (7%), dislipidemia en 39 (5,9%), obesidad en 29 (3,2%) y diabetes en 21 (4,4%) pacientes. La RT-PCR fue positiva para muestra nasofaríngea en 132 (20%) pacientes, con una mediana (Q1-Q3) del valor de Ct de 24 (17,6–31).

La tabla 7 muestra el rendimiento de la prueba de antígeno en muestra nasal, saliva y muestra nasal + saliva. La prueba fue positiva en 76 (11,7%), 59 (9%), 28 (4,6%) y 60 (9,1%) muestras nasofaríngeas, nasales, saliva y cualquiera de las muestras nasales o de saliva, respectivamente. La mediana (Q1-Q3) del valor Ct en hisopo nasofaríngeo en muestras nasales con antígeno positivo fue 17 (14-21,5) y con antígeno negativo 29,5 (25,6-33); y 17,9 (15,8–19,3) y 28 (19,6–32) en muestras de saliva con antígeno positivo y negativo, respectivamente. El PPA (IC 95%) fue de 57,3% (48,3-65,8) en muestras nasofaríngeas, 44,7% (36,1-53,6) en muestras nasales, 23,1% (16,2-31,9) en saliva y 49,6% (40,4-58,8) en nasal+saliva. En todos los casos, el NPA fue del 100%.

Se observó que el rendimiento de la prueba dependía de los valores de Ct y la presencia de síntomas (figura 18 A-C). Para pacientes sintomáticos con $Ct < 25$, el PPA (IC 95%) fue de 78% (65-88) en muestras nasales, 41% (28-56) en saliva y 85% (72-93) en muestra nasal+saliva. La prueba de antígeno funcionó mejor cuando el periodo con síntomas era < 7 días (Figura 18 D), y el mejor rendimiento se observó para muestra nasal+saliva en pacientes sintomáticos con < 7 días de síntomas y $Ct \leq 25$, con un PPA (IC 95%) del 92% (78-98) y 85,1% (71,1-93,3) para $Ct \leq 30$. Para la muestra nasal, el PPA fue del 87,8% (72,9-95,4) y del 79,6% (65,2-89,3) para $Ct \leq 25$ y $Ct \leq 30$, respectivamente, y < 7 días con síntomas. La mayor sensibilidad en muestras nasales+saliva se asoció con dolor de garganta, (PPA (IC 95%) del 69% (49-84)) y ageusia (PPA del 66% (12,5-98,2)).

Tabla 7. Rendimiento del test rápido de antígeno Panbio Covid-19 en distintas muestras.

	VP	FP	VN	FN	PPA (IC 95%)	NPA (IC 95%)
Muestra NF	76	1	519	56	57,3% (48,3-65,8)	99,8% (98,8-100)
Muestra nasal	59	0	527	73	44,7% (36,1-53,6)	100% (99,1-100)
Saliva	28	0	489	93	23,1% (16,2-31,9)	100% (99-100)
Nasal + Saliva	60	0	489	61	49,6% (40,4-58,8)	100% (99-100)
Muestra nasal						
Sintomáticos	51	0	297	46	52,6% (42,2-62,7)	100% (98,4-100)
Ct≤25	43	0	0	12	78% (65-88)	
Ct≤30	48	0	0	25	66% (54-76)	
Ct≤35	51	0	0	43	54% (44-64)	
Asintomáticos	8	0	230	27	22,9% (11-40,6)	100% (98-100)
Ct≤25	8	0	0	5	62% (32-85)	
Ct≤30	8	0	0	15	35% (17-57)	
Ct≤35	8	0	0	24	25% (0-69)	
Muestra de saliva						
Sintomáticos	25	0	277	64	28,1% (19,3-38,8)	100% (98,3-100)
Ct≤25	21	0	0	30	41% (28-56)	
Ct≤30	25	0	0	42	37% (26-50)	
Ct≤35	25	0	0	61	29% (20-40)	
Asintomáticos	3	0	212	29	9,4% (2,5-2,6)	100% (97,8-100)
Ct≤25	3	0	0	9	25% (7-57)	
Ct≤30	3	0	0	17	15% (4-39)	
Ct≤35	3	0	0	26	10% (3-28)	
Nasal + Saliva						
Sintomáticos	55	0	277	37	58,4% (47,5-68,6)	100% (98,3-100)
Ct≤25	45	0	0	8	85% (72-93)	
Ct≤30	52	0	0	18	74% (62-84)	
Ct≤35	55	0	0	34	62% (51-72)	
Asintomáticos	9	0	212	24	27,3% (13,9-45,8)	100% (97,8-100)
Ct≤25	9	0	0	4	69% (39-90)	
Ct≤30	9	0	0	12	43% (23-66)	
Ct≤35	9	0	0	21	30% (0-69)	

A menos que se especifique, todos los análisis se han realizado en muestras nasofaríngeas. VP, verdadero positivo; FN, falso negativo; VN, verdadero negativo; FN, falso negativo; PPA, porcentaje de concordancia positiva; NPA, porcentaje de concordancia negativa; NF, nasofaríngea; Ct, umbral de ciclo de RT-PCR.

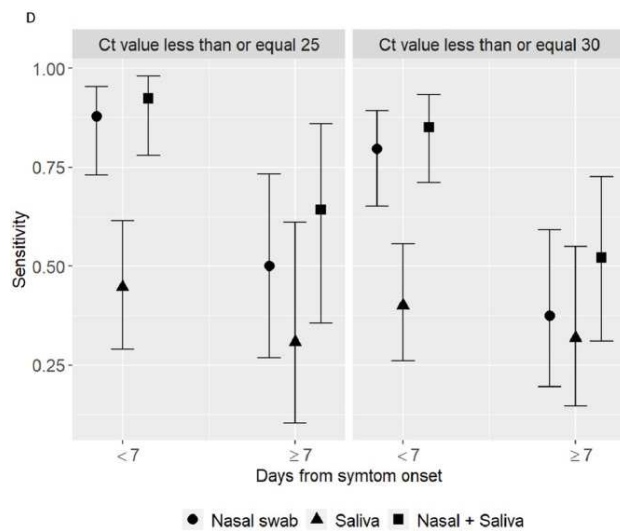
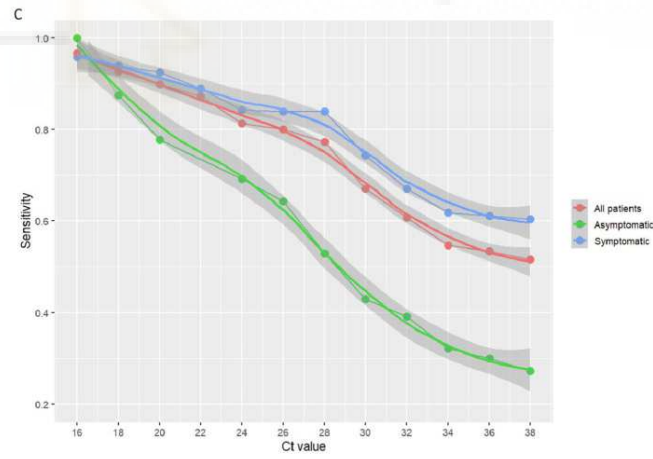
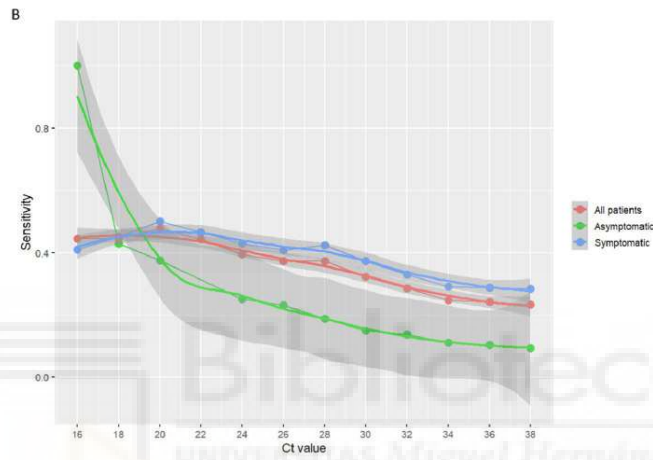
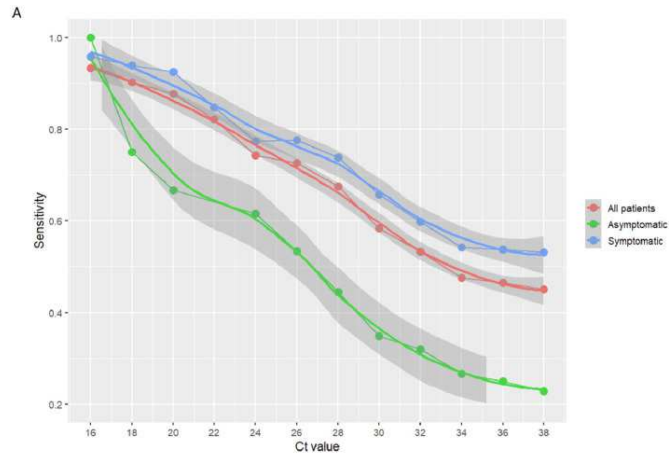
Figura 18. Rendimiento de la prueba rápida de antígeno Panbio COVID-19 en muestras nasal, saliva y muestra nasal + saliva según la presencia de síntomas y valores de Ct.

A: Rendimiento en muestras nasales.

B: Rendimiento en muestras de saliva.

C: Rendimiento en muestras nasales + saliva.

D: Rendimiento en pacientes sintomáticos según valores de Ct y días desde el inicio de los síntomas.





Biblioteca
UNIVERSITAS MIGNET

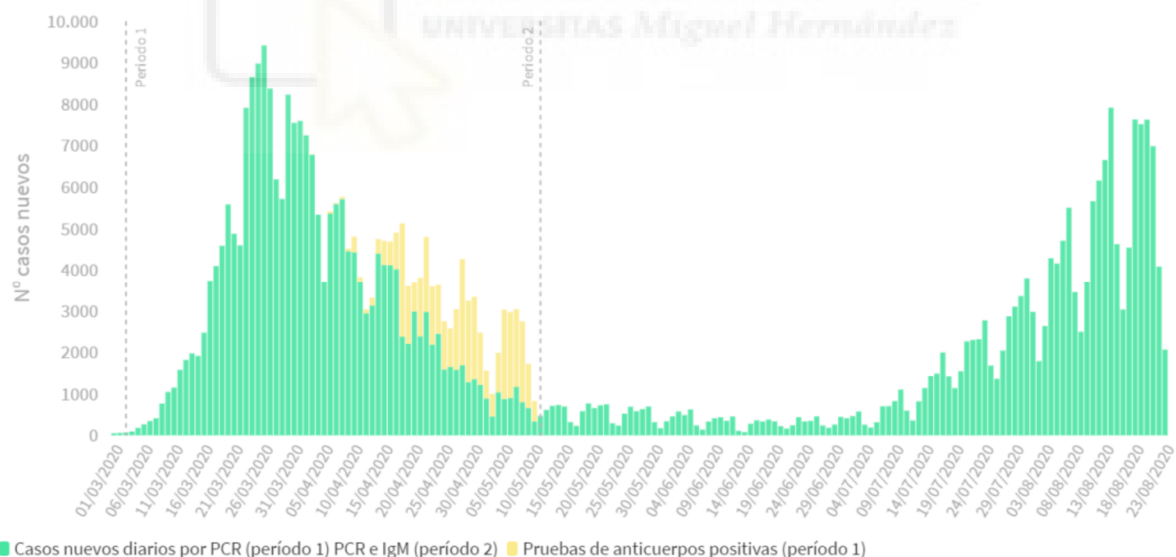
7. DISCUSIÓN



7. DISCUSIÓN

La pandemia de Covid-19, declarada en marzo de 2020, ha supuesto una crisis sanitaria sin precedentes en la historia reciente. En el ámbito de la investigación se ha realizado un extraordinario esfuerzo para intentar reducir el impacto de la pandemia en la sociedad, pero la gran expansión del SARS-CoV-2 a nivel mundial y su rápida evolución ha hecho que el conocimiento sobre el virus y su enfermedad esté en constante cambio. Por ello, es fundamental situar el momento en el que se plantea nuestra investigación, agosto de 2020, cuando tras los primeros meses de la pandemia era urgente encontrar nuevas estrategias de optimización de recursos para poder afrontar mejor posibles rebrotes de la enfermedad y evitar el colapso sanitario. Según el Ministerio de Sanidad, a fecha 20 de agosto de 2020 se registran 7039 nuevos positivos y 16 muertes, el peor dato tras el fin del Estado de Alarma en España, con un total de 377906 casos diagnosticados acumulados y 28813 muertes confirmadas.

Figura 19. Casos nuevos diarios de Covid-19 en España a 23 de agosto de 2020 [38]



En el informe de la OMS del 11 de septiembre de 2020 sobre pruebas diagnósticas para el SARS-CoV-2, no se recomendaba el uso de saliva o muestras similares como único tipo de muestra para el diagnóstico clínico de rutina e instaba a los laboratorios a recopilar sus propios datos de rendimiento en relación con el método de recogida de muestras y en la población pertinente, llevando a cabo el procedimiento de validación.

En septiembre 2020, el Ministerio de Sanidad incorporó los test rápidos de antígenos dentro de la estrategia de detección precoz, vigilancia y control de la COVID-19. La información sobre su rendimiento en el lugar de atención era limitada, especialmente para los nuevos test de 2ª generación.

Los resultados de nuestro estudio, cuyo diseño nos permitió llevar a cabo el reclutamiento de pacientes, la toma de muestras y la realización de las distintas técnicas en un período breve de tiempo entre septiembre y octubre de 2020, nos permitieron confirmar que la saliva es una muestra aceptable para la detección molecular del SARS-CoV-2 en el entorno comunitario y que puede identificar de manera efectiva a las personas con mayor riesgo de transmisión en condiciones de la vida real. Este estudio reveló que el método de recolección puede ser fundamental para mejorar la sensibilidad, y las muestras de saliva obtenidas bajo supervisión superan a las muestras recogidas por los propios pacientes y muestran una mayor sensibilidad en pacientes sintomáticos y asintomáticos.

Como era de esperar, comprobamos que la sensibilidad de las muestras de saliva aumentó con valores bajos de Ct. De hecho, las muestras recogidas bajo supervisión funcionaron casi tan bien como las muestras nasofaríngeas, con sensibilidades muy por encima del 90% para los pacientes con valores bajos de Ct, considerados como el grupo con el mayor potencial para propagar el virus [39,40]. Para valores de Ct ≤ 25 , las sensibilidades de las distintas muestras de saliva, RS, LOF y AR alcanzaron el 100%, 93% y 93%, respectivamente, y para los pacientes con valores de Ct ≤ 30 , fueron 97%, 81% y 91%, respectivamente. Entre los individuos que resultaron positivos solamente para muestra nasofaríngea, encontramos solo un caso de saliva recolectada bajo supervisión con un valor de Ct ≤ 30 que no fue detectada. Por lo tanto, el uso de saliva en general, especialmente cuando se obtiene bajo supervisión, permitió la detección de SARS-CoV-2 en la gran mayoría de los pacientes con riesgo significativo de transmisión.

A diferencia de la mayoría de estudios anteriores, centrados en gran medida en pacientes hospitalizados, en esta investigación incluimos pacientes ambulatorios con un amplio espectro clínico de la enfermedad, incluidos niños y casos asintomáticos. Como Williams et al. [41], evaluamos muestras de saliva casual sin ayuno previo o técnicas de mejora, como olfatear o toser fuerte, utilizadas en otros estudios [14]. Investigaciones previas que comparaban diferentes muestras para la detección molecular de SARS-CoV-2 en el entorno comunitario informaron tasas de sensibilidad más bajas con muestras de saliva que con exudado

nasofaríngeo (del 30% al 85%) [12-14]. Esto se ha atribuido a los síntomas más leves y menor carga viral en pacientes ambulatorios que en los casos más graves [41,43], y a diferencias en la dinámica temporal de la diseminación viral entre las localizaciones respiratorias superiores y la saliva [22,44], con menor carga viral en esta última [12].

No encontramos diferencias destacadas entre muestras de individuos con y sin síntomas activos, pero, de acuerdo con otros estudios [8,45,46], detectamos mayores valores de Ct que indican menor carga viral en las muestras de saliva que en el correspondiente exudado nasofaríngeo, lo que sugiere diferencias en la diseminación viral entre compartimentos. Además, las diferencias significativas observadas en nuestro estudio según el método de recogida de saliva sugieren que las diferencias en el método de recolección pueden haber contribuido a las disparidades en la sensibilidad observadas en investigaciones anteriores.

Evaluamos también una prueba de antígeno de última generación en el punto de atención para el SARS-CoV-2 en condiciones de la vida real, en distintas muestras, exudado nasofaríngeo, exudado nasal y saliva. En primer lugar, comparamos el rendimiento de la prueba de antígeno en muestra nasofaríngea con la RT-PCR en la misma muestra. Nuestros datos mostraron que la sensibilidad de la prueba dependía en gran medida de los valores de Ct, la edad y la presencia y duración de los síntomas, siendo máxima en pacientes sintomáticos mayores de 50 años y con valores de Ct asociados a mayor riesgo de infectividad, alcanzando el 100% en este escenario.

Aunque el rendimiento fue menor en pacientes asintomáticos, de nuevo el antígeno en muestra nasofaríngea identificó con una sensibilidad superior al 85% a aquellos con menor Ct, y por tanto con mayor riesgo de contagio. En todos los casos, la especificidad fue del 100%. Conocer el rendimiento de la prueba de antígeno en este caso es clave para las estrategias de prevención de la transmisión a nivel comunitario, ya que la mayoría de infecciones por SARS-CoV-2 son asintomáticas.

La infección por SARS-CoV-2 se asocia con elevada diseminación viral en el tracto respiratorio superior en etapas iniciales de la infección, lo que facilita la detección del virus durante el período más infeccioso. La disponibilidad de una prueba rápida para el diagnóstico en el punto de atención permite a los evaluadores adoptar decisiones inmediatas en tiempo real, lo que supone una clara ventaja sobre la RT-PCR para controlar la propagación de la infección.

Aunque en nuestro estudio en exudado nasofaríngeo la prueba de antígeno mostró una sensibilidad general más baja que la RT-PCR y la informada por el fabricante, la prueba fue muy precisa en pacientes sintomáticos con valores bajos de Ct, con una sensibilidad superior al 95% para Ct ≤ 25 , y al menos 85% para Ct < 30 . Estos resultados muestran una sensibilidad algo menor que la descrita con BinaxNOW COVID-19 Ag CARD con el 100% de las muestras con cargas virales equivalentes a Ct de 29-30 detectadas por la prueba rápida de antígenos [47]. La carga viral elevada se ha asociado con la gravedad y mortalidad de la enfermedad [48,49], y varios estudios apoyan una correlación de los valores de Ct con la infectividad, definida por el crecimiento en cultivo celular. Aunque los puntos de corte fluctúan entre los diferentes estudios [30,50-52], un valor de Ct ≥ 33 se asoció con ausencia de aislamiento de SARS-CoV-2 en cultivos celulares, y con ausencia de replicación viral activa [30,40]. Otros estudios han encontrado ausencia de recuperación de SARS-CoV-2 en cultivos celulares con valores de Ct $> 29,5$ [41], o incluso superiores a 24, con una disminución del 32% de cultivos positivos por cada aumento en una unidad de Ct [42]. El riesgo de infectividad se ha asociado también con la duración de los síntomas, sin que se haya observado crecimiento viral en muestras con valores de Ct $> 25-30$ [41,42] y más de 8 días de síntomas [53]. Aunque es necesario confirmar la correlación entre crecimiento viral e infectividad, nuestros datos sugieren que la prueba de antígeno en el punto de atención es útil para detectar a la mayoría de pacientes sintomáticos e identificar a aquellos con un riesgo de transmisión significativo. Otro factor que influyó en el rendimiento de la prueba de antígeno fue la duración de los síntomas. Según la especificación del fabricante y la información previa [22,54] encontramos una mayor sensibilidad en un período inferior a 7 días desde el inicio de los síntomas.

Debido a que la mayoría de las infecciones por SARS-CoV-2 son asintomáticas, es necesario establecer el rendimiento de la prueba de antígeno en este escenario, y esta información es clave para las estrategias destinadas a prevenir la propagación de la infección a nivel comunitario. A este respecto, nuestro estudio muestra que la sensibilidad fue menor en individuos asintomáticos, y de igual manera que ocurre en los individuos sintomáticos, la sensibilidad dependía en gran medida del valor de Ct, con un PPA superior al 85% para Ct ≤ 25 . Estudios previos han descrito transmisión asintomática del SARS-CoV-2 [55,56], pero en un meta-análisis se observó que la tasa de transmisión de pacientes asintomáticos o presintomáticos era menor en comparación con la de los pacientes sintomáticos [57] (0,3% –

0,6%) [58]. En pacientes presintomáticos, el crecimiento de SARS-CoV-2 en cultivo viral raramente se observó con un Ct >25 [45].

Por todo esto, a pesar de que el rendimiento de la prueba fue inferior en individuos asintomáticos, el aumento de sensibilidad observado con valores bajos de Ct, junto con el menor riesgo de transmisión descrito dentro de este grupo, podría convertir al test de antígeno en muestra nasofaríngea en una herramienta potencialmente útil para identificar a aquellos pacientes asintomáticos con riesgo infeccioso.

De forma similar a otros estudios [59], debido a que no hicimos seguimiento de los pacientes, no podemos distinguir la proporción de individuos asintomáticos que permanecieron asintomáticos todo el proceso de aquellos que fueron presintomáticos y desarrollaron síntomas posteriormente. Estos últimos pacientes pudieron ser detectados por la prueba en exámenes posteriores, aumentando así la sensibilidad de un ensayo que permite pruebas repetidas por su bajo coste y simplicidad.

Además de la carga viral, la sensibilidad de la prueba de antígeno depende en gran medida de la edad. Observamos que los pacientes de mayor edad mostraron el mejor rendimiento, un hallazgo no descrito previamente. Los niños más pequeños mostraron el peor rendimiento y hubo un aumento gradual en la sensibilidad de la prueba con la edad. Esto podría deberse a la menor cooperación de los niños durante la toma de muestra nasofaríngea. La temporalidad de los síntomas o los valores más altos de Ct entre los pacientes más jóvenes también podrían haber influido, sin embargo, nuestro estudio mostró que la edad se asoció con el rendimiento de la prueba independientemente del Ct y la duración de los síntomas, un hallazgo que merece una mayor investigación.

Ante la falta de estudios previos y concluyentes sobre la toma de muestra en ubicaciones alternativas a la nasofaringe para la realización de la prueba de antígeno que podrían ser más útiles para la vigilancia [60], exploramos el rendimiento de la prueba de antígeno en nariz o saliva, y encontramos que la sensibilidad general fue menor en muestra nasal y saliva que en exudado nasofaríngeo, particularmente en pacientes asintomáticos, aunque la especificidad fue del 100% en todas las muestras. De igual forma, dependía en gran medida de los valores de Ct y de la presencia y duración de los síntomas [24]. En muestras nasales, la sensibilidad en pacientes sintomáticos con Ct ≤ 30 y < 7 días de síntomas cumplió los requisitos mínimos para

ser una prueba adecuada para el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 [17], aunque el mayor rendimiento se observó con la combinación de muestra nasal + saliva. Así, aunque la saliva por sí sola no mostró un rendimiento satisfactorio, agregó sensibilidad a la muestra nasal para el diagnóstico de SARS-CoV-2.

Como hemos dicho, el riesgo de infectividad se ha asociado con los valores de Ct y la duración de los síntomas, por lo que el riesgo de contagio de pacientes sintomáticos no detectados por el test de antígeno en muestras nasales + saliva podría ser bajo. Además de poder auto-recolectarse, estas muestras permiten realizar la prueba sin el requisito de condiciones seguras de aislamiento, ampliando así los escenarios donde se puede realizar la prueba, incluso el mismo kit de diagnóstico podría utilizarse para analizar ambas muestras, mediante la inserción del hisopo nasal en la muestra de saliva. La baja sensibilidad en la saliva podría deberse a factores como el efecto de dilución del tampón de extracción, la menor diseminación viral en saliva, calidad inadecuada de la muestra recolectada, etc. Los mismos resultados fueron observados con los hisopos nasales, donde el rendimiento de la prueba no fue satisfactorio.

Nuestros resultados fueron muy novedosos en el momento de su publicación y a raíz de esta investigación ha habido implicaciones prácticas y transferencia en la práctica clínica del Hospital General Universitario de Elche. Por un lado, se ha llevado a cabo la implementación de la detección del SARS-CoV-2 mediante RT-PCR en saliva supervisada para el cribado de pacientes asintomáticos (pruebas PCR previas a intervenciones quirúrgicas, pruebas diagnósticas, etc.), que precisan atención en el hospital. Elaboramos unas instrucciones para una correcta toma de muestra de saliva que se encuentran disponibles en la página web del departamento de salud, con enlace a un video explicativo (anexo 2). Por otro lado, se ha establecido en Urgencias y en la consulta de Enfermedades Infecciosas la realización de la prueba rápida de antígeno en muestra nasofaríngea para el diagnóstico de SARS-CoV-2, particularmente en personas sintomáticas.

A lo largo de la pandemia y a medida que el SARS-CoV-2 ha infectado a millones de personas, su evolución natural ha dado lugar a la aparición de variantes. La OMS, junto a otras instituciones, ha vigilado y evaluado la evolución del virus desde enero de 2020, y es a finales de ese año cuando aparecen los primeros informes de variantes emergentes del SARS-CoV-2, clasificadas por la OMS como variantes preocupantes asociadas a una mayor transmisibilidad, gravedad de la enfermedad y/o reducción de la neutralización por anticuerpos generados

durante infecciones o vacunas previas. Concretamente, el 18 de diciembre de 2020 la OMS informó la aparición de la variante Alpha (conocida comúnmente como variante británica porque se detectó por primera vez en Reino Unido, o como linaje B.1.1.7) y la incluyó dentro de su lista de variantes preocupantes [61]. Los análisis retrospectivos determinaron que la primera muestra clínica de esta variante se había obtenido en el Reino Unido a finales de septiembre de 2020. En el momento en que se llevó a cabo el reclutamiento de pacientes en nuestro estudio y la toma de muestras, concretamente entre septiembre y octubre de 2020, predominaba la cepa original del SARS-CoV-2, ya que el primer caso de la variante alpha en España se informó el 14 de diciembre de 2020 y según el Ministerio de Sanidad, a fecha 20 de enero de 2021, se habían comunicado 157 casos confirmados de esta variante en España, y solo 6 en la Comunidad Valenciana. Por tanto, podemos afirmar que los resultados obtenidos en nuestra investigación sobre el rendimiento de las técnicas y muestras diagnósticas no estarían influenciados por la presencia de nuevas variantes con diferentes características epidemiológicas.

Actualmente nos encontramos con un escenario diferente, fruto del esfuerzo de toda la comunidad científica por avanzar en los conocimientos relacionados con el diagnóstico y la vigilancia microbiológica del SARS-CoV-2 a la vez que ha ido evolucionando la pandemia de Covid-19. Con cifras que superan los 10 millones de casos confirmados en España y casi 100000 fallecidos (figura 20) [62], se han realizado más de 83 millones de pruebas diagnósticas para SARS-CoV-2, tanto RT-PCR como pruebas de antígenos, según el Ministerio de Sanidad (figura 21).

Figura 20. Casos diarios confirmados de Covid-19 en España desde el 01 de diciembre de 2020 hasta el 16 de febrero de 2022

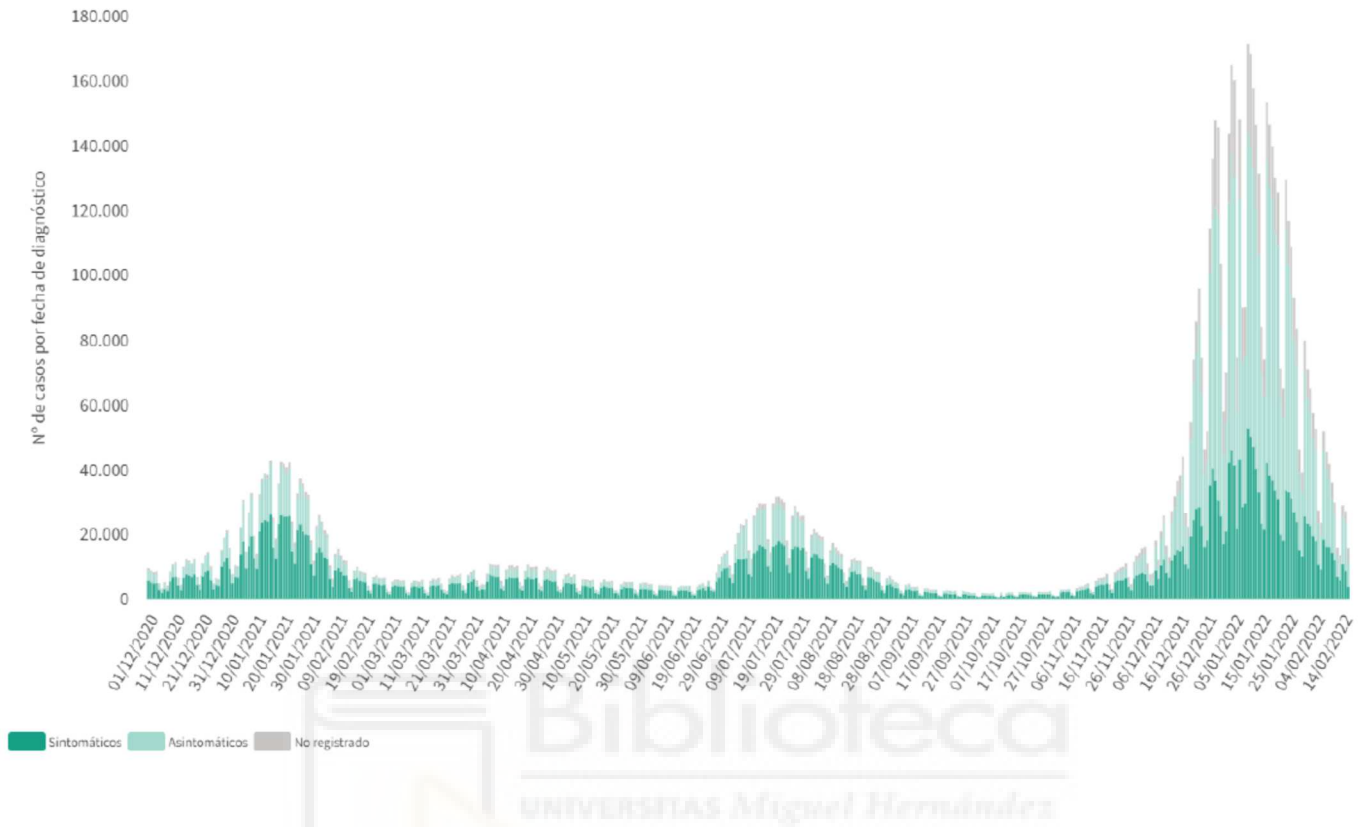


Figura 21. Pruebas diagnósticas Covid-19 realizadas en España hasta el 10 de febrero de 2022



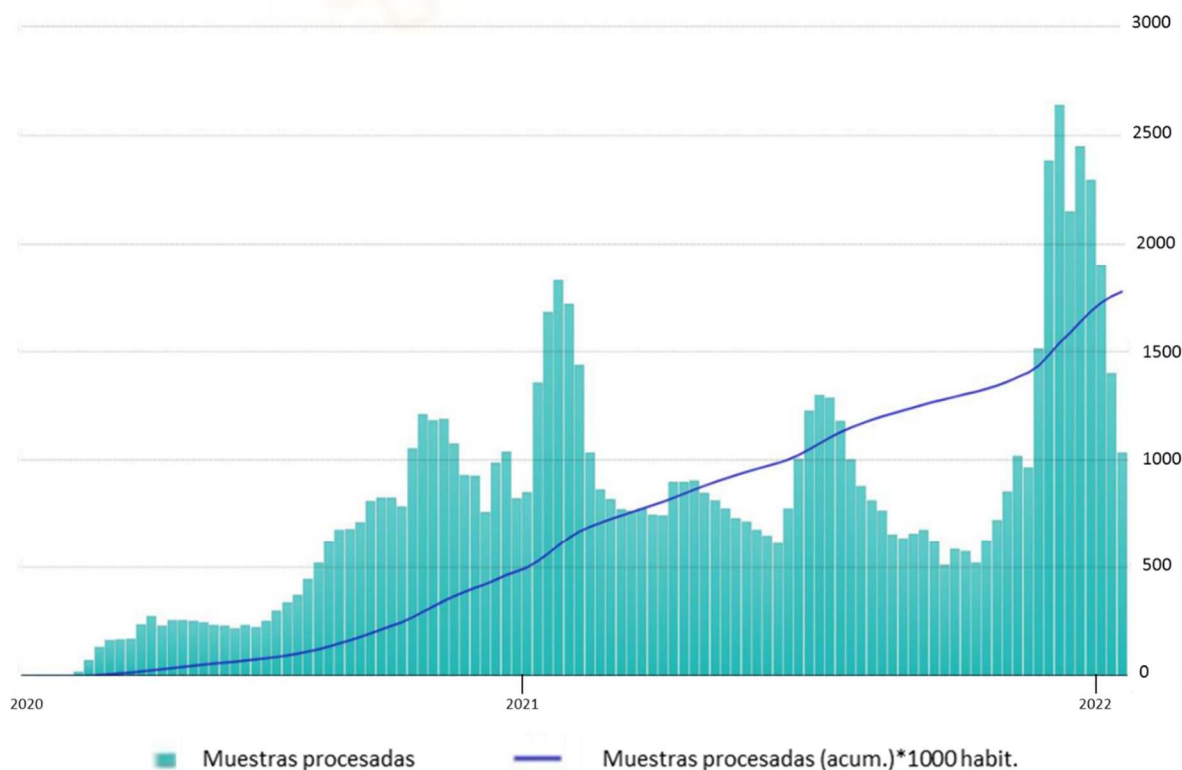
PRUEBAS DIAGNÓSTICAS ¹ COVID 19 REALIZADAS HASTA EL 10 DE FEBRERO DE 2022							
CCAA	TOTAL HASTA 03/02/2022 (consolidado) ²	TOTAL HASTA 10/02/2022 (provisional)	PCR DEL 04/02 AL 10/02/2022	PRAg DEL 04/02 AL 10/02/2022	TOTAL PRUEBAS DEL 04/02 AL 10/02/2022	Incremento porcentual semanal	Tasa pruebas por 1000 hab
ANDALUCÍA	10.218.918	10.336.587	67.130	50.539	117.669	1%	1.223,76
ARAGÓN	1.928.848	1.948.898	10.381	9.669	20.050	1%	1.471,54
ASTURIAS, PRINCIPADO DE	2.103.114	2.132.416	23.418	5.884	29.302	1%	2.090,62
BALEARIS, ILLES	2.847.201	2.877.053	13.454	16.398	29.852	1%	2.400,39
CANARIAS	3.066.981	3.106.288	20.939	18.368	39.307	1%	1.399,06
CANTABRIA	1.042.860	1.057.221	7.579	6.782	14.361	1%	1.816,69
CASTILLA Y LEÓN	4.364.258	4.410.201	19.627	26.316	45.943	1%	1.835,38
CASTILLA-LA MANCHA	2.393.621	2.428.666	12.630	22.415	35.045	1%	1.191,43
CATALUÑA	18.717.004	18.979.410	101.832	160.574	262.406	1%	2.494,17
COMUNIDAD VALENCIANA	6.635.681	6.713.193	48.272	29.240	77.512	1%	1.342,98
EXTREMADURA	2.041.060	2.071.047	8.747	21.240	29.987	1%	1.948,68
GALICIA	4.995.615	5.071.990	43.243	33.132	76.375	2%	1.879,38
MADRID, COMUNIDAD DE	13.323.395	13.466.985	58.917	84.673	143.590	1%	2.014,37
MURCIA, REGIÓN DE	2.098.699	2.139.960	14.638	26.623	41.261	2%	1.431,95
NAVARRA, COM. FORAL DE	1.631.460	1.645.093	5.178	8.455	13.633	1%	2.521,11
PAÍS VASCO	4.936.741	4.983.408	25.380	21.287	46.667	1%	2.283,96
RIOJA, LA	678.300	685.363	749	6.314	7.063	1%	2.179,30
CEUTA	154.341	156.100	309	1.450	1.759	1%	1.848,78
MELILLA	108.895	110.174	449	830	1.279	1%	1.307,14
ESPAÑA	83.286.992	84.320.053	482.872	550.189	1.033.061	1%	1.790,22

1.- PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa. PRAg: Pruebas Rápidas de Antígenos

2.- Con total de PCR y PRAg de la semana previa, incluyendo datos de ese periodo recibidos tras la publicación semanal (variación < 1%).

Fuente: Consejerías de Sanidad de las Comunidades Autónomas. Datos suministrados al Ministerio de Sanidad

Nota: el incremento porcentual se calcula respecto al número de pruebas realizadas hasta la semana previa



Actualmente, la AEMPS (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios) incluye en los test diagnósticos recomendados para la infección por SARS-CoV-2 la RT-PCR y la prueba rápida de detección de antígenos, ambas en diferentes muestras entre las que se encuentran la saliva y la muestra nasal, y cabe destacar que en los últimos meses se ha extendido de manera notable los test de autodiagnóstico.

Figura 22. Información general de la AEMPS sobre test diagnósticos de Covid-19. Actualización 15 de febrero de 2022.



Limitaciones

Entre las limitaciones destacables de nuestro estudio, encontramos que el tamaño muestral estimado para comparar tres métodos específicos para la toma de saliva, no permite sacar conclusiones sobre el rendimiento en subgrupos particulares, incluidos niños y pacientes evaluados en diferentes momentos de la enfermedad. Otra limitación de la que somos conscientes es la posibilidad de que las diferencias en el rendimiento entre los distintos métodos de recolección de saliva pudieran confundirse con las diferencias existentes entre las poblaciones y la toma de muestras en los distintos centros. Por ello, con el fin de minimizar al máximo este factor de confusión, comprobamos que las poblaciones fueran comparables en términos de edad, género y prevalencia de ARN del SARS-CoV-2, y además se estandarizaron los procedimientos de transporte, almacenamiento y procesamiento de muestras en todos los centros participantes. A pesar de la elevada participación de pacientes de todas las edades, las

muestras de saliva fueron más difíciles de conseguir en el grupo de niños (debido a la negativa del paciente, muestra insuficiente, etc.), y una proporción sustancial de niños reclutados, la mayoría muy pequeños, no pudieron proporcionar el mínimo de 1 ml de saliva, lo que sugiere que esta muestra podría ser menos adecuada para este grupo.

En la evaluación del rendimiento de la prueba de antígeno, también encontramos limitaciones, y encontramos que el tamaño muestral no permite el análisis del rendimiento en subgrupos específicos, especialmente en pacientes asintomáticos, en quienes la sensibilidad según los rangos de Ct podría no ser precisa, y la información sobre el número de días desde el contacto de riesgo en pacientes asintomáticos es incompleta.





8. CONCLUSIONES



BIBLIOTECA
UNIVERSITAS Miguel Hernández



8. CONCLUSIONES

1. La saliva es una muestra aceptable para la detección molecular de SARS-CoV-2 en el entorno comunitario. En concreto, las muestras recogidas bajo supervisión con cargas virales vinculadas con infectividad tienen un rendimiento comparable al exudado nasofaríngeo, y pueden identificar de manera efectiva a los individuos sintomáticos y asintomáticos con mayor riesgo de transmisión en condiciones de la vida real.
2. El rendimiento de la prueba de antígeno Panbio Covid-19 en muestra nasofaríngea realizada en el punto de atención al paciente es óptimo en pacientes sintomáticos con cargas virales altas y en los de mayor edad. En pacientes asintomáticos, la prueba es útil para identificar aquellos con mayor riesgo de transmisión.
3. Las muestras nasales y la saliva no son buenas opciones para el cribado del SARS-CoV-2 con la prueba rápida de detección de antígenos, debido al bajo rendimiento en pacientes asintomáticos. No obstante, en entornos sin disponibilidad de personal capacitado o condiciones seguras, la combinación de saliva y muestra nasal podría ser una alternativa adecuada a la muestra nasofaríngea para el diagnóstico de pacientes sintomáticos en el punto de atención.





9. ANEXOS



ANEXO 1: Cuestionario clínico-epidemiológico – Consentimiento informado**Cuestionario SARS-CoV-2**

Fecha:.....

Número de tarjeta SIP:.....

Temperatura corporal de hoy:.....

¿Tiene usted síntomas?

 SI NO

¿Desde cuándo tiene síntomas?

 1 día 2 días 3 días 4 días 5 días 6 días ≥7 días

Si tiene síntomas, marque cuál de éstos ha tenido, lo tiene ahora o ambos:

- Tos: La he tenido antes La tengo ahora NO tengo
- Dificultad respiratoria: La he tenido antes La tengo ahora NO tengo
- Congestión nasal: La he tenido antes La tengo ahora NO tengo
- Dolor de garganta: Lo he tenido antes Lo tengo ahora NO tengo
- Pérdida de olfato o gusto (especifique):
 La he tenido antes La tengo ahora NO tengo
- Fiebre (especifique): _____ °C
 La he tenido antes La tengo ahora NO tengo

Si padece cualquier otro síntoma, especifíquelo a continuación:

.....

.....

Doy mi consentimiento para en participar en la "Validación de la técnica rápida de antígenos del SARS-CoV-2" y doy permiso para la toma de muestras necesarias:

Firma del participante:

Firma del personal sanitario que explicó el consentimiento:



ANEXO 2: Instrucciones para una correcta toma de muestra de saliva.**INSTRUCCIONES PARA UNA CORRECTA TOMA DE MUESTRA DE SALIVA****Condiciones previas:**

Se recomienda en los 30 minutos previos a la recogida de muestra:

- ❖ No comer
- ❖ No masticar chicle
- ❖ No lavarse los dientes
- ❖ No fumar
- ❖ No beber

Recogida de la muestra:

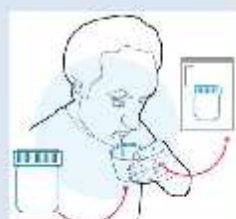
1. Recoja la muestra de saliva en casa.



2. Abra cuidadosamente el bote de recogida.



3. Antes de recoger la muestra, para estimular la producción de saliva, frote sus mejillas con la mano y haga movimientos repetidos de la mandíbula con la boca cerrada, como si estuviera masticando, moviendo la lengua a un lado y otro de la boca durante 30 segundos, con la intención de acumular la máxima cantidad posible de saliva.



4. Incline un poco la cabeza hacia adelante y deposite la saliva en el bote dejándola caer con cuidado. Haga esto varias veces para recoger la mayor cantidad de saliva posible (al menos como una cucharita de postre).



5. Tape el bote de la muestra y compruebe que esté bien cerrado.

Puede leer el código QR para acceder a un vídeo explicativo



6. Lleve la muestra de saliva al punto de recogida, en un plazo máximo de 2 horas.







Biblioteca
UNIVERSITAS INDIANEPA

10. REFERENCIAS



1. Cui J, Li F, Shi Z-L. 2019. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 181–192.
2. Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai A.C.K., Zhou J, et al. 2016. Epidemiology, genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends Microbiol.* 24, 490–502.
3. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. 2020. A novel Coronavirus from patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 382, 727–733.
4. Khailany RA, Safdar M, Ozaslan M. 2020. Genomic characterization of a novel SARSCoV-2. *Gene Rep.* 19, 100682.
5. Rosales-Mendoza S, Márquez-Escobar VA, González-Ortega O, Nieto-Gómez R, Arévalo-Villalobos JI. 2020. What Does Plant-based vaccine technology offer to the fight against COVID-19? *Vaccines.* 8:183.
6. Walls AC, Park Y-J, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Velesler D. 2020. Structure, function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike glycoprotein. *Cell.* 181:281–292.
7. Handbook of COVID-19 for neurologists - Manual COVID-19 para el neurólogo general. 2020. Ediciones SEN. ISBN: 978-84-946708-3-1
8. Yüce M, Filiztekin E, Özkaya KG. COVID-19 diagnosis -A review of current methods. 2021. *Biosens Bioelectron.* 172: 112752
9. Kevadiya BD, Machhi J, Herskovitz J, Oleynikov MD, Blomberg WR, Bajwa N, et al. Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. 2021. *Nature Materials.* 20:593–605.
10. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protoc.*1:1559–1582.
11. To KK, Tsang OT, Leung WS, Tam AR, Wu TC, Lung DC, et al. 2020. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis* 20:565–574. doi:10.1016/S1473-3099(20)30196-1.
12. To KK, Tsang OT, Yip CC, Chan KH, Wu TC, Chan JM, et al. 2020. Consistent detection of 2019 novel coronavirus in saliva. *Clin Infect Dis* 71:841–843. doi:10.1093/cid/ciaa149.
13. Hanson KE, Barker AP, Hillyard DR, Gilmore N, Barrett JW, Orlandi RR, Shakir SM. 2020. Self-collected anterior nasal and saliva specimens versus health care worker-collected nasopharyngeal swabs for the molecular detection of SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol* 58:e01824-20. doi:10.1128/JCM.01824-20.
14. Procop GW, Shrestha NK, Vogel S, Van Sickle K, Harrington S, Rhoads DD, et al. 2020. A direct comparison of enhanced saliva to nasopharyngeal swab for the detection of SARS-CoV-2 in symptomatic patients. *J Clin Microbiol* 58:e01946-20. doi:10.1128/JCM.01946-20.
15. Kojima N, Turner F, Slepnev V, Bacelar A, Deming L, Kodeboyina S, Klausner JD. 2020. Self-collected oral fluid and nasal swab specimens demonstrate comparable sensitivity to clinician-collected nasopharyngeal swab specimens for the detection of SARS-CoV-2. *Clin Infect Dis* doi:10.1093/cid/ciaa1589.

16. Jamal AJ, Mozafarihashjin M, Coomes E, Powis J, Li AX, Paterson A, et al. Toronto Invasive Bacterial Diseases Network COVID-19 Investigators. 2020. Sensitivity of nasopharyngeal swabs and saliva for the detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clin Infect Dis* doi:10.1093/cid/ciaa848.
17. Leung EC, Chow VC, Lee MK, Lai RW. 2020. Deep throat saliva as an alternative diagnostic specimen type for the detection of SARS-CoV-2. *J Med Virol* doi:10.1002/jmv.26258.
18. McCormick-Baw C, Morgan K, Gaffney D, Cazares Y, Jaworski K, Byrd A, Molberg K, Cavuoti D. 2020. Saliva as an alternate specimen source for detection of SARS-CoV-2 in symptomatic patients using Cepheid Xpert Xpress SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol* 58:e01109-20. doi:10.1128/JCM.01109-20.
19. Khurshid Z, Zohaib S, Joshi C, Moin SF, Zafar MS, Speicher DJ. 2020. Saliva as a non-invasive sample for the detection of SARS-CoV-2: a systematic review. *medRxiv* 10.1101/2020.05.09.20096354.
20. Wyllie AL, Fournier J, Casanovas-Massana A, Campbell M, Tokuyama M, Vijayakumar P, et al. 2020. Saliva or nasopharyngeal swab specimens for detection of SARS-CoV-2. *N Engl J Med* 383:1283–1286. doi:10.1056/NEJMc2016359.
21. Williams E, Bond K, Zhang B, Putland M, Williamson DA. 2020. Saliva as a noninvasive specimen for detection of SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol* 58:e00776-20. doi:10.1128/JCM.00776-20.
22. Becker D, Sandoval E, Amin A, De Hoff P, Diets A, Leonetti N, et al. 2020. Saliva is less sensitive than nasopharyngeal swabs for COVID-19 detection in the community setting. *medRxiv* 10.1101/2020.05.11.20092338.
23. Torres M, Collins K, Corbit M, Ramirez M, Winters CR, Katz L, Ross M, Relkin N, Zhou W. 2020. Comparison of saliva and nasopharyngeal swab SARS-CoV-2 RT-qPCR testing in a community setting. *J Infect* doi:10.1016/j.jinf.2020.11.015.
24. La Marca A, Capuzzo M, Paglia T, et al. Testing for SARS-CoV-2 (COVID-19): a systematic review and clinical guide to molecular and serological in-vitro diagnostic assays. *Reprod Biomed Online* 2020; 41:483–99
25. Young S, Taylor SN, Cammarata CL, et al. Clinical evaluation of BD Veritor SARS-CoV-2 point-of-care test performance compared to PCR-based testing and versus the Sofia 2 SARS antigen point-of-care test. *J Clin Microbiol* 2020; 59:e02338–20.
26. Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection using rapid immunoassays. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/antigen-detection-in-the-diagnosis-of-sars-cov-2infection-using-rapid-immunoassays>.
27. Interim Guidance for Rapid Antigen Testing for SARS-CoV-2. Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antigen-tests-guidelines.html#:~:text=CDC%20recommends%20that%20laboratory%20and,the%20previous%207%E2%80%9310%20days>
28. He X, Lau EHY, Wu P, et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat Med* 2020; 26:6725.

29. Mina MJ, Parker R, Larremore DB. Rethinking covid-19 test sensitivity—a strategy for containment. *N Engl J Med* 2020; 383:e120.
30. Dinnes J, Deeks JJ, Adriano A, et al. Cochrane COVID-19 Diagnostic Test Accuracy Group. Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Cochrane Database Syst Rev* 2020; 8:CD013705.
31. Linares M, Pérez-Tanoira R, Carrero A, et al. Panbio antigen rapid test is reliable to diagnose SARS-CoV-2 infection in the first 7 days after the onset of symptoms. *J Clin Virol* 2020; 133:104659.
32. Blairon L, Wilmet A, Beukinga I, Tré-Hardy M. Implementation of rapid SARS-CoV-2 antigenic testing in a laboratory without access to molecular methods: experiences of a general hospital. *J Clin Virol* 2020; 129:104472.
33. Lambert-Niclot S, Cuffel A, Le Pape S, et al. Evaluation of a rapid diagnostic assay for detection of SARS-CoV-2 antigen in nasopharyngeal swabs. *J Clin Microbiol* 2020; 58:e00977-20.
34. Hou, H. et al. Detection of IgM and IgG antibodies in patients with coronavirus disease 2019. *Clin. Transl. Immunol.* 9, e01136 (2020).
35. COVID-19 Testing Project. Covid-19 Molecular Diagnostic Test through RT-PCR. [Internet] 2020. Disponible en: <http://covidtestingproject.org/faq.html>
36. Kuhn M. 2020. CARET: Classification and regression training. R package, version 6.0-86. <https://CRAN.R-project.org/package=caret>.
37. Wickham H, Sievert C. 2016. *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. Springer-Verlag, New York, NY.
38. Actualización nº 191. Enfermedad por el coronavirus (COVID-19). 24.08.2020. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias. Ministerio de Sanidad.
39. Jefferson T, Spencer EA, Brassey J, Heneghan C. 2020. Viral cultures for COVID-19 infectious potential assessment—a systematic review. *Clin Infect Dis* doi:10.1093/cid/ciaa1764.
40. Basile K, McPhie K, Carter I, Alderson S, Rahman H, Donovan L, et al. 2020. Cell-based culture of SARS-CoV-2 informs infectivity and safe de-isolation assessments during COVID-19. *Clin Infect Dis* doi:10.1093/cid/ciaa1579.
41. Williams E, Bond K, Zhang B, Putland M, Williamson DA. 2020. Saliva as a noninvasive specimen for detection of SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol* 58:e00776-20. doi:10.1128/JCM.00776-20.
42. Liu Y, Yan LM, Wan L, Xiang TX, Le A, Liu JM, Peiris M, Poon LLM, Zhang W. 2020. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *Lancet Infect Dis* 20:656–657. doi:10.1016/S1473-3099(20)30232-2.
43. Chau NVV, Lam VT, Dung NT, Yen LM, Minh NNQ, Hung LM, et al. OUCRU COVID-19 research group. 2020. The natural history and transmission potential of asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *Clin Infect Dis* 71:2679–2687. doi:10.1093/cid/ciaa711.
44. Zou L, Ruan F, Huang M, Liang L, Huang H, Hong Z, et al. 2020. SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. *N Engl J Med* 382:1177–1179. doi:10.1056/NEJMc2001737.

45. Chen JH, Yip CC, Poon RW, Chan KH, Cheng VC, Hung IF, Chan JF, Yuen KY, To KK. 2020. Evaluating the use of posterior oropharyngeal saliva in a point-of-care assay for the detection of SARS-CoV-2. *Emerg Microbes Infect* 9:1356–1359. doi:10.1080/22221751.2020.1775133.
46. Pasomsub E, Watcharananan SP, Boonyawat K, Janchompoo P, Wongtabtim G, Suksuwan W, et al. 2020. Saliva sample as a non-invasive specimen for the diagnosis of coronavirus disease 2019: a cross-sectional study. *Clin Microbiol Infect* doi:10.1016/j.cmi.2020.05.001.
47. Perchetti GA, Huang ML, Mills MG, et al. Analytical sensitivity of the Abbott BinaxNOW COVID-19 Ag CARD. *J Clin Microbiol* 2020; doi:10.1128/JCM.02880-20
48. Zheng S, Fan J, Yu F, et al. Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January-March 2020: retrospective cohort study. *BMJ* 2020; 369:m1443.
49. Pujadas E, Chaudhry F, McBride R, et al. SARS-CoV-2 viral load predicts COVID-19 mortality. *Lancet Respir Med* 2020; 8:e70.
50. La Scola B, Le Bideau M, Andreani J, et al. Viral RNA load as determined by cell culture as a management tool for discharge of SARS-CoV-2 patients from infectious disease wards. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2020; 39:1059–61.
51. Gniazdowski V, Morris CP, Wohl S, et al. 2020. Repeat COVID-19 molecular testing: correlation of SARS-CoV-2 culture with molecular assays and cycle thresholds. *Clin Infect Dis* 16;73(4):e860-e869
52. Bullard J, Dust K, Funk D, et al. 2020. Predicting infectious SARS-CoV-2 from diagnostic samples. *Clin Infect Dis* 71(10):2663-2666
53. Wölfel R., Corman V.M., Guggemos W., et al. (2020). Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*. 2020;581:465–469. doi: 10.1038/s41586-020-2196-x.
54. Corman VM, Haage VC, Bleicker T, et al. Comparison of seven commercial SARS-CoV-2 rapid point-of-care antigen tests [preprint]. medRxiv doi: 10.1101/2020.11.12.20230292.
55. Arons MM, Hatfield KM, Reddy SC, et al. ; Public Health–Seattle and King County and CDC COVID-19 Investigation Team. Presymptomatic SARS-CoV-2 infections and transmission in a skilled nursing facility. *N Engl J Med* 2020; 382:2081–90.
56. Chau NVV, Thanh Lam V, Thanh Dung N, et al. The natural history and transmission potential of asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *Clin Infect Dis* 2020; 71:2679–87.
57. Buitrago-Garcia D, Egli-Gany D, Counotte MJ, et al. Occurrence and transmission potential of asymptomatic and presymptomatic SARS-CoV-2 infections: a living systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* 2020; 17:e1003346.
58. Luo L, Liu D, Liao X, et al. Contact settings and risk for transmission in 3410 close contacts of patients with COVID-19 in Guangzhou, China: a prospective cohort study. *Ann Intern Med* 2020; 173:879–87.
59. Oran DP, Topol EJ. Prevalence of asymptomatic SARS-CoV-2 infection: a narrative review. *Ann Intern Med* 2020; 173:362–7.

60. Nagura-Ikeda M, et al. Clinical Evaluation of Self-Collected Saliva by Quantitative Reverse Transcription-PCR (RT-qPCR), Direct RT-qPCR, Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification, and a Rapid Antigen Test to Diagnose COVID-19. *J Clin Microbiol.* 2020 Aug 24;58(9):e01438-20. doi: 10.1128/JCM.01438-20.
61. «Seguimiento de las variantes del SARS-CoV-2». www.who.int , Kaiming.
62. Actualización nº 566. Enfermedad por el coronavirus (COVID-19). 17.02.2022. Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias. Ministerio de Sanidad









11. ARTÍCULOS



Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández



Performance of Saliva Specimens for the Molecular Detection of SARS-CoV-2 in the Community Setting: Does Sample Collection Method Matter?

✉ Marta Fernández-González,^a ✉ Vanesa Agulló,^a Alba de la Rica,^b Ana Infante,^c Mar Carvajal,^a ✉ José Alberto García,^a Nieves Gonzalo-Jiménez,^b Claudio Cuartero,^c Montserrat Ruiz-García,^b Carlos de Gregorio,^d Manuel Sánchez,^d ✉ Mar Masía,^{a,e} ✉ Félix Gutiérrez^{a,e}

^aInfectious Diseases Unit, Hospital General Universitario de Elche, Elche, Spain

^bMicrobiology Service, Hospital General Universitario de Elche, Elche, Spain ^cMicrobiology Service, Hospital Universitario de San Juan, San Juan de Alicante, Spain ^dDepartment 20th Health Authority, Consellería de Sanitat, Generalitat Valenciana, Elche, Spain ^eClinical Medicine Department, Universidad Miguel Hernández, San Juan de Alicante, Spain

Marta Fernández-González and Vanesa Agulló contributed equally to this work. Author order was determined by drawing straws. Mar Masía and Félix Gutiérrez are joint senior authors.

ABSTRACT Data on the performance of saliva specimens for diagnosing coronavirus disease 2019 (COVID-19) in ambulatory patients are scarce and inconsistent. We assessed saliva-based specimens for detecting severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by reverse transcriptase PCR (RT-PCR) in the community setting and compared three different collection methods. This prospective study was conducted in three primary care centers. RT-PCR was performed on paired nasopharyngeal swabs (NPS) and saliva samples collected from outpatients with a broad clinical spectrum of illness. To assess differences in collection methods, saliva specimens were obtained in a different way in each of the participating centers: supervised collection (SVC), oropharyngeal washing (OPW), and self-collection (SC). Pairs of NPS and saliva samples from 577 patients (median age, 39 years; 44% men; 42% asymptomatic) were collected and tested, and 120 (20.8%) gave positive results. The overall agreement with NPS results and kappa coefficients (κ) for saliva samples obtained by SVC, OPW, and SC were 95% ($\kappa=0.85$), 93.4% ($\kappa=0.76$), and 93.3% ($\kappa=0.76$), respectively. The sensitivities (95% confidence intervals [95% CI]) of the saliva specimens ranged from 86% (72.6% to 93.7%) for SVC to 66.7% (50.4% to 80%) for SC samples. Sensitivity was higher for samples with lower cycle threshold (C_T) values. The best RT-PCR performance was observed for SVC, with sensitivities (95% CI) of 100% (85.9% to 100%) in symptomatic individuals and 88.9% (50.7% to 99.4%) in asymptomatic individuals at C_T values of $\#30$. We conclude that saliva is an acceptable specimen for the detection of SARS-CoV-2 in the community setting. Specimens collected under supervision perform comparably to NPS and can effectively identify individuals at higher risk of transmission under real-life conditions.

KEYWORDS COVID-19, saliva, SARS-CoV-2, PCR, diagnostics

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection is usually detected by real-time reverse transcriptase PCR (RT-PCR) on RNA extracted from upper-respiratory-tract specimens, typically nasopharyngeal swabs (NPS). However, collection of NPS is uncomfortable for the patient and may induce coughing and sneezing, which may expose the health care provider to infectious aerosols. Therefore, alternative sampling has been investigated, including easy-to-obtain specimens with

Citation Fernández-González M, Agulló V, de la Rica A, Infante A, Carvajal M, García JA, Gonzalo-Jiménez N, Cuartero C, Ruiz-García M, de Gregorio C, Sánchez M, Masía M, Gutiérrez F. 2021. Performance of saliva specimens for the molecular detection of SARS-CoV-2 in the community setting: does sample collection method matter? *J Clin Microbiol* 59:e03033-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.03033-20>.

Editor Melissa B. Miller, UNC School of Medicine

Copyright © 2021 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Mar Masía, mmasia@umh.es, or Félix Gutiérrez, gutierrez_fel@gva.es.

Received 2 December 2020 Returned for modification 15 December 2020
Accepted 7 January 2021 Accepted manuscript posted online 8 January 2021
Published 19 March 2021

the potential for patient self-collection, such as saliva. Although initial studies investigating the use of saliva suggested that this specimen may be a good alternative sample to NPS, mixed results have been reported, with sensitivities in the range of 30% to 100% (1–12).

Most of the studies that have evaluated SARS-CoV-2 detection in saliva were conducted in patients admitted to hospital with known coronavirus disease 2019 (COVID-19) infection, and some of these studies were limited by the lack of simultaneous collection of NPS and saliva specimens and by the reduced composition of the cohorts, including mainly adults and symptomatic patients, all of which may limit the overall generalizability of the findings. Additionally, the procedures for collecting saliva specimens have differed substantially among the studies, from enhanced collection under direction or supervision by the clinician (1–5) to unsupervised self-collection by the participants (10–12). Differences in saliva sampling may explain the differing results of the published studies.

The use of saliva specimens in the ambulatory setting may be particularly appealing due to the ease of collection and reduced equipment required, but data are scarce and inconsistent. While findings from a study on 45 patients support the potential of these specimens for detecting SARS-CoV-2 from outpatients (5), reduced sensitivity relative to that of NPS has been reported in a recent community-based cohort, raising concerns about the use of saliva samples in this setting (12, 13). Therefore, to clarify the role of saliva as an alternate specimen type for the detection of SARS-CoV-2 in the community setting, larger clinical studies are needed.

The present study aimed to evaluate the performance of saliva-based specimens for detecting SARS-CoV-2 by RT-PCR in a prospective study of adults and children with suspected COVID-19. In this investigation, we performed RT-PCR on paired NPS and saliva samples collected from outpatients with a broad clinical spectrum of illness, including asymptomatic cases, undergoing SARS-CoV-2 testing, and we compared three different collection methods.

MATERIALS AND METHODS

Setting and study subjects. This prospective, observational study was carried out by the COVID19- Elx-Rapid Diagnostic Tests Study Group at the Departments of Health 17 and 20 of the province of Alicante, Spain. The study was approved by the Hospital General Universitario de Elche COVID-19 Institutional Advisory Board. Patients enrolled in the study were those presenting for SARS-CoV-2 testing, as requested by their providers, at the facilities of three primary care centers (PCC). Both symptomatic patients and asymptomatic individuals who had been exposed to SARS-CoV-2 were invited to participate in the investigation by providing saliva samples immediately preceding the collection of the NPS. After written consent was obtained, demographic and clinical findings were recorded.

Specimen collection and processing. Saliva specimens were collected into a 100-ml sterile empty container without transport medium. To assess differences in collection methods, saliva specimens were obtained in a different way in each of the participating PCC by random assignment. In center A, saliva specimens were obtained under the supervision of a healthcare worker (supervised collection [SVC]); in center B, saliva specimens were obtained after oropharyngeal washing (OPW), consisting of rinsing the mouth with 2 ml of saline solution and spitting the solution into the collection pot; and in center C, saliva specimens were collected independently by the individual providing the sample, following written instructions (self-collection [SC]). The instructions read as follows: “To collect saliva, bow your head forward to allow saliva to pool in the front of your mouth and spit up to a minimum of 1 ml of saliva (half a teaspoon) into the collection pot.” In the SVC center, subjects were instructed to produce and pool saliva in their mouths for 1 to 2 min, moving the mouth and passing the tip of the tongue across the cheeks and gums, and then to repeatedly spit a minimum of 1 ml saliva into the collection pot in the presence of a health care worker.

In the three PCC, nasopharyngeal samples were taken by qualified nurses following the same procedure and using the same kind of NPS. A flexible minitip swab was passed through the patient's nostril until the posterior nasopharynx was reached, left in place for several seconds to absorb secretions, and then slowly removed while rotating. Swabs were placed in 3 ml of sterile transport medium containing guanidine salt (Mole Bioscience, SUNGO Europe B.V., Amsterdam, Netherlands). To reduce variability in specimen transport, storage, and processing, the procedures were standardized in the three centers. Nasopharyngeal and saliva specimens were transported within 2 h of sample collection to the clinical microbiology laboratory for molecular analysis by RT-PCR. NPS samples were analyzed immediately, and saliva specimens were frozen (220°C) and analyzed within 2 weeks after collection. Containers with saliva or OPW were thawed at room temperature; the sample was homogenized with the tip of an automatic pipette; and 300 ml was taken to the automated extraction plate.

SARS-CoV-2 detection. Nucleic acid extraction was performed using 300 ml of specimen (NPS or

saliva) on a chemagic 360 nucleic acid purification instrument (PerkinElmer España SL, Madrid, Spain). Then 10 ml of the eluate was used for a real-time RT-PCR assay targeting the E gene (LightMix Modular SARS-CoV (COVID19) E-gene kit; TIB Molbiol, Berlin, Germany; distributed by Roche). Testing was performed according to the manufacturer's guidelines on a cobas z 480 analyzer (Roche, Basel, Switzerland). The number of cycles of amplification in RT-PCR (cycle threshold [C_T] value) was assessed as a surrogate measure of the RNA concentration. According to the manufacturer, a C_T value of #40 by PCR is considered a positive result.

Statistical methods. Continuous variables were expressed as the median (Q1 to Q3) and categorical variables as percentages. The Wilcoxon test or Student's *t* test was used to compare two continuous variables; Kruskal-Wallis analysis of variance (ANOVA) was used for three or more continuous variables; and the chi-square test or Fisher's exact test was used for the comparison of categorical variables. The percentage of agreement (positive, negative, and overall) (PPA, NPA, and OPA) for saliva specimens obtained by SVC, OPW, and SC was calculated using the results of the RT-PCR for NPS as the reference standard. Performance agreement was evaluated using kappa coefficients (κ). Positive results of either NPS or saliva specimens were considered true-positive results for calculations of sensitivity. Patients with an undetermined result by RT-PCR for an NPS or saliva specimen were not considered for calculations of agreement. The performance of saliva specimens was also evaluated by stratifying by the presence of symptoms. Given the increasing evidence of a positive relationship between low C_T values and the likelihood of culturing live virus and therefore infectious potential, we also evaluated the performance of saliva specimens according to C_T values for NPS with different cutoff levels that have been associated with higher probabilities of positive viral culture (#25 and #30) (14).

Statistical analyses were performed with R, version 4.0.3, software. The percentage of positive or negative agreement and kappa coefficients (κ) were calculated using the caret package (15). For graphical analysis, the ggplot2 package (16) was used. We planned to include 133 patients per arm, assuming a sensitivity of 95% and a confidence level of 95%. With this sample size, the study would have a statistical power of 80% to detect a 10% difference in sensitivity between the different collection methods.

RESULTS

Patient characteristics and positivity rates. A total of 634 patients (103 children) were invited to take part in the study between 15 September and 29 October 2020. Fifty-four patients (median [Q1 to Q3] age, 5.8 [4 to 10] years; 44 children) were unable to provide saliva specimens, and 3 (0.5%) specimens had insufficient sample for laboratory analysis. A total of 577 pairs of samples (229 SVC, 140 OPW, 208 SC) were included in the analyses. A flow chart of the patients is depicted in Fig. S1 in the supplemental material. The demographic and clinical characteristics of the patients according to the collection method for saliva specimens are shown in Table 1. There were 120 (20.8%) positive results for SARS-CoV-2 by either NPS or saliva, 50 (21.8%) in the SVC, 28 (20%) in the OPW, and 42 (20.2%) in the SC group. NPS and saliva samples from 2 (0.3%) and 9 (1.6%) patients, respectively, generated invalid transcription-mediated amplification results due to internal-control failure.

Sensitivities of the different specimens for SARS-CoV-2 detection and concordance between saliva specimens and NPS. Table 2 shows the qualitative positive results for SARS-CoV-2 RNA obtained from NPS and saliva specimens according to the collection method, and Fig. 1 shows the concordance of positive test results between NPS and the different saliva specimen types. The sensitivity for NPS specimens was 95% (95% confidence interval [95% CI], 88.9% to 97.9%). Among saliva specimens, SVC showed the best case detection rate (43 of 50 infected patients), with significantly higher sensitivity than SC samples (86% [95% CI, 72.6% to 93.7%] versus 66.7% [95% CI, 50.4% to

80%]; $P=0.027$). The OPW method detected 21 of 28 individuals (sensitivity, 75% [95% CI, 54.8% to 88.6%]) (Table 1). The greatest sensitivity was obtained by combining NPS sampling with saliva collected under supervision (sensitivity, 97.5% [95% CI, 92.3% to 99.3%]). Table 3 shows the agreement of the three different kinds of saliva specimens with NPS. The best agreement with NPS was found for the specimens of the SVC group, with a kappa coefficient of 0.85. For the OPW and SC groups, the kappa coefficient was 0.76.

Performance of the different saliva specimens for SARS-CoV-2 detection by cycle threshold values and the presence of symptoms. Median C_T values were significantly lower in NPS than in their paired saliva specimens ($P=0.035$), although in 19 (15.8%) patients, the saliva showed a lower C_T value than the corresponding NPS. Median C_T values in the three saliva specimen types were not significantly different

TABLE 1 Demographic and clinical characteristics of the patients according to the method of collection of saliva specimens

Characteristic	Overall cohort		Supervised collection		Oropharyngeal washing		Self-collection	
	All patients	Patients with SARS-CoV-2-positive RNA	All SVC patients ^a	SVC patients with SARS-CoV-2-positive RNA	All OPW patients	OPW patients with SARS-CoV-2-positive RNA	All SC patients	SC patients with SARS-CoV-2-positive RNA
No. of patients (%)	577	120 (20.8)	229	50 (21.8)	140	28 (20)	208	42 (20.2)
No. male (%)	251 (43.5)	57 (47.5)	91 (39.7)	22 (44)	66 (47.1)	13 (46.4)	94 (45.2)	22 (52.4)
Median age (yr) (Q1–Q3)	39 (24–51)	42 (28–54)	39 (21–48)	42 (29–49)	36 (23–51)	41 (27–54)	40 (27–54)	41 (28–57)
No. (%) of patients aged:								
0–13 yr	59 (10.2)	5 (4.2)	28 (12.2)	3 (6)	16 (11.4)	1 (3.6)	15 (7.2)	1 (2.4)
14–49 yr	368 (63.8)	79 (65.8)	152 (66.4)	35 (70)	87 (62.1)	18 (64.3)	129 (62)	26 (61.9)
50–64 yr	105 (18.2)	26 (21.7)	40 (17.5)	10 (20)	26 (18.6)	8 (28.6)	39 (18.8)	8 (19)
≥65 yr	45 (7.8)	10 (8.3)	9 (3.9)	2 (4)	11 (7.9)	1 (3.6)	25 (12)	7 (16.7)
No. (%) with the following comorbidity:								
Hypertension	42 (7.3)	13 (10.8)	17 (7.4)	3 (6)	12 (8.6)	2 (7.1)	13 (6.2)	8 (19)
Dyslipidemia	37 (6.4)	15 (12.5)	17 (7.4)	5 (10)	11 (7.9)	5 (19.2)	9 (4.3)	5 (11.9)
Diabetes	19 (3.3)	9 (7.5)	10 (4.4)	3 (6)	4 (2.9)	3 (10.7)	5 (2.4)	3 (7.1)
Cardiomyopathy	17 (2.9)	3 (2.5)	9 (3.9)	0 (0)	7 (5)	2 (7.1)	1 (0.5)	1 (2.4)
Obesity	25 (4.3)	10 (8.3)	9 (3.9)	2 (4)	8 (5.7)	3 (10.7)	8 (3.8)	5 (11.9)
Presence of symptoms on the day of sample collection								
No. (%) symptomatic	336 (58.2)	86 (71.7)	145 (63.3)	37 (74)	68 (48.6)	17 (60.7)	123 (59.1)	32 (76.2)
Median (Q1–Q3) days with symptoms	4 (3–6)	5 (3–7)	3 (2–5)	4 (2–7)	4 (3–5)	4 (3–6)	4 (3–6)	5 (3–7)
Sensitivity of saliva specimens (% [95% CI])								
Global		76.7 (67.9–83.7)		86 (72.6–93.7)*		75 (54.8–88.6)		66.7 (50.4–80)
Symptomatic patients		77.9 (67.4–85.9)		89.2 (73.6–96.5)**		70.6 (44–88.6)		68.8 (49.9–83.3)
Asymptomatic patients		73.5 (55.3–86.5)		76.9 (46–93.8)		81.8 (47.8–96.8)		60 (27.4–86.3)
C _T , #25 ^b		96.7 (87.5–99.4)		100 (85.9–100)		93.3 (66–99.7)		93.3 (66–99.7)
C _T , #30		91.6 (82.9–96.3)		97.4 (84.9–99.9)		81 (57.4–93.7)		91.3 (70.5–98.5)
C _T , >30		43.2 (27.5–60.4)		45.5 (18.1–75.4)		57.1 (20.2–88.2)		36.8 (17.2–61.4)

^aAsterisks indicate significant differences between supervised collection and self-collection (*, $P = 0.028$; **, $P = 0.035$).

^bC_T, cycle threshold of RT-PCR for nasopharyngeal swabs (or saliva specimens in cases with a negative nasopharyngeal swab and positive saliva)

TABLE 2 Comparison of qualitative results from nasopharyngeal swabs and saliva specimens according to the collection method

Nasopharyngeal swab result ^a	No. of saliva samples with the indicated result, taken by:								
	Supervised collection (n = 229)			Oropharyngeal washing (n = 140)			Self-collection (n = 208)		
	Pos	Neg	Und	Pos	Neg	Und	Pos	Neg	Und
Pos	39	7	0	18	7	0	28	14	0
Neg	4	171	7	2	110	2	0	166	0
Und	0	1		1	0		0	0	

^aPos, positive; Neg, negative; Und, undetermined.

from each other ($P=0.962$) (Fig. 2). Figure 1 displays the concordance for SARS-CoV-2 detection between paired NPS and saliva samples, and the C_T values of the discordant positive results. Median (Q1 to Q3) C_T values for NPS-positive-only or saliva-positive-only specimens were 33 (31 to 34) and 32 (29 to 33.5), respectively.

The sensitivities of the different specimens for SARS-CoV-2 detection according to C_T values are depicted in Fig. 3. The sensitivities of the saliva specimens were higher at lower C_T values. For C_T values of #25, the median (95% CI) sensitivities of SVC, OPW, and SC sampling reached 100% (85.9% to 100%), 93.3% (66% to 99.7%), and 93.3% (66% to 99.7%), respectively, and decreased only minimally, to 97.4% (84.9% to 99.9%), 81% (57.4% to 93.7%), and 91.3% (70.5% to 98.5%), respectively, for C_T values of #30. Figure S2 shows the sensitivity by sample type according to C_T values and the presence of symptoms.

There were no significant differences in sensitivity between patients with and without active symptoms for the same C_T values across the different specimens. The best RT-PCR performance was observed for NPS, closely followed by supervised collected saliva, with sensitivities (95% CI) of 98.4% (90.2% to 99.9%) and 100% (85.9% to 100%), respectively, in symptomatic individuals, and 95.2% (74.1% to 99.8%) and 88.9% (50.7% to 99.4%), respectively, in asymptomatic individuals at C_T values of #30.

DISCUSSION

We confirmed that saliva is an acceptable specimen for the molecular detection of SARS-CoV-2 in the community setting and can effectively identify individuals with the highest risks of transmission under real-life conditions. This study revealed that the collection method may be critical for improving sensitivity. Saliva specimens obtained under supervision outperform self-collected samples and show higher sensitivity in symptomatic and asymptomatic patients.

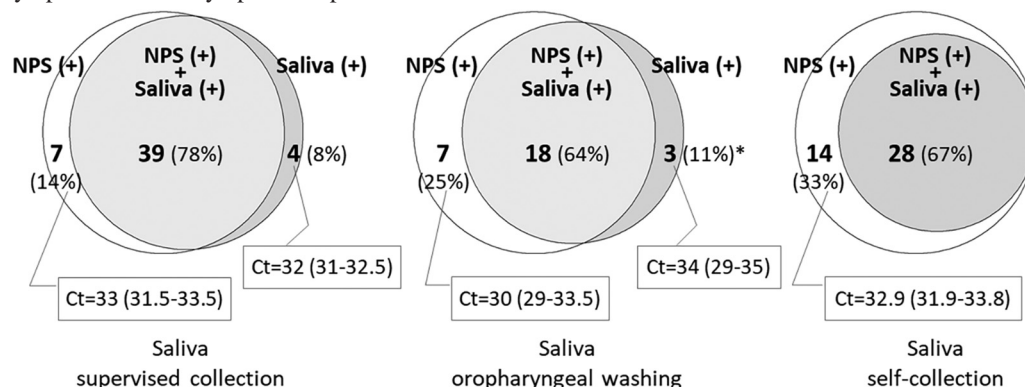


FIG 1 Positivity for SARS-CoV-2 RNA in nasopharyngeal swabs (NPS) and in the different saliva specimens, including cycle threshold values of discordant specimens. The asterisk indicates one positive saliva specimen for which a negative NPS was confirmed

TABLE 3 Agreement of the different kinds of saliva specimens with the nasopharyngeal swabs

Saliva type	% agreement (95% CI)			Performance agreement (κ) (95% CI)
	Positive	Negative	Overall	
Supervised collection	84.8(70.5–93.2)	97.7(93.9–99.3)	95 (91–97.4)	0.85 (0.76–0.93)
Oropharyngeal washing	72(50.4–87.1)	98.2(93.1–99.7)	93.4 (87.5–96.8)	0.76 (0.61–0.91)
Self-collection	66.7(50.4–80)	100(97.2–100)	93.3 (88.7–96.1)	0.76 (0.64–0.88)

As expected, the sensitivity of the saliva specimens increased in samples with low C_T values. Indeed, supervised collected specimens performed almost as well as nasopharyngeal samples, with sensitivities well above 90% for patients with low C_T values, who are considered to have the greatest potential to spread the virus (14, 17). For C_T values of #25, the sensitivities of SVC, OPW, and SC saliva specimens reached 100%, 93%, and 93%, respectively, and for patients with C_T values of #30, they were 97%, 81%, and 91%, respectively. Among NPS-only-positive individuals, we found only one case of saliva collected under supervision with a C_T value of #30. Therefore, the use of saliva specimens in general, particularly when obtained under supervision, allowed the detection of SARS-CoV-2 in the vast majority of the patients with significant risks of transmission.

In contrast to most of the previous studies, which have been largely focused on inpatient populations, in the present investigation we included outpatients with a broad clinical spectrum of the illness, comprising children and asymptomatic cases. Like Williams et al. (11), we evaluated casual saliva specimens without previous fasting or enhancement techniques such as strong sniffing or coughing, used in other studies (4). Prior investigations comparing different samples for the molecular detection of SARS-CoV-2 in the community setting have reported lower sensitivity rates with saliva specimens than with NPS, ranging from 30% to 85% (11–13). The reduced performance has been attributed to the milder symptoms in outpatients, with viral loads lower than those in more-severe cases (18, 19), and to differences in the temporal dynamics of viral shedding between upper respiratory locations and saliva (20, 21), with lower viral loads in saliva samples (11). We did not find prominent differences in performance between samples from individuals with and without active symptoms, but, in line with other studies (8, 22, 23), we detected higher C_T values, indicating lower viral loads, in

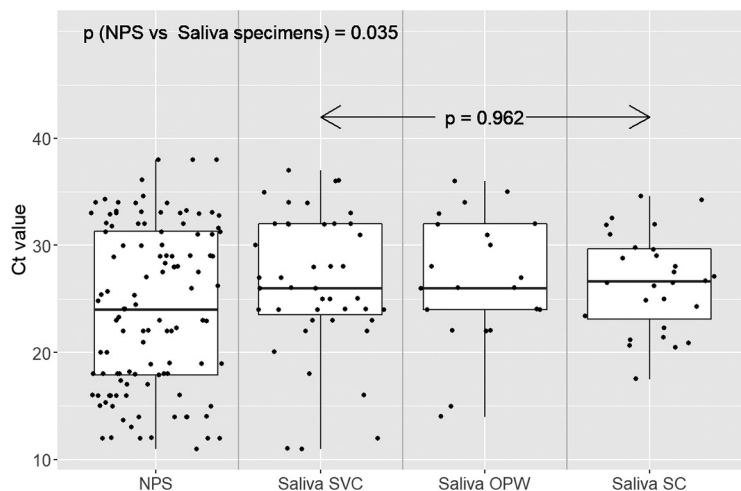


FIG 2 Cycle threshold values for pairs of nasopharyngeal swabs (NPS) and saliva specimens from all positive individuals. Each dot represents the C_T value (in RT-PCR) for a positive specimen: NPS ($n=113$), saliva obtained under supervised collection (SVC) ($n=43$), saliva obtained after oropharyngeal washing (OPW) ($n=21$), or saliva obtained by self-collection (SC) ($n=28$).

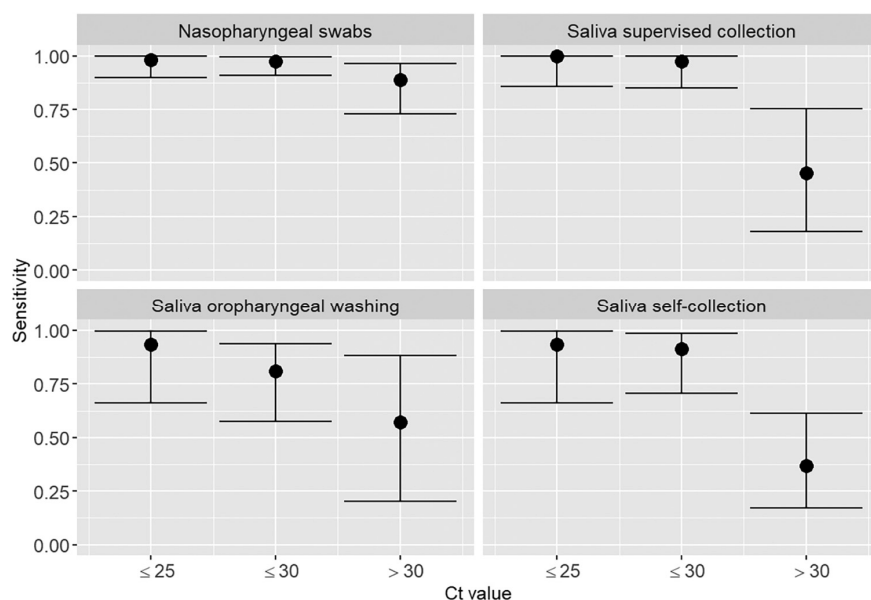


FIG 3 Sensitivities of the different specimens for SARS-CoV-2 detection according to the C_T value with nasopharyngeal swabs. In cases with a negative nasopharyngeal swab and positive saliva, the C_T value of the saliva specimen was taken.

saliva specimens than in the corresponding NPS, suggesting differences in viral shedding between the two compartments. In addition, the significant differences in the performances of the specimen types evaluated in our study suggest that variation in saliva sampling may have contributed to the disparities in sensitivity observed in previous investigations.

This study has limitations. The investigation focused on comparing three specific methods for the collection of saliva samples and was powered to detect rather large differences among groups. The sample size does not allow one to draw conclusions on the performance in particular subgroups, including children and patients tested at different time points of illness. Other potential weaknesses include the possibility that differences in performance among the collection methods could be confounded by differences in the populations and sampling among the three PCC. However, the populations were comparable in terms of gender, age, and the prevalence of SARS-CoV-2 RNA positivity, and to reduce variability in specimen transport, storage, and processing, the procedures were standardized in the three participating centers. Noteworthy, a substantial proportion of the children recruited, most of them very young children, were unable to provide the minimum of 1 ml of saliva sample after the procedure was explained, suggesting that this specimen type might be less suitable for this group. In addition, we used a particular detection system (cobas z 480 analyzer); other platforms may have yielded different results. The strengths of the study are that it was population based and was carried out under real-life conditions, enrolling consecutive outpatients of all ages presenting for testing due to symptoms and asymptomatic people who had come into contact with confirmed cases.

In conclusion, our results indicate that adequate collection of samples may be essential for the molecular diagnosis of COVID-19 when one is using saliva specimens. Saliva specimens obtained under supervision perform comparably to NPS and should be considered reliable samples for diagnosis of both symptomatic and asymptomatic individuals in the community setting, particularly for detecting individuals with significant risks of transmission. Although self-collected saliva would be the most advantageous way of sampling if mass testing were considered, these specimens had less

sensitivity in our study. Further research is needed to determine whether other strategies of instruction, for example, videos or telecommunications, can substitute for the direct supervision of a health professional.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.
SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 0.1 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the RD16/0025/0038 project as a part of the Plan Nacional Research I Development I Innovation (RDII) and was cofinanced by the Instituto de Salud Carlos III - Subdirección General de Evaluación y Fondo Europeo de Desarrollo Regional and Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigaciones Sanitarias [grants PI16/01740, PI18/01861, CM19/00160, and COV20-00005]).

All authors declare no conflict of interest.

The members of the COVID19-Elx-Rapid Diagnostic Tests Study Group are as follows: Félix Gutiérrez, Mar Masía, Sergio Padilla, Guillermo Telenti, Lucia Guillen, María Andreo, Fernando Lidón, Vladimir Ospino, José López, Marta Fernández, Vanesa Agulló, Gabriel Estañ, Javier García, Cristina Martínez, Leticia Alonso, Joan Sanchís, Ángela Botella, Paula Mascarell, María Selene Falcón, Sandra Ruiz, José Carlos Asenjo, Carolina Ding, Mar Carvajal, Inmaculada Candela, Jorge Guijarro, Cristina la Moneda, Cristina Jara, Raquel Mora, Juan Manuel Quinto, Sergio Ros, Daniel Canal, Pascual Pérez, Carolina Garrido, Manuel Sánchez, Jaime Sastre, Carlos de Gregorio, Francisco Carrasco, Juan Navarro, Andrés Navarro, Nieves Gonzalo, Clara Pérez, Adoración Alcalá, José Luis Rincón, Montserrat Ruiz, and JoséAntonio Gutiérrez.

REFERENCES

- To KK, Tsang OT, Leung WS, Tam AR, Wu TC, Lung DC, Yip CC, Cai JP, Chan JM, Chik TS, Lau DP, Choi CY, Chen LL, Chan WM, Chan KH, Ip JD, Ng AC, Poon RW, Luo CT, Cheng VC, Chan JF, Hung IF, Chen Z, Chen H, Yuen KY. 2020. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis* 20:565–574. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30196-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30196-1).
- To KK, Tsang OT, Yip CC, Chan KH, Wu TC, Chan JM, Leung WS, Chik TS, Choi CY, Kandamby DH, Lung DC, Tam AR, Poon RW, Fung AY, Hung IF, Cheng VC, Chan JF, Yuen KY. 2020. Consistent detection of 2019 novel coronavirus in saliva. *Clin Infect Dis* 71:841–843. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa149>.
- Hanson KE, Barker AP, Hillyard DR, Gilmore N, Barrett JW, Orlandi RR, Shakir SM. 2020. Self-collected anterior nasal and saliva specimens versus health care worker-collected nasopharyngeal swabs for the molecular detection of SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol* 58:e01824-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.01824-20>.
- Procop GW, Shrestha NK, Vogel S, Van Sickle K, Harrington S, Rhoads DD, Rubin BP, Terpeluk P. 2020. A direct comparison of enhanced saliva to nasopharyngeal swab for the detection of SARS-CoV-2 in symptomatic patients. *J Clin Microbiol* 58:e01946-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.01946-20>.
- Kojima N, Turner F, Slepnev V, Bacelar A, Deming L, Kodeboyina S, Klausner JD. 2020. Self-collected oral fluid and nasal swab specimens demonstrate comparable sensitivity to clinician-collected nasopharyngeal swab specimens for the detection of SARS-CoV-2. *Clin Infect Dis* <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1589>.
- Jamal AJ, Mozafarihashjin M, Coomes E, Powis J, Li AX, Paterson A, Anceva-Sami S, Barati S, Crowl G, Faheem A, Farooqi L, Khan S, Prost K, Poutanen S, Taylor M, Yip L, Zhong XZ, McGeer AJ, Mubareka S, Toronto Invasive Bacterial Diseases Network COVID-19 Investigators. 2020. Sensitivity of nasopharyngeal swabs and saliva for the detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clin Infect Dis* <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa848>.
- Leung EC, Chow VC, Lee MK, Lai RW. 2020. Deep throat saliva as an alternative diagnostic specimen type for the detection of SARS-CoV-2. *J Med Virol* <https://doi.org/10.1002/jmv.26258>.
- McCormick-Baw C, Morgan K, Gaffney D, Cazares Y, Jaworski K, Byrd A, Molberg K, Cavuoti D. 2020. Saliva as an alternate specimen source for detection of SARS-CoV-2 in symptomatic patients using Cepheid Xpert Xpress SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol* 58:e01109-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.01109-20>.
- Khurshid Z, Zohaib S, Joshi C, Moin SF, Zafar MS, Speicher DJ. 2020. Saliva as a non-invasive sample for the detection of SARS-CoV-2: a systematic review. *medRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.05.09.20096354>.
- Wyllie AL, Fournier J, Casanovas-Massana A, Campbell M, Tokuyama M, Vijayakumar P, Warren JL, Geng B, Muenker MC, Moore AJ, Vogels CBF, Petrone ME, Ott IM, Lu P, Venkataraman A, Lu-Culligan A, Klein J, Earnest R, Simonov M, Datta R, Handoko R, Naushad N, Sewanan LR, Valdez J, White EB, Lapidus S, Kalinich CC, Jiang X, Kim DJ, Kudo E, Linehan M, Mao T, Moriyama M, Oh JE, Park A, Silva J, Song E, Takahashi T, Taura M, Weizman OE, Wong P, Yang Y, Bermejo S, Odio CD, Omer SB, Dela Cruz CS, Farhadian S, Martinello RA, Iwasaki A, Grubaugh ND, Ko AI. 2020. Saliva or nasopharyngeal swab specimens for detection of SARS-CoV-2. *N Engl J Med* 383:1283–1286. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2016359>.
- Williams E, Bond K, Zhang B, Putland M, Williamson DA. 2020. Saliva as a noninvasive specimen for detection of SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol* 58:e00776-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00776-20>.
- Becker D, Sandoval E, Amin A, De Hoff P, Diets A, Leonetti N, Lim YW, Elliott C, Laurent L, Grzymalski J, Lu JT. 2020. Saliva is less sensitive than nasopharyngeal swabs for COVID-19 detection in the community setting. *medRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.05.11.20092338>.
- Torres M, Collins K, Corbit M, Ramirez M, Winters CR, Katz L, Ross M, Relkin N, Zhou W. 2020. Comparison of saliva and nasopharyngeal swab SARS-CoV-2 RT-qPCR testing in a community setting. *J Infect* <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.11.015>.
- Jefferson T, Spencer EA, Brasse J, Heneghan C. 2020. Viral cultures for COVID-19 infectious potential assessment—a systematic review. *Clin Infect Dis* <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1764>.
- Kuhn M. 2020. caret: classification and regression training. R package, version 6.0-86. <https://CRAN.R-project.org/package=caret>.
- Wickham H, Sievert C. 2016. ggplot2: elegant graphics for data analysis. Springer-Verlag, New York, NY.
- Basile K, McPhie K, Carter I, Alderson S, Rahman H, Donovan L, Kumar S, Tran T, Ko D, Sivaruban T, Ngo C, Toi C, O'Sullivan MV, Sintchenko V, Chen

- SC, Maddocks S, Dwyer DE, Kok J. 2020. Cell-based culture of SARS-CoV-2 informs infectivity and safe de-isolation assessments during COVID-19. *Clin Infect Dis* <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1579>.
18. Liu Y, Yan LM, Wan L, Xiang TX, Le A, Liu JM, Peiris M, Poon LLM, Zhang W. 2020. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *Lancet Infect Dis* 20:656–657. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30232-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30232-2).
19. Chau NVV, Lam VT, Dung NT, Yen LM, Minh NNQ, Hung LM, Ngoc NM, Dung NT, Man DNH, Nguyen LA, Nhat LTH, Nhu LNT, Ny NTH, Hong NTT, Kestelyn E, Dung NTP, Xuan TC, Hien TT, Thanh Phong N, Tu TNH, Geskus RB, Thanh TT, Thanh Truong N, Binh NT, Thuong TC, Thwaites G, Tan LV, OUCRU COVID-19 research group. 2020. The natural history and transmission potential of asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *Clin Infect Dis* 71:2679–2687. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa711>.
20. He X, Lau EHY, Wu P, Deng X, Wang J, Hao X, Lau YC, Wong JY, Guan Y, Tan X, Mo X, Chen Y, Liao B, Chen W, Hu F, Zhang Q, Zhong M, Wu Y, Zhao L, Zhang F, Cowling BJ, Li F, Leung GM. 2020. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat Med* 26:672–675. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0869-5>.
21. Zou L, Ruan F, Huang M, Liang L, Huang H, Hong Z, Yu J, Kang M, Song Y, Xia J, Guo Q, Song T, He J, Yen HL, Peiris M, Wu J. 2020. SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. *N Engl J Med* 382:1177–1179. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2001737>.
22. Chen JH, Yip CC, Poon RW, Chan KH, Cheng VC, Hung IF, Chan JF, Yuen KY, To KK. 2020. Evaluating the use of posterior oropharyngeal saliva in a point-of-care assay for the detection of SARS-CoV-2. *Emerg Microbes Infect* 9:1356–1359. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1775133>.
23. Pasomsab E, Watcharananan SP, Boonyawat K, Janchompoo P, Wongtabtim G, Suksuwan W, Sungkanuparph S, Phuphuakrat A. 2020. Saliva sample as a non-invasive specimen for the diagnosis of coronavirus disease 2019: a cross-sectional study. *Clin Microbiol Infect* <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.05.001>.



Performance of saliva specimens for the molecular detection of SARS-CoV-2 in the community setting: does sample collection method matter?

Supplemental Data

Figure S1. Flow chart of the study.

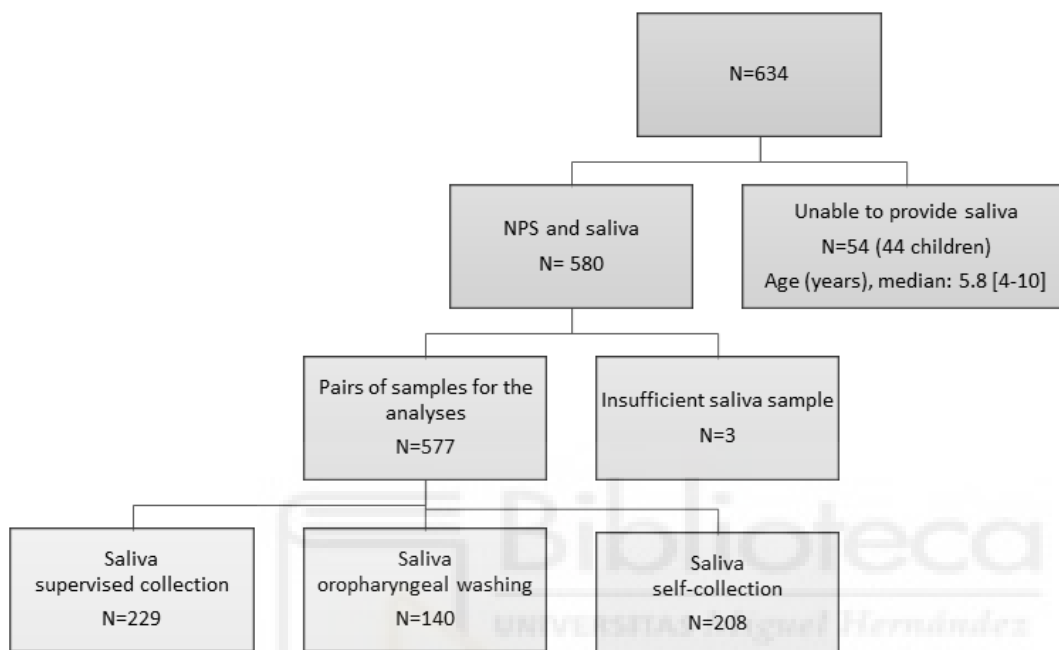
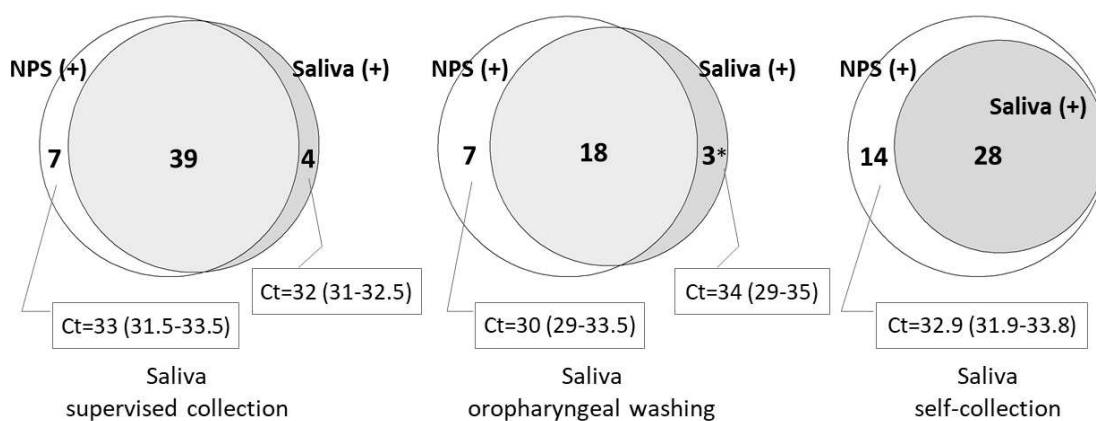
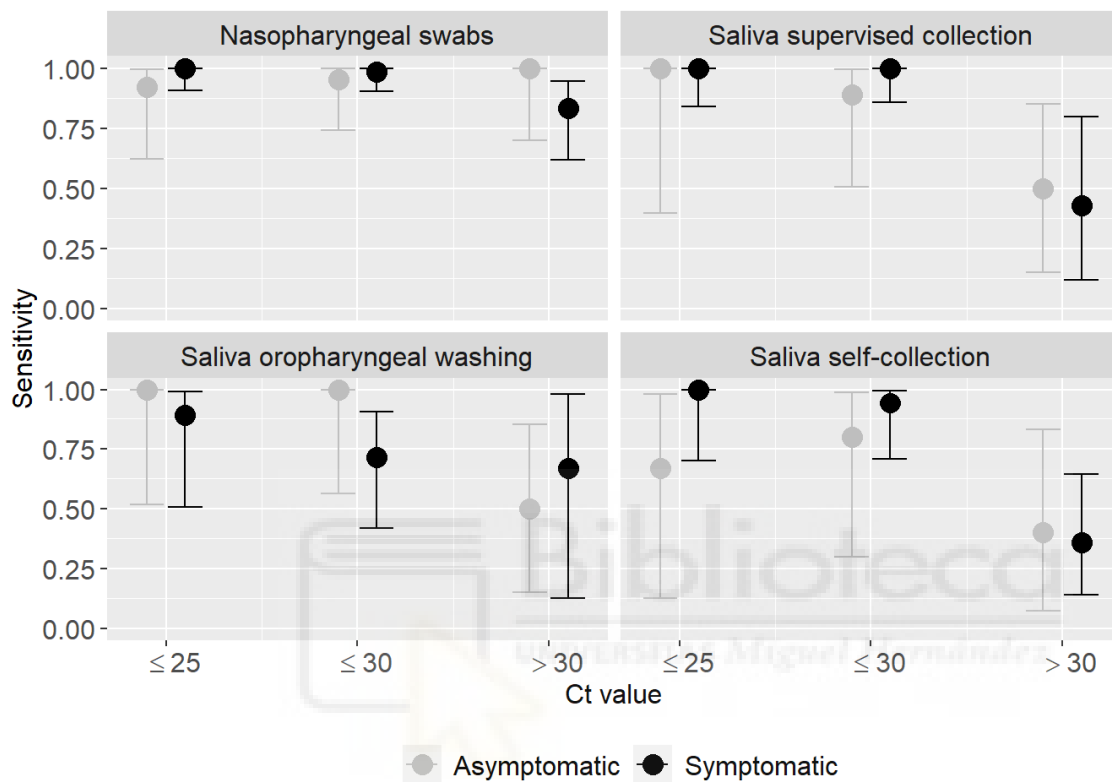


Figure S2. Comparison of SARS-CoV-2 detection by sample type and Ct value of discordant specimens.



*One positive saliva, with NPS negative confirmed six days later.

Figure S3. Sensitivity of the different specimens for SARS-CoV-2 detection according to Ct value and presence of symptoms.





Nasopharyngeal Panbio COVID-19 Antigen Performed at Point-of-Care Has a High Sensitivity in Symptomatic and Asymptomatic Patients With Higher Risk for Transmission and Older Age

Mar Masía,^{1,2} Marta Fernández-González,^{1P} Manuel Sánchez,³ Mar Carvajal,¹ José Alberto García,¹ Nieves Gonzalo-Jiménez,⁴ Victoria Ortiz de la Tabla,⁵ Vanesa Agulló,¹ Inmaculada Candela,⁶ Jorge Guijarro,⁷ José Antonio Gutiérrez,⁸ Carlos de Gregorio,³ and Félix Gutiérrez^{1,2}

¹Infectious Diseases Unit, Hospital General Universitario de Elche, Elche, Alicante, Spain, ²Clinical Medicine Department, Universidad Miguel Hernández, San Juan de Alicante, Spain, ³Department 20th Health Authority, Conselleria de Sanitat, Generalitat Valenciana, Elche, Alicante, Spain, ⁴Microbiology Service, Hospital General Universitario de Elche, Elche, Alicante, Spain, ⁵Microbiology Service, Hospital Universitario de San Juan, Alicante, Spain, ⁶Santa Pola Primary Care Center, Alicante, Spain, ⁷Altavix Primary Care Center, Elche, Alicante, Spain, ⁸Emergency Department, Hospital General Universitario de Elche, Elche, Alicante, Spain

Background. Performance of point-of-care tests in different clinical scenarios and on different samples remains undetermined. We comprehensively evaluated the performance of the nasopharyngeal Panbio COVID-19 Ag Rapid Test Device.

Methods. This is a prospective study that includes consecutive patients attending 3 primary care centers (PCCs) and an emergency department. The antigen test was performed at point-of-care in nasopharyngeal and nasal swabs and in saliva. Positive percent agreement (PPA) and negative percent agreement (NPA) were calculated with the reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assay as reference standard.

Results. Of 913 patients included, 296 (32.3%) were asymptomatic and 690 (75.6%) came from the PCC. Nasopharyngeal swabs were collected from 913 patients, nasal swabs were collected from 659 patients, and saliva was collected from 611 patients. The RT-PCR was positive in 196 (21.5%) nasopharyngeal samples (NPS). Overall, PPA (95% CI) in NPS was 60.5% (53.3–67.4), and it was lower in nasal swabs (44.7%) and saliva (23.1%). Test performance in NPS was largely dependent on the cycle threshold (Ct) in RT-PCR, with PPA of 94% for Ct ≤25 and 80% for Ct <30. In symptomatic patients, the PPA was 95% for Ct ≤25, 85% for Ct <30, and 89% for the symptom triad of fever, cough, and malaise. Performance was also dependent on age, with a PPA of 100% in symptomatic patients >50 years with Ct <25. In asymptomatic patients, the PPA was 86% for Ct <25. In all cases, NPA was 100%.

Conclusions. The nasopharyngeal Panbio COVID-19 Ag test performed at point-of-care has a good sensitivity in symptomatic patients with Ct <30 and older age. The test was useful to identify asymptomatic patients with lower Ct values.

Keywords. antigen; COVID-19; Panbio; point-of-care; SARS-CoV-2.

The rapid spread of the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) pandemic worldwide requires the urgent adoption of effective preventive measures. Early diagnosis and rapid isolation of infected people are central to contain disease transmission. Although real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) is currently the reference assay for the diagnosis of SARS-CoV-2 infection, novel rapid antigen tests have emerged with several potential key advantages over molecular methods [1]. In contrast to the RT-PCR,

the antigen test (1) is relatively inexpensive, simple to perform, and easy to interpret, (2) does not require infrastructure, and (3) enables obtaining point-of-care results within a few minutes. As a result, it allows immediate decisions about isolation and therapeutic interventions on infected individuals. Moreover, antigen tests are capable of identifying infected people early after infection, when viral loads are high and the likelihood of transmission is highest [2]. Despite the lower sensitivity when compared with the molecular assays, the possibility of repetitive testing with a low-cost procedure and the real-time detection of the most infective patients make the antigen a potentially high valuable test in terms of surveillance, to track and prevent the spread of the infection [3].

Information on the performance of the point-of-care SARS-CoV-2 antigen tests is limited. The sensitivity of the first-generation antigens is overall low [4]. In addition, most studies have been conducted in laboratory specimens, involved a relatively low number of samples, and the minority with available clinical data primarily included symptomatic patients [5–8]. To assess

Received 21 November 2020; editorial decision 26 January 2021; accepted 28 January 2021.

Correspondence: Mar Masía, MD, PhD, Universidad Miguel Hernández, Avda de la Universidad S/N, 03202, Elche, Alicante, Spain (mmasía@umh.es).

Open Forum Infectious Diseases®2021

© The Author(s) 2021. Published by Oxford University Press on behalf of Infectious Diseases Society of America. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs licence (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial reproduction and distribution of the work, in any medium, provided the original work is not altered or transformed in any way, and that the work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com
DOI: 10.1093/ofid/ofab059

the real performance of a point-of-care test, it should be used in real-life conditions, including consecutive patients, and obtain results on site. The uncertainties about the antigen are the accuracy of the test in asymptomatic patients and how it performs in additional clinical settings, such as childhood, or old age, among others. Another relevant question is whether a more convenient sample would be a suitable alternative for diagnosis. Antigen tests are currently authorized to be performed on nasopharyngeal (NP) or nasal swabs, which need to be collected by healthcare professionals. Because saliva can be self-collected, antigen assessment in this sample would facilitate large-scale testing.

The Panbio COVID-19 antigen Rapid Test Device (RTD) (Abbott Rapid Diagnostic Jena GmbH, Jena, Germany) has been recently marketed for the qualitative detection of SARS-CoV-2 antigen in human NP swab specimens, with high sensitivity and specificity. We evaluated the performance of this point-of-care test in real-life conditions, in 3 primary care centers (PCCs) and an emergency department (ED). We assessed the accuracy of the test in symptomatic and asymptomatic patients, in different clinical scenarios, and in NP, nasal, and saliva samples.

METHODS

Study Design, Setting, and Data Collection

A prospective study was conducted from September 15 to October 29, 2020 in 3 PCC and an ED. Consecutive patients, either with COVID-19 signs/symptoms or asymptomatic contacts attending the PCC, and a majority of symptomatic patients presenting to the ED were included in the study, and only patients who refused to participate were excluded. Demographic and clinical data from primary care patients were collected using a structured questionnaire. The questionnaire included information about 6 specific symptoms and their temporality and the number of days since the initiation of symptoms. Clinical data from patients who attended the ED were obtained from the electronic health records.

Patient Consent Statement

The patient's written consent was obtained. The design of the work was approved by the COVID-19 Institutional Committee of Hospital General Universitario de Elche (Spain).

Specimen Collection

At the PCC, patients were asked to fill out the questionnaire about symptoms and to repeatedly spit up to a minimum of 1 mL of saliva into a 100-mL sterile empty container. Then, a nasal swab from 1 nostril and 2 consecutive NP swabs (1 swab for each nostril) were obtained by a qualified nurse according to the recommended standard procedure. At the ED, 2 consecutive NP swabs, also with a different swab for each nostril, were obtained by a clinician.

Microbiological Procedures

Antigen Detection

Nasal swabs, 1 of the 2 NP swabs, and the saliva samples obtained at the PCC were tested onsite within minutes after collection for antigen detection. One of the NP swabs obtained at the ED was also analyzed onsite for antigen detection immediately after collection. The antigenic assessment in all the samples was performed using the Panbio COVID-19 Ag RTD, an immunochromatographic test with a membrane strip precoated with antibodies to the SARS CoV-2 nucleocapsid. The kit was used according to the manufacturer's instructions. In brief, nasal and NP swabs were immersed in 2 extraction tubes containing 300 μ L of buffer from the kit. A third swab was soaked in the saliva sample and then immersed in a third 300- μ L tube. The 3 tubes were ready to be applied to the corresponding antigen device.

Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Ribonucleic Acid Detection

The second NP swab was preserved in a 3-mL transport tube containing guanidine salt solution (Mole Bioscience, SUNGO Europe B.V., Amsterdam, Netherlands). After collection of all samples, NP specimens were transported daily by the same healthcare workers who collected the samples at the PCC to the clinical microbiology laboratory for immediate molecular analysis by RT-PCR. Nasopharyngeal samples (NPS) from the ED were also sent to the same microbiology laboratory. Nucleic acid extraction was performed using 300 μ L NP specimen on Chemagic 360 Nucleic Acid Purification Instrument (PerkinElmer España SL, Madrid, Spain). Then, 10 μ L eluate was used for real-time RT-PCR assay targeting the E-gene [LightMix Modular SARS-CoV (COVID19) E gene; TIB MOLBIOL, Berlin, Germany, distributed by Roche]. Testing was performed according to the manufacturer's guidelines on Cobas z 480 Analyzer (Roche, Basilea, Suiza).

Statistical Analyses

Continuous variables are expressed as median \pm 25th and 75th percentiles (Q1, Q3), and categorical variables are expressed as percentages. Wilcoxon or Student's *t* test was used to compare continuous variables, and the χ^2 or Fisher's exact test was used for categorical variables comparison. The percentage agreement (positive percent agreement [PPA], negative percent agreement [NPA], and overall predictive agreement) for Panbio antigen test in the NP, nasal, and saliva samples compared with the reference standard RT-PCR test in NP swab was calculated. Performance agreement was evaluated using Cohen's kappa coefficient. Performance was also evaluated in NPS stratifying by age, sex, the number of cycles of amplification in RT-PCR (cycle threshold [Ct]), and duration of symptoms. Multivariate logistic regression was performed to assess predictors of the sensitivity of the antigen test in symptomatic patients. The estimated

sample size for a sensitivity of at least 91.4% (according to the manufacturer), a precision of 2.5%, and a statistical power of 80% was 762 patients. For a specificity of at least 97%, sample size required was 377 patients.

RESULTS

During the study period, 913 patients were included; all of them had a NP swab for RT-PCR, 904 (99%) had a second NP swab for antigen test, 659 (72%) had a nasal swab, and 611 (67%) had a saliva sample collected. A total of 690 (75.6%) NP samples were collected from the PCC, and 223 (24.4%) were collected from the ED.

Clinical characteristics of the patients are shown in Table 1. Median (Q1–Q3) age was 40.6 (23.0–55.6) years, and 423 (46.3%) were men. The most common comorbidities were dyslipidemia in 80 (22.2%) patients, hypertension in 124 (17.0%), and diabetes in 60 (8.2%). There were 617 (67.6%) symptomatic patients and 296 (32.4%) were asymptomatic. Median (Q1–Q3) number of days from symptom onset was 3 (2–5) days, and the most frequent symptoms were cough (50.1%), followed by fever (46.8%), sore throat (31.9%), and nasal congestion (31.3%). Median (Q1–Q3) Ct was 24 (16–30); 22 (16–29) in symptomatic and 28 (21–32) in asymptomatic patients ($P = .012$); and 21 (15–27) in patients ≥ 50 years and 26 (18–31) in < 50 years ($P = .02$).

Performance of the Antigen Test by Type of Sample and Site of Care

There were 196 (21.5%) samples positive for SARS-CoV-2 by RT-PCR and 120 (13.1%) positive antigen results. Performance of the test by type of sample is shown in Figure 1 and Table 2. In NPS, the overall PPA and NPA of the antigen test were 60.5% (95% confidence interval [CI], 53.3%–67.4%) and 100% (95% CI, 99.3%–100%), respectively. In the saliva, the PPA was 23.1% (95% CI, 16.2–31.9), and in nasal samples the PPA was 44.7% (95% CI, 36.1%–53.6%).

By site of care, the PPA in NPS at the ED was 69.0% (95% CI, 55.3%–80.1%). At the PCC, the PPA was 56.9% (95% CI, 48.2%–65.3%) (Table 2).

Performance of the Antigen Test in Nasopharyngeal Samples by Polymerase Chain Reaction Cycle Threshold, Age, and Sex

The performance of the test by Ct in NPS is shown in Figure 2A. In the analysis including all patients, a gradual decline in sensitivity was observed with increasing Ct values, with a more prominent decrease from Ct > 28 . The PPA was 94% (95% CI, 85%–98%) for Ct ≤ 25 and 80% (95% CI, 67%–85%) for Ct < 30 .

Table 3 and Figure 2B show the performance of the antigen test according to age group. The PPA increased with increasing age, with lower sensitivity among children and young adults (PPA 38.1% [95% CI, 24.0%–54.3%] for 15–30 years) and higher sensitivity in older patients (PPA 72.4% [95% CI, 52.5%–86.6%] for ≥ 65 years).

No remarkable differences were found in the antigen test performance by sex. The PPA in men was 63.4% (95% CI, 53.1–72.6), and the PPA in women was 57.4% (95% CI, 46.8–67.5) (Table 3).

Performance of the Antigen Test in Nasopharyngeal Samples in Symptomatic Patients

A total of 617 (67.6%) patients presented with clinical symptoms. Median (Q1–Q3) age was 41.0 (24.0–56.3) years and 289 (46.8%) were men (Table 1). In 156 (25.3%) patients, the RT-PCR was positive in the NPS, and in 105 (17.2%) the antigen test was positive. The PPA (95% CI) in the NPS samples was 67.3% (59.3–74.5). The PPA by type of sample in symptomatic patients is shown in Figure 1.

The performance of the antigen test in NPS by Ct is shown in Figure 2A and Table 3. The sensitivity of the test decreased more slowly with increasing Ct in symptomatic patients than in the overall sample, but a faster decrease was again observed from Ct values > 28 . The PPA was 95% (95% CI, 87–98) for Ct ≤ 25 and 85% (77–91) for Ct < 30 . By age, the antigen test performance increased with increasing age, with a PPA of 79.3% (95% CI, 66.3–88.4) in symptomatic patients > 50 years.

Table 2b shows the performance of the antigen test in NPS by number of days with symptoms. The PPA was approximately 80% for a period of less than 7 days from symptom onset, and it fell during the following days.

The performance of the antigen test varied in relation to the characteristics of the symptoms. The highest sensitivity was observed for malaise and ageusia, with a PPA of 75% each, followed by sore throat with PPA of 73%, and cough, nasal congestion, and dyspnea, the 3 with PPA of 69%. The PPA for the triad of cough, fever, and malaise was 89%.

Figure 3 shows the performance of the antigen test according to the presence of symptoms, age, Ct, and days after symptoms onset. The highest PPA of the test was observed for Ct < 25 , for which the PPA was $> 90\%$ for age > 15 years; 100% for > 50 years; and 95% for duration of symptoms < 7 days.

A multivariate logistic regression was run to explore the independent factors associated with antigen test performance among symptomatic patients, including age, sex, Ct values, and duration of symptoms categorized into < 7 or ≥ 7 days. The model showed that the PPA was independently associated with age, with an odds ratio (OR) of 1.20 (95% CI, 1.03–1.40) for each 5-years-older period, duration of symptoms with an OR of 3.99 (1.22–13.06) for < 7 days, and inversely associated with the Ct, with an OR of 0.66 (95% CI, 0.57–0.76).

Performance of the Antigen Test in Nasopharyngeal Samples in Asymptomatic Patients

A total of 296 patients were asymptomatic, with median (Q1–Q3) age of 39.9 (20.4–52.5) years, and 134 (45.3%) were men.

Table 1. Clinical Characteristics of the Patients

Variable	All Patients N = 913	Symptomatic N = 617	Asymptomatic N = 296	P
Age (years) median (Q1–Q3)	40.6 (23–55.6)	41 (24–56.3)	39.9 (20.4–52.5)	.086
Sex (men)	423 (46.3)	289 (46.8)	134 (45.3)	.671
Dyslipidemia	80 (22.2)	63 (24.3)	17 (16.7)	.124
Hypertension	124 (17.0)	96 (19.0)	28 (12.4)	.033
Diabetes	60 (8.2)	49 (9.7)	11 (4.9)	.029
Cardiomyopathy	55 (7.6)	43 (8.5)	12 (5.3)	.171
Obesity	42 (5.8)	25 (5.1)	17 (7.6)	.228
COPD	25 (3.4)	20 (4.0)	5 (2.2)	.277
Active cancer	17 (2.3)	14 (2.8)	3 (1.3)	.295
Primary care center	690 (75.6)	416 (67.4)	274 (92.6)	<.001
Emergency department	223 (24.4)	201 (32.6)	22 (7.4)	<.001
Positive SARS-CoV-2 RNA ^a	196 (21.5)	156 (25.3)	40 (13.5)	<.001
Ct, median (Q1–Q3)	24 (16–30)	22 (16–29)	28 (21–32)	.012
Ct 0–20	78 (40.0)	68 (43.9)	10 (25.0)	.10
Ct 21–25	29 (14.9)	24 (15.5)	5 (12.5)	
Ct 26–30	40 (20.5)	28 (18.1)	12 (30.0)	
Ct 31–35	40 (20.5)	30 (19.4)	10 (25.0)	
Ct >35	8 (4.1)	5 (3.2)	3 (7.5)	
Positive antigen (any NP-nasal-saliva) result	120 (13.1)	106 (17.2)	14 (4.7)	<.001
Positive NP antigen result	118 (12.9)	105 (17.2)	13 (4.5)	<.001
No. of days with symptoms		3 (2–5)		
Cough		309 (50.1)		
Fever		289 (46.8)		
Sore throat		196 (31.9)		
Nasal congestion		193 (31.3)		
Dyspnea		115 (18.6)		
Anosmia/ageusia		53 (8.8)/44 (7.1)		
Others: malaise/headache		104 (17)/140 (23)		

Abbreviations: COPD, chronic obstructive pulmonary disease; Ct, cycle threshold of reverse-transcription polymerase chain reaction; NP, nasopharyngeal; RNA, ribonucleic acid; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. NOTE: Categorical variables are represented by number and (%).

^aPerformed on nasopharyngeal samples.

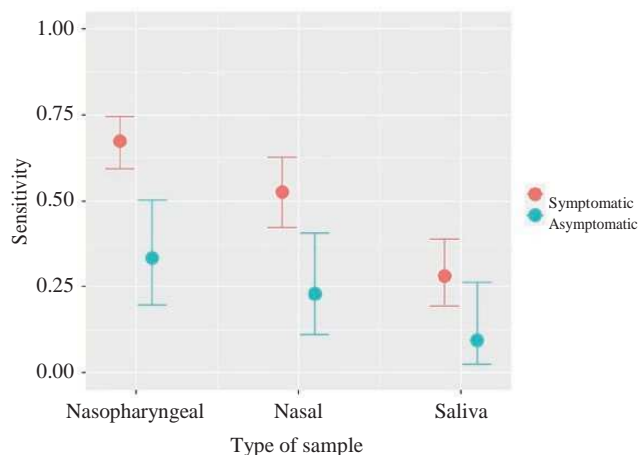


Figure 1. Performance of Panbio COVID-19 Ag Rapid Test Device by type of sample.

The PPA by type of sample in asymptomatic patients is shown in Figure 1. A total of 39 (13.2%) patients had a positive RT-PCR in the NPS, and 13 (4.4%) had a positive NP antigen test. The PPA in the NPS was 33.3% (95% CI, 19.6–50.3), and Cohen’s kappa coefficient was 0.46 (95% CI, 0.30–0.63).

Figures 2A and 3A and Table 3 show the performance of the antigen test by Ct and age in asymptomatic patients. Again, a decrease in the sensitivity was observed with increasing Ct, but it was much more pronounced than in symptomatic patients, mainly from Ct >20 (Figure 2A). However, for low Ct, the sensitivity was high for all age groups, with an overall PPA of 86% (95% CI, 56–97) for Ct ≤25.

DISCUSSION

We evaluated a recent generation point-of-care antigen test for SARS-CoV-2 in real-life conditions in a large population of consecutive patients and onsite, where the test was conceived to be performed. Our data show that the sensitivity of the antigen test is largely dependent on the Ct values, age, and the presence and duration of symptoms. The sensitivity of the antigen test was highest in symptomatic patients older than 50 years and

with Ct values associated with an increased risk of infectivity, reaching 100% in this scenario. Although the performance of the test was overall lower in asymptomatic patients, again the antigen identified with a sensitivity higher than 85% those with lower Ct, and therefore with higher contagious risk. In all cases, the specificity of the antigen test was approximately 100%. Finally, although the saliva would facilitate mass testing for surveillance, the low sensitivity of the antigen in this specimen does not support its use as an alternative sample.

In contrast to SARS-CoV, SARS-CoV-2 infection is associated with high levels of viral shedding at the initial stages of the infection in the upper respiratory tract, which facilitates detecting the virus during the most infectious period. The availability of a rapid point-of-care test for the diagnosis allows testers to adopt immediate and real-time decisions, which is a clear advantage over the RT-PCR in controlling the spread of the infection. Although the antigen test showed an overall lower sensitivity than the RT-PCR in our study, and that reported by the manufacturer, the test was highly accurate in symptomatic patients exhibiting lower Ct values, with a sensitivity greater than 95% for Ct of 25 or lower and at least 85% for Ct of less than 30. These results are in agreement with the sensitivity described with BinaxNOW COVID-19 Ag CARD, with 100% of samples with viral loads equivalent to Ct of 29–30 being detected by the rapid antigen test [9]. High SARS-CoV-2 viral load has been associated with severity of disease and mortality [10, 11], and several studies support a correlation of Ct values with infectivity, as defined by growth in cell culture. Although breakpoints fluctuate among different studies [12–15], a diagnostic Ct value of RT-PCR equal to or greater than 33 was associated with no isolation of SARS-CoV-2 using cell-based cultures, nor with active viral replication [12, 13]. Other studies report no SARS-CoV-2 recovery in cell culture with Ct values higher than 29.5 [14], or even higher than 24, with a decrease by 32% of positive cultures for each unit of increase in Ct [15]. Although the correlation between viral growth and infectivity needs to be confirmed, our data suggest that the point-of-care antigen test is useful to detect most SARS-CoV-2-infected symptomatic patients and to identify those with significant transmission risk.

Table 2. Performance of the Panbio COVID-19 Antigen Rapid Test Device by Type of Sample and Site of Care

Variable	TP	FP	TN	FN	PPA (95% CI)	NPA (95% CI)	OPA (95% CI)	Kappa (95% CI)
Type of Sample								
NP sample	118	0	709	77	60.5% (53.3–67.4)	100% (99.3–100)	91.5% (89.4–93.2)	0.71 (0.65–0.77)
Nasal sample	59	0	527	73	44.7% (36.1–53.6)	100% (99.1–100)	88.9% (86.2–91.2)	0.56 (0.48–0.65)
Saliva sample	28	0	490	93	23.1% (16.2–31.9)	100% (99–100)	84.8% (81.6–87.6)	0.33 (0.23–0.42)
Site of Care								
Primary care	78	0	544	59	56.9% (48.2–65.3)	100% (99.1–100)	91.3% (88.9–93.3)	0.68 (0.60–0.75)
Emergency department	40	0	165	18	69% (55.3–80.1)	100% (97.2–100)	91.9% (87.3–95)	0.77 (0.67–0.87)

Abbreviations: CI, confidence interval; COVID-19, coronavirus disease 2019; FN, false negative; FP, false positive; NP, nasopharyngeal; NPA, negative percent agreement; OPA, overall pre- dictive agreement; PPA, positive percent agreement; TN, true negative; TP, true positive; y, year.

NOTE: Unless specified, all analyses have been performed in NP samples.

Artículo II

Another factor influencing the performance of the antigen test was the duration of symptoms. As specified by the manufacturer and also previously reported [6, 16], we found a higher sensitivity of the test within a period of less than 7 days from the initiation of symptoms.

Because most SARS-CoV-2 infections are asymptomatic, the performance of the antigen test in this scenario needs to be established, and this information is key for strategies aimed at preventing the spread of the infection at the community level. Our study shows that the sensitivity was poorer when compared with that of patients with symptoms. Identical to symptomatic

participants, the sensitivity was highly dependent on the Ct, and we found a PPA higher than 85% for $Ct \leq 25$. Asymptomatic SARS-CoV-2 transmission has been previously reported [17, 18], but the secondary attack rate from either asymptomatic or presymptomatic patients was found to be lower (in a meta-analysis) compared with that of patients with symptoms [19] and to be as low as 0.3%–0.6% [20]. In presymptomatic patients, SARS-CoV-2 growth in viral culture was rarely observed with a Ct above 25 [17]. Although the performance of the test was inferior in asymptomatic individuals, the increase in sensitivity observed with lower Ct coupled with the lower transmission

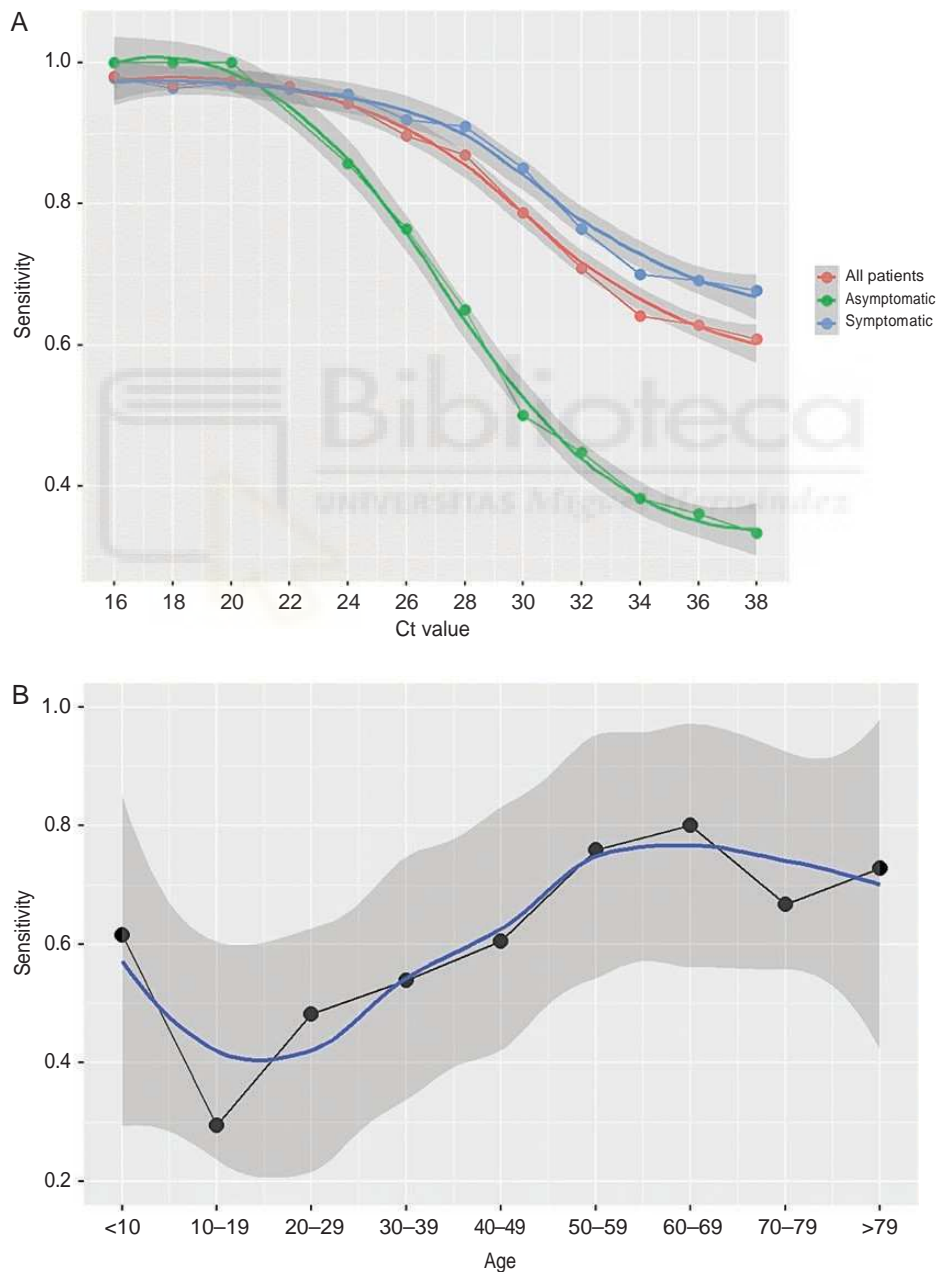


Figure 2. Performance of nasopharyngeal Panbio COVID-19 Ag Rapid Test Device in different scenarios. (A) Performance according to cycle threshold (Ct) values. (B) Performance according to age.

Table 3. Performance of the Panbio COVID-19 Antigen Rapid Test Device in Nasopharyngeal Samples According to Different Factors

Variable	TP	FP	TN	FN	PPA (95% CI)	NPA (95% CI)	OPA (95% CI)	Kappa (95% CI)
Sex								
Men	64	0	317	37	63.4% (53.1–72.6)	100% (98.5–100)	91.1% (87.9–93.6)	0.72 (0.64–0.81)
Women	54	0	392	40	57.4% (46.8–67.5)	100% (98.8–100)	91.8% (88.9–94)	0.69 (0.60–0.77)
Age								
≤14 y	10	0	107	8	55.6% (31.3–77.6)	100% (95.7–100)	93.6% (87.4–97)	0.68 (0.48–0.88)
15–30 y	16	0	145	26	38.1% (24–54.3)	100% (96.8–100)	86.1% (80.1–90.6)	0.49 (0.33–0.65)
31–50 y	42	0	244	27	60.9% (48.4–72.2)	100% (98.1–100)	91.4% (87.6–94.1)	0.71 (0.61–0.81)
51–65 y	29	0	111	8	78.4% (61.3–89.6)	100% (95.8–100)	94.6% (89.3–97.5)	0.85 (0.74–0.95)
>65 y	21	0	102	8	72.4% (52.5–86.6)	100% (95.5–100)	93.9% (87.9–97.1)	0.80 (0.67–0.93)
Symptomatic								
Overall	105	0	456	51	67.3% (59.3–74.5)	100% (99–100)	91.7% (89.1–93.7)	0.75 (0.69–0.82)
≤3 DSO	49	0	273	13	79% (66.5–87.9)	100% (98.3–100)	96.1% (93.3–97.8)	0.86 (0.79–0.93)
≤4 DSO	65	0	334	18	78.3% (67.6–86.3)	100% (98.6–100)	95.7% (93.1–97.3)	0.85 (0.79–0.92)
≤5 DSO	76	0	364	22	77.6% (67.8–85.1)	100% (98.7–100)	95.2% (92.8–96.9)	0.85 (0.78–0.91)
≤6 DSO	81	0	382	23	77.9% (68.5–85.2)	100% (98.8–100)	95.3% (92.9–96.9)	0.85 (0.79–0.91)
≥7 DSO	24	0	74	28	46.2% (32.5–60.4)	100% (93.9–100)	77.8% (69.3–84.5)	0.50 (0.36–0.64)
Ct ≤25	87	0	0	5	95% (87–98)			
Ct ≤30	102	0	0	18	85% (77–91)			
Ct ≤35	105	0	0	45	70% (62–77)			
Asymptomatic								
Overall	13	0	253	26	33.3% (19.6–50.3)	100% (98.1–100)	91.1% (87.1–94)	0.46 (0.30–0.63)
Ct ≤25	12	0	0	2	86% (56–97)			
Ct ≤30	13	0	0	13	50% (32–68)			
Ct ≤35	13	0	0	23	36% (21–54)			

Abbreviations: CI, confidence interval; COVID-19, coronavirus disease 2019; Ct, cycle threshold of reverse-transcription polymerase chain reaction; DSO, days from symptom onset; FN, false negative; FP, false positive; PPA, positive percent agreement; NPA, negative percent agreement; OPA, overall predictive agreement; TN, true negative; TP, true positive; y, year.

NOTE: Unless specified, all analyses have been performed in nasopharyngeal samples.

risk described within this group could make the antigen a potentially helpful tool to identify those with infective risk among asymptomatic patients. Similar to other studies [21], because we did not follow up with patients, we cannot distinguish the proportion of asymptomatic SARS-CoV-2-infected individuals who remained asymptomatic throughout from those who were presymptomatic and developed symptoms later in the course of the infection. The latter patients may have the chance to be detected by the test in ulterior examinations, thereby increasing the sensitivity of an assay that allows repeated testing because of its inexpensiveness and simplicity.

In addition to the viral load, the sensitivity of the antigen test was highly dependent on age. We found that older patients showed the best antigen test performance, a finding that was not previously described. Younger children showed the poorest antigen test performance, and there was a gradual increase in the sensitivity of the test with age, with the highest values in older patients. Several factors might explain this finding. Children showed less cooperation or even resistance during the collection of the NPS. Other factors such as temporality of symptoms or the higher Ct values among younger patients might also have played a role. However, our study showed that age was associated with the antigen test performance independently of the Ct and duration of symptoms, a finding that merits further investigation.

We explored the performance of the antigen test in alternative locations to the nasopharynx (recommended by the manufacturer), which could be more useful for surveillance, such as the nose or saliva. Because saliva can be self-collected, this sample would be the most advantageous if mass testing was considered with the point-of-care antigen test. Saliva has additionally shown to be a suitable alternative sample to NP swab for SARS-CoV-2 detection by RT-PCR [22]. Unfortunately, our study shows that the sensitivity of the point-of-care antigen test is low in the saliva. Different factors could be implicated in the lower sensitivity, including the dilution effect of the extraction buffer, lower viral shedding in the saliva, inadequate quality of the sample collected, etc. The same result occurred with the nasal swabs, where the test performance was not satisfactory.

Limitations of the study include (1) the lack of statistical power for the analysis of the test performance in specific subgroups, especially in asymptomatic patients, in whom sensitivity according to Ct ranges might not be accurate due to small sample sizes, and (2) the incomplete information about the number of days since the risk contact in asymptomatic patients. The strengths of our study are (1) the real-life conditions in which the antigen test has been used to assess its true performance, (2) the inclusion of consecutive

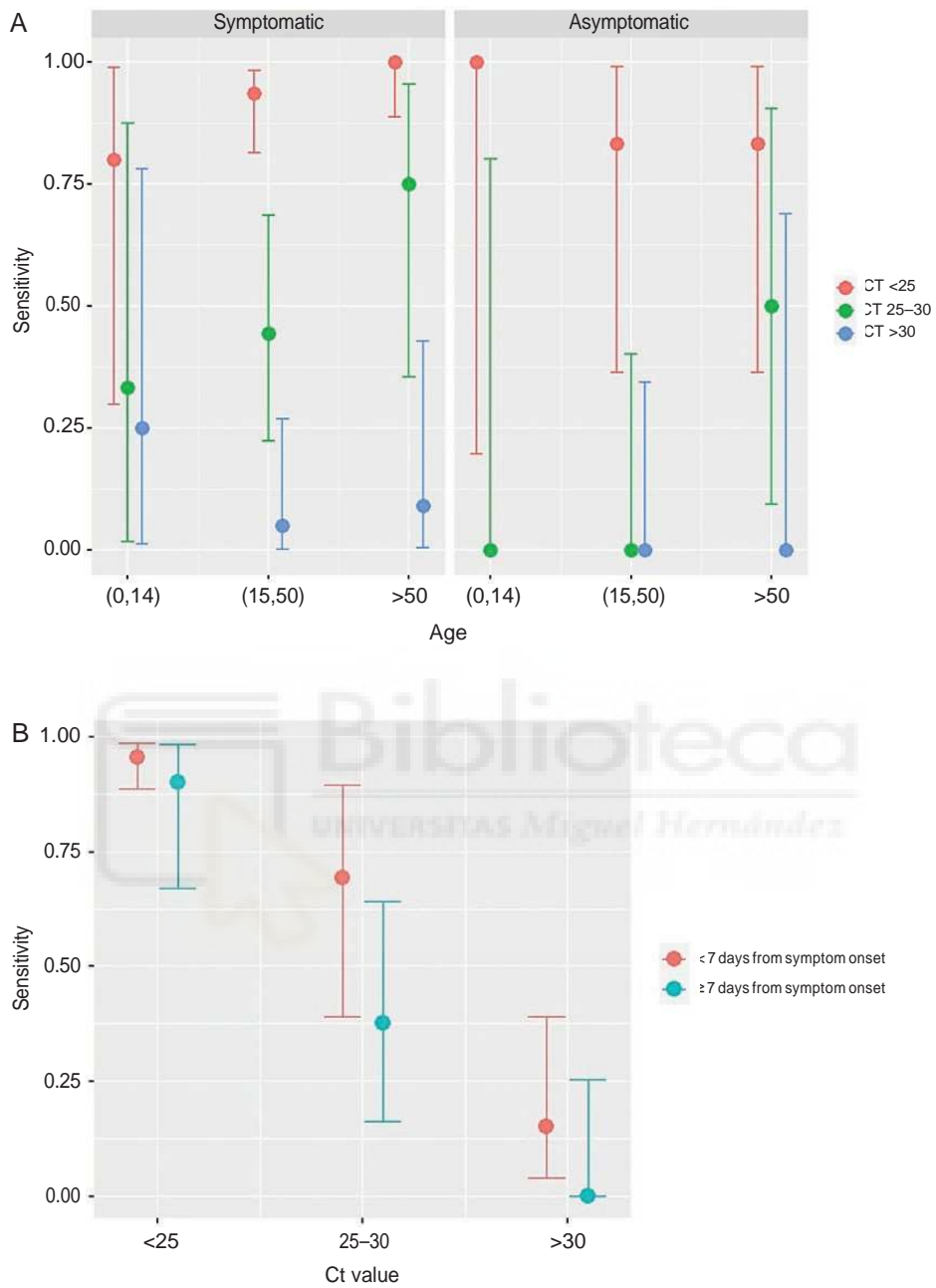


Figure 3. Performance of nasopharyngeal Panbio COVID-19 Ag Rapid Test Device after stratification for different factors. (A) Performance stratified by the presence of symptoms, age, and cycle threshold (Ct) values. (B) Performance stratified by symptom duration and age.

unselected patients, which allowed us to analyze how it performs in diverse clinical scenarios, and (3) the onsite execution of the test.

CONCLUSIONS

In conclusion, the sensitivity of the NP Panbio COVID-19 antigen RDT is closely related to the Ct values, age, and the presence and duration of symptoms. The test performance is optimal in symptomatic patients older than 50 years with viral loads linked with infectivity, and in asymptomatic patients the test was useful to identify those with lower Ct values. The saliva was not shown to be a suitable alternative sample for antigen detection.

Acknowledgments

Financial support. This work was supported by the RD16/0025/0038 project as a part of the Plan Nacional Research + Development + Innovation (R+D+I) and cofinanced by Instituto de Salud Carlos III - Subdirección General de Evaluación y Fondo Europeo de Desarrollo Regional; Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigaciones Sanitarias (Grant Numbers PI16/01740, PI18/01861; CM 19/00160, COV20-00005).

Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflicts of interest. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest

Members of the CoVid19-Elx-Rapid diagnostic Tests Study Group

Félix Gutiérrez, Mar Masiá, Sergio Padilla, Guillermo Telenti, Lucía Guillén, Javier García-Abellán, Cristina Bas, María Andreo, Fernando Lidón, Vladimir Ospino, José López, Marta Fernández, Vanesa Agulló, Gabriel Estañ, Javier García, Cristina Martínez, Leticia Alonso, Joan Sanchís, Ángela Botella, Paula Mascarell, María Selene Falcón, Sandra Ruiz, José Carlos Asenjo, Carolina Ding, Mar Carvajal, Alba de la Rica, Inmaculada Candela, Jorge Guijarro, Cristina la Moneda, Cristina Jara, Raquel Mora, Juan Manuel Quinto, Sergio Ros, Daniel Canal, Pascual Pérez, Francisco Carrasco, Carolina Garrido, Carlos Gosálbez, Jaime Sastre, Manuel Sánchez, Carlos de Gregorio, Juan Navarro, Andrés Navarro, Nieves Gonzalo, Clara Pérez, Adoración Alcalá, José Pastor, José Luis Rincón, Montserrat Ruiz, and Juan Antonio Gutiérrez .

References

1. La Marca A, Capuzzo M, Paglia T, et al. Testing for SARS-CoV-2 (COVID-19): a systematic review and clinical guide to molecular and serological in-vitro diagnostic assays. *Reprod Biomed Online* **2020**; 41:483–99.
2. He X, Lau EHY, Wu P, et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat Med* **2020**; 26:672–5.
3. Mina MJ, Parker R, Larremore DB. Rethinking covid-19 test sensitivity—a strategy for containment. *N Engl J Med* **2020**; 383:e120.
4. Dinnes J, Deeks JJ, Adriano A, et al.; Cochrane COVID-19 Diagnostic Test Accuracy Group. Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Cochrane Database Syst Rev* **2020**; 8:CD013705.
5. Young S, Taylor SN, Cammarata CL, et al. Clinical evaluation of BD Veritor SARS-CoV-2 point-of-care test performance compared to PCR-based testing and versus the Sofia 2 SARS antigen point-of-care test. *J Clin Microbiol* **2020**; 59:e02338–20.
6. Linares M, Pérez-Tanoira R, Carrero A, et al. Panbio antigen rapid test is reliable to diagnose SARS-CoV-2 infection in the first 7 days after the onset of symptoms. *J Clin Virol* **2020**; 133:104659.
7. Blairon L, Wilmet A, Beukinga I, Tré-Hardy M. Implementation of rapid SARS-CoV-2 antigenic testing in a laboratory without access to molecular methods: experiences of a general hospital. *J Clin Virol* **2020**; 129:104472.
8. Lambert-Niclot S, Cuffel A, Le Pape S, et al. Evaluation of a rapid diagnostic assay for detection of SARS-CoV-2 antigen in nasopharyngeal swabs. *J Clin Microbiol* **2020**; 58:e00977-20.
9. Perchetti GA, Huang ML, Mills MG, et al. Analytical sensitivity of the Abbott BinaxNOW COVID-19 Ag CARD. *J Clin Microbiol* **2020**; doi:10.1128/JCM.02880-20
10. Zheng S, Fan J, Yu F, et al. Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January–March 2020: retrospective cohort study. *BMJ* **2020**; 369:m1443.
11. Pujadas E, Chaudhry F, McBride R, et al. SARS-CoV-2 viral load predicts COVID-19 mortality. *Lancet Respir Med* **2020**; 8:e70.
12. La Scola B, Le Bideau M, Andreani J, et al. Viral RNA load as determined by cell culture as a management tool for discharge of SARS-CoV-2 patients from infectious disease wards. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2020**; 39:1059–61.
13. Basile K, McPhie K, Carter I, et al. Cell-based culture of SARS-CoV-2 informs infectivity and safe de-isolation assessments during COVID-19. *Clin Infect Dis* **2020**; doi:10.1093/cid/ciaa1579
14. Gniazdowski V, Morris CP, Wohl S, et al. Repeat COVID-19 molecular testing: correlation of SARS-CoV-2 culture with molecular assays and cycle thresholds. *Clin Infect Dis* **2020**.
15. Bullard J, Dust K, Funk D, et al. Predicting infectious SARS-CoV-2 from diagnostic samples. *Clin Infect Dis* **2020**.
16. Corman VM, Haage VC, Bleicker T, et al. Comparison of seven commercial SARS-CoV-2 rapid point-of-care antigen tests [preprint]. medRxiv doi: 10.1101/2020.11.12.20230292.
17. Arons MM, Hatfield KM, Reddy SC, et al.; Public Health–Seattle and King County and CDC COVID-19 Investigation Team. Presymptomatic SARS-CoV-2 infections and transmission in a skilled nursing facility. *N Engl J Med* **2020**; 382:2081–90.
18. Chau NVV, Thanh Lam V, Thanh Dung N, et al. The natural history and transmission potential of asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *Clin Infect Dis* **2020**; 71:2679–87.
19. Buitrago-García D, Egli-Gany D, Counotte MJ, et al. Occurrence and transmission potential of asymptomatic and presymptomatic SARS-CoV-2 infections: a living systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* **2020**; 17:e1003346.
20. Luo L, Liu D, Liao X, et al. Contact settings and risk for transmission in 3410 close contacts of patients with COVID-19 in Guangzhou, China: a prospective cohort study. *Ann Intern Med* **2020**; 173:879–87.
21. Oran DP, Topol EJ. Prevalence of asymptomatic SARS-CoV-2 infection: a narrative review. *Ann Intern Med* **2020**; 173:362–7.
22. Azzi L, Carcano G, Gianfagna F, et al. Saliva is a reliable tool to detect SARS-CoV-2. *J Infect* **2020**; 81:e45–50.



Evaluation of the rapid antigen test Panbio COVID-19 in saliva and nasal swabs in a population-based point-of-care study

Dear Editor,

Recent articles in this Journal have described the usefulness of saliva to detect SARS-CoV-2 infection through real-time reverse transcription polymerase chain reaction (rRT-PCR) [1,2]. We analyzed the performance of antigen-detecting rapid diagnostic tests (Ag-RDT) in saliva and nasal samples.

Ag-RDT directly identify SARS-CoV-2 proteins produced by replicating virus in respiratory secretions [3]. In contrast to the reference nucleic acid amplification tests (NAAT), such as rRT-PCR, the Ag-RDT are relatively inexpensive, simple to perform, do not require infrastructure, and enable obtaining point-of-care results within a few minutes [4]. Accordingly, despite being less sensitive than NAAT, Ag-RDT are more advantageous for guiding patient management at point-of-care, repeat testing, and timely large-scale public health decisions to prevent transmission [5,6]. Panbio COVID-19 Ag-RDT (Abbott Rapid Diagnostic Jena GmbH, Jena, Germany) is a recent generation, highly sensitive and specific antigen test for the qualitative detection of SARS-CoV-2 antigen in human nasopharyngeal swab (NPS) specimens. Because obtaining a

NPS requires trained healthcare professionals and a personal protective equipment (PPE), availability of a simpler and accurate alternative sample that could even be self-collected, like nasal swab (NS) or saliva, would further ease the procedure and allow large-scale testing. We evaluated the performance of Panbio COVID-19 Ag-RDT in NS and saliva specimens compared with rRT-PCR in NPS in a large prospective study conducted in three primary care centers between 15th September and 29th October 2020. Consecutive adults and children, either with COVID-19 signs/symptoms or asymptomatic contacts, were included. Informed consent was obtained from all the patients, and the study was approved by the Hospital General Universitario de Elche COVID-19 Institutional Advisory Board. Patients were asked to fill a questionnaire about symptoms and to collect saliva into a 100 ml sterile empty container. Then, a NS and two consecutive NPS were obtained by a qualified nurse according to the recommended standard procedure. The antigen kit was used according to the manufacturer's instructions. rRT-PCR testing was performed according to the manufacturer's guidelines on Cobas z 480 Analyzer (Roche, Basilea, Suiza). Positive and negative percent agreement (PPA, NPA) were calculated for Panbio antigen test in the NPS, NS and saliva samples compared to the rRT-PCR test in NPS. The study included 659 patients with NS samples, of whom

Table 1
Performance of the Panbio COVID-19 antigen Rapid Test Device.

Overall	TP	FP	TN	FN	PPA (95% CI)	NPA (95% CI)
NP sample	76	1	519	56	57.3% (48.3–65.8)	99.8% (98.8–100)
Nasal sample	59	0	527	73	44.7% (36.1–53.6)	100% (99.1–100)
Saliva sample	28	0	489	93	23.1% (16.2–31.9)	100% (99–100)
Nasal+saliva	60	0	489	61	49.6% (40.4–58.8)	100% (99–100)
Nasal sample						
Symptomatic	51	0	297	46	52.6% (42.2–62.7)	100% (98.4–100)
Ct ≤ 25	43	0	0	12	78% (65–88)	
Ct ≤ 30	48	0	0	25	66% (54–76)	
Ct ≤ 35	51	0	0	43	54% (44–64)	
Asymptomatic	8	0	230	27	22.9% (11–40.6)	100% (98–100)
Ct ≤ 25	8	0	0	5	62% (32–85)	
Ct ≤ 30	8	0	0	15	35% (17–57)	
Ct ≤ 35	8	0	0	24	25% (0–69)	
Saliva sample						
Symptomatic	25	0	277	64	28.1% (19.3–38.8)	100% (98.3–100)
Ct ≤ 25	21	0	0	30	41% (28–56)	
Ct ≤ 30	25	0	0	42	37% (26–50)	
Ct ≤ 35	25	0	0	61	29% (20–40)	
Asymptomatic	3	0	212	29	9.4% (2.5–2.6)	100% (97.8–100)
Ct ≤ 25	3	0	0	9	25% (7–57)	
Ct ≤ 30	3	0	0	17	15% (4–39)	
Ct ≤ 35	3	0	0	26	10% (3–28)	
Nasal+saliva						
Symptomatic	55	0	277	37	58.4% (47.5–68.6)	100% (98.3–100)
Ct ≤ 25	45	0	0	8	85% (72–93)	
Ct ≤ 30	52	0	0	18	74% (62–84)	
Ct ≤ 35	55	0	0	34	62% (51–72)	
Asymptomatic	9	0	212	24	27.3% (13.9–45.8)	100% (97.8–100)
Ct ≤ 25	9	0	0	4	69% (39–90)	
Ct ≤ 30	9	0	0	12	43% (23–66)	
Ct ≤ 35	9	0	0	21	30% (0–69)	

Unless specified, all analyses have been performed in nasopharyngeal samples. TP, true positive; FP, false positive; TN, true negative; FN, false negative; PPA, positive percent agreement; NPA, negative percent agreement; NP, nasopharyngeal; Ct, cycle threshold of RT-PCR.

610 (92.6%) had a saliva sample. 265 (40.2%) patients were asymptomatic and 394 (59.8%) had symptoms, with median (Q1-Q3) duration of 3 (2–5) days. Median (Q1-Q3) age was 38 (21–49.8) years, 76 (11.5%) had ≤ 14 years, 45 (7.6%) > 65 years, 372 (56.4%) were women, and 157 (23.8%) had a comorbid condition, the most frequent hypertension in 46 (7%), dyslipidemia in 39 (5.9%), obesity in 29 (3.2%) and diabetes in 21 (4.4%) patients. rRT-PCR was positive in NPS in 132 (20%) patients, with median (Q1-Q3) cycle threshold (Ct) of rRT-PCR of 24 (17.6–31). Table 1 shows the performance of Ag-RDT in NS, saliva and NS/saliva. Ag-RDT was positive in 76 (11.7%), 59 (9%), 28 (4.6%) and 60 (9.1%) NPS, NS, saliva and any of NS or saliva (NS/saliva) samples, respectively. Median (Q1-Q3) Ct value in NPS of antigen-positive NS samples was 17 (14–21.5) and of antigen-negative NS samples 29.5 (25.6–33); and 17.9 (15.8–19.3) and 28 (19.6–32) in antigen-positive and antigen-negative saliva samples, respectively. The PPA (95% CI) was 57.3% (48.3–65.8) in NPS, 44.7% (36.1–53.6) in NS, 23.1% (16.2–31.9) in saliva, and 49.6% (40.4–58.8) in NS/saliva. In all cases, NPA was 100%. Ag-RDT performance was dependent on the Ct values and the presence of symptoms (Fig. 1A-C). For symptomatic patients with Ct < 25, the PPA (95% CI) was 78% (65–88) in NS, 41% (28–56) in saliva and 85% (72–93) in NS/saliva samples. Ag-RDT performed better with duration of symptoms < 7 days (Fig. 1D). The best test performance was observed for NS/saliva in symptomatic patients with < 7 days and Ct ≤ 25 , with PPA (95% CI) of 92% (78–98), and 85.1% (71.1–93.3) for Ct ≤ 30 . In NS, PPA was 87.8% (72.9–95.4) and 79.6% (65.2–89.3) for Ct ≤ 25 and Ct ≤ 30 , respectively, and < 7 days with symptoms. Symptoms associated with higher sensitivity of the Ag-RDT in NS/saliva samples were sore throat, with PPA (95% CI) of 69% (49–84), and ageusia with 66% (12.5–98.2). Results from this large study show that the overall sensitivity of Panbio Ag-RDT was lower in NS and saliva than in NPS, particularly in asymptomatic patients, although the specificity was 100% in all samples. The same as with Ag-RDT in NPS, sensitivity was highly dependent on the Ct values and the presence and duration of symptoms [7]. In NS samples, the sensitivity in symptomatic patients with Ct ≤ 30 and duration of symptoms < 7 days met the minimum test performance requirements to be adequate for the diagnosis of SARS-CoV-2 infection [5], although the greatest performance was observed with the combination of NS and saliva samples. Therefore, although the saliva alone did not show a satisfactory performance, it added sensitivity to the NS for SARS-CoV-2 diagnosis. Infectivity risk has been associated with Ct values and duration of symptoms, with no viral growth observed in samples with PCR Ct values > 25–30 [8,9], and symptom duration > 8 days [9,10]. Consequently, the contagious risk of symptomatic patients not detected by the Ag-RDT in NS/saliva samples may be low. In addition to self-collection, NS and saliva samples allow performing the test without safe isolation conditions requirement to avoid propagation, thereby widening the settings where the test can be performed, and facilitating the procedure in children since it causes much less discomfort. Moreover, the same diagnostic kit could even be used to analyze both samples, through insertion of the NS in the saliva specimen. In conclusion, because of the low performance observed in asymptomatic patients, NS and saliva samples are not good options for screening or surveillance of SARS-CoV-2 with Ag-RDT. However, in settings with no availability of PPE or trained personnel, or with no safe conditions for the Ag-RDT procedure,

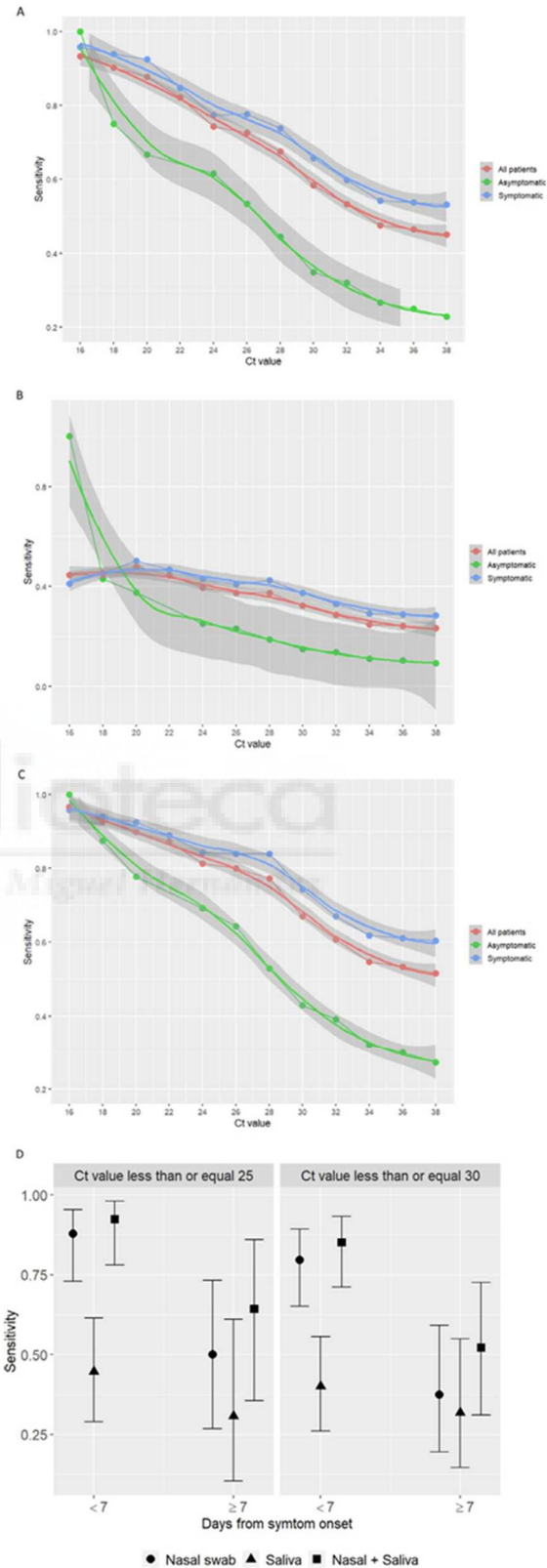


Fig. 1. Performance of Panbio COVID-19 antigen Rapid Test Device in nasal, saliva and nasal+saliva samples according to the presence of symptoms and cycle threshold values. A: Performance in nasal samples. B: Performance in saliva samples. C: Performance in nasal + saliva samples. D: Performance in symptomatic patients according to cycle threshold values and days from symptom onset.

the combination of saliva and nasal samples could be a suitable alternative to the NPS for the point-of-care diagnosis of symptomatic patients with SARS-CoV-2 infection.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgements

Members of the COVID19-Elx-Rapid Diagnostic Tests Study Group

Félix Gutiérrez, Mar Masía, Sergio Padilla, Guillermo Telenti, Lucía Guillen, Cristina Bas, María Andreo, Fernando Lidón, Vladimir Ospino, José López, Marta Fernández, Vanesa Agulló, Gabriel Estañ, Javier García, Cristina Martínez, Leticia Alonso, Joan Sanchís, Ángela Botella, Paula Mascarell, María Selene Falcón, Sandra Ruiz, José Carlos Asenjo, Carolina Ding, Mar Carvajal, Inmaculada Candela, Jorge Guijarro, Cristina la Moneda, Cristina Jara, Raquel Mora, Juan Manuel Quinto, Sergio Ros, Daniel Canal, Pascual Pérez, Montserrat Ruiz, Alba de la Rica, Carolina Garrido, Manuel Sánchez, Jaime Sastre, Carlos de Gregorio, Francisco Carrasco, Juan Navarro, Andrés Navarro, Nieves Gonzalo, Clara Pérez, Adoración Alcalá, José Luis Rincón, Juan Antonio Gutiérrez.

Funding

This work was supported by the [RD16/0025/0038](#) project as a part of the Plan Nacional Research + Development + Innovation (*R + D + I*) and cofinanced by Instituto de Salud Carlos III - Subdirección General de Evaluación y Fondo Europeo de Desarrollo Regional; Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigaciones Sanitarias [grant number [PI16/01740](#); [PI18/01861](#); [CM 19/00160](#), [COV20-00005](#)]).

References

- Azzi L, Carcano G, Gianfagna F, et al. Saliva is a reliable tool to detect SARS-CoV-2. *J Infect* 2020;**81**:e45–50 [PMID: 32298676]. doi:[10.1016/j.jinf.2020.04.005](#).
- Iwasaki S, Fujisawa S, Nakakubo S, et al. Comparison of SARS-CoV-2 detection in nasopharyngeal swab and saliva. *J Infect* 2020;**81**:e145–7 [PMID: 32504740]. doi:[10.1016/j.jinf.2020.05.071](#).
- La Marca A, Capuzzo M, Paglia T, et al. Testing for SARS-CoV-2 (COVID-19): a systematic review and clinical guide to molecular and serological in-vitro diagnostic assays. *Reprod Biomed Online* 2020;**41**:483–99 [PMID: 32651106]. doi:[10.1016/j.rbmo.2020.06.001](#).
- Young S, Taylor SN, Cammarata CL, et al. Clinical evaluation of BD Veritor SARS-CoV-2 point-of-care test performance compared to PCR-based testing and versus the Sofia 2 SARS Antigen point-of-care test. *J Clin Microbiol* 2020 [PMID: 330239]. doi:[10.1128/JCM.02338-20](#).
- Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection using rapid immunoassays. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/antigen-detection-in-the-diagnosis-of-sars-cov-2infection-using-rapid-immunoassays>.
- Interim Guidance for Rapid Antigen Testing for SARS-CoV-2. Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antigen-tests-guidelines.html#:~:text=CDC%20recommends%20that%20laboratory%20and,the%20of/www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antigen-tests-guidelines.20previous%207%E2%80%9380%9310%20days>.
- Lambert-Niclot S, Cuffel A, Le Pape S, et al. Evaluation of a Rapid Diagnostic Assay for Detection of SARS-CoV-2 Antigen in Nasopharyngeal Swabs. *J Clin Microbiol* 2020;**58**:e00977-20 [PMID: 32404480]. doi:[10.1128/JCM.00977-20](#).
- Gniazdowski V, Morris CP, Wohl S, et al. Repeat COVID-19 Molecular Testing: correlation of SARS-CoV-2 Culture with Molecular Assays and Cycle Thresholds. *Clin Infect Dis* 2020 [PMID: 33104776]. doi:[10.1093/cid/ciaa1616](#).
- Bullard J, Dust K, Funk D, et al. Predicting infectious SARS-CoV-2 from diagnostic samples. *Clin Infect Dis* 2020 [PMID: 32442256]. doi:[10.1093/cid/ciaa638](#).
- Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, et al. (2020). Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* 2020;**581**:465–9 [PMID: 32235945]. doi:[10.1038/s41586-020-2196-x](#).

Vanesa Agulló[†], Marta Fernández-González[†]
Infectious Diseases Unit, Hospital General Universitario de Elche, Spain

Victoria Ortiz de la Tabla
Microbiology Service, Hospital General Universitario de Elche, Spain

Nieves Gonzalo-Jiménez
Microbiology Service, Hospital Universitario de San Juan, Alicante, Spain

José A. García
Infectious Diseases Unit, Hospital General Universitario de Elche, Spain

Mar Masía^{*,#}, Félix Gutiérrez^{*,#}
Infectious Diseases Unit, Hospital General Universitario de Elche, Spain Clinical Medicine Department, Universidad Miguel Hernández, San Juan de Alicante, Spain

□ Corresponding author.
E-mail addresses: mmasia@umh.es (M. Masía), gutierrez_fel@gva.es (F. Gutiérrez)

[†] Vanesa Agulló and Marta Fernández-González and contributed equally to the work.

[#] Joint senior authors