

**VILNIAUS UNIVERSITETAS
MEDICINOS FAKULTETAS**

Baigiamasis darbas

**Seilių ir nosiaryklės ėminių diagnostinės vertės palyginimas
COVID-19 sergantiems ligoniams**

**Comparison of Diagnostic Value of Saliva and Nasopharyngeal Samples
in Patients with COVID-19**

Studentas/ė (vardas, pavardė), grupė: **Tautvilė Smalinskaitė** VI kursas, 13 gr.

Katedra/ Klinika kurioje ruošiamas ir ginamas darbas: **Klinikinės medicinos instituto
Infekcinių ligų ir dermatovenerologijos klinika**

Darbo vadovas

Doc. dr. Birutė Zablockienė
(pedagoginis vardas, mokslo laipsnis, vardas, pavardė)

Katedros arba Klinikos vadovas

Prof. dr. Ligita Jančorienė
(pedagoginis vardas, mokslo laipsnis, vardas, pavardė)

2023 – 05 – 19

Studento elektroninio pašto adresas: tautvile.smalinskaite@mf.stud.vu.lt

SANTRAUKA

Tikslas: Palyginti SARS-CoV-2 atvirkštinės transkripcijos kiekybinės polimerazės grandininės reakcijos tyrimų, atliktų su seilių ir nosiaryklės tepinėlių mėginiais, diagnostinę vertę ir pritaikomumą klinikinėje praktikoje.

Metodai: Į tyrimą buvo įtraukta 100 pacientų, hospitalizuotų Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Infekcinių ligų centre dėl COVID-19 infekcijos. Trys suporuoti seilių ir nosiaryklės mėginiai buvo rinkti iš pacientų kas tris dienas ir lyginti su 150 sveikų asmenų kontroline grupe. Pagal ligos sunkumą pacientai suskirstyti į dvi grupes: lengva/vidutinė (I grupė, N=47) ir sunki ligos eiga (II grupė, N=53). Buvo atlikta 592 COVID-19 infekcija sergančiųjų ir 300 sveikų asmenų nosiaryklės ir seilių mėginių SARS-CoV-2 atvirkštinės transkripcijos kiekybinės polimerazės grandininės reakcijos tyrimų. Pacientų grupės buvo palygintos atsižvelgiant į demografinius, klinikinius, laboratorinius rodiklius ir atvirkštinės transkripcijos kiekybinės polimerazės grandininės reakcijos ciklą slenksčio vertes seilių ir nosiaryklės mėginiuose.

Rezultatai: Seilių mėginių ciklą slenksčio reikšmės buvo mažesnės už nosiaryklės mėginių ($p=0,002$). Nors pirmojo seilių mėginio testo ciklą slenksčio reikšmės I grupėje buvo reikšmingai mažesnės nei II grupėje ($p=0,04$), testas greičiau tapo neigiamas (vidutiniškai 11,7 dienų vs 14,8 dienų, $p=0,005$). Stebėta stipri teigiama koreliacija tarp dienų skaičiaus nuo simptomų pradžios ir ciklą slenksčio reikšmių tiek seilių, tiek nosiaryklės mėginiuose ($p<0,001$). Daugiamatačiu Cox proporcingos rizikos modeliu nustatyta, kad seilių mėginių ciklą slenksčio vertė ≤ 30 yra nepriklausomas sunkios COVID-19 ligos prognostinis faktorius (HR=10,06, 95 proc. CI: 1,84 - 55,14, $p=0,008$).

Išvados: Seilių mėginių atvirkštinės transkripcijos kiekybinės polimerazės grandininės reakcijos tyrimas yra tinkamas ankstyvai SARS-CoV-2 infekcijos diagnostikai, o šio testo ciklą slenksčio vertė ≤ 30 gali prognozuoti sunkią COVID-19 ligos eigą.

RAKTAŽODŽIAI: COVID-19; SARS-CoV-2; AT-PGR; seilės; Ct vertė

SUMMARY

Objectives: To compare the diagnostic value and clinical applicability of SARS-CoV-2 reverse transcription quantitative polymerase chain reaction tests performed on saliva and nasopharyngeal swab samples.

Methods: One hundred COVID-19 patients hospitalised at the Infectious Diseases Center of Vilnius University Hospital Santaros Klinikos were included in the study. Three saliva and nasopharyngeal samples were collected every three days in pairs and compared to a control group of 150 healthy individuals. According to the severity of the disease, cases were divided into two groups: mild/moderate (Cohort I, N=47) and severe disease (Cohort II, N=53). Altogether, 592 infectious and 300 non-infectious SARS-CoV-2 reverse transcription quantitative polymerase chain reaction tests from saliva and nasopharyngeal samples were performed. Cohorts were compared by demographic, clinical, laboratory profiles and cycle threshold values of reverse transcription quantitative polymerase chain reaction tests from saliva and nasopharyngeal swab samples.

Results: Cycle threshold values of saliva samples were lower than those of nasopharyngeal samples ($P=0.002$). Despite having significantly lower cycle threshold values in Cohort I compared to Cohort II ($P=0.04$), the first saliva sample became negative earlier (mean 11.7 days *vs* 14.8 days, $P=0.005$). There was a strong positive correlation between the number of days since the onset of symptoms and cycle threshold values in both saliva and nasopharyngeal samples ($P<0.001$). Saliva samples with a cycle threshold ≤ 30 were identified as an independent predictor for severe COVID-19 by the multivariate Cox proportional hazards regression analysis (HR=10.06, 95% CI: 1.84-55.14, $P=0.008$).

Conclusion: Salivary testing using reverse transcription quantitative polymerase chain reaction is suitable for detecting early SARS-CoV-2 cases. Additionally, a cycle threshold value ≤ 30 can predict the severity of COVID-19 disease.

KEYWORDS: COVID-19; SARS-CoV-2; RT-qPCR; saliva; Ct values

ĮVADAS

Sunkaus ūminio respiracinio sindromo koronavirusas-2 (SARS-CoV-2) yra naujas koronavirusas, pirmą kartą aptiktas 2019 m. pabaigoje ir išplitęs visame pasaulyje. Šiuo metu patvirtintų užsikrėtimo SARS-CoV-2 atvejų pasaulyje yra daugiau nei 760 milijonų (1). Nosiaryklės mėginių (NM) kiekybinė atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandininė reakcija (AT-PGR) vis dar yra pirmojo pasirinkimo laboratorinis testas etiologinei SARS-CoV-2 infekcijos diagnozei, kadangi pasižymi didžiausiu jautrumu iš visų viršutinių kvėpavimo takų mėginių (2, 3). Vis dėlto, NM paėmimui reikalingi įgūdžiai ir kyla pavojus, kad infekcija per lašelius bus perduota sveikatos priežiūros specialistams (4). Be to, klaidingai neigiamų rezultatų skaičius priklauso nuo ėminio kokybės, naudojamų reagentų jautrumo ir specifškumo bei procedūrą atliekančio asmens patirties (5). Daug tyrimų patvirtina, kad neinvaziniai seilių mėginiai (SM) yra tinkama alternatyva nosiaryklės mėginiams (6–11). Taip pat yra duomenų, kad kiekybiniai SARS-CoV-2 RNR pokyčiai skirtingose ligos stadijose galėtų suteikti kliniškai reikšmingos informacijos apie COVID-19 ligos sunkumą (12). Virusų kiekio mėginyje nustatymas galėtų padėti tinkamo gydymo parinkime ir reikšmingai pakeisti klinikinius ligos gydymo rezultatus (13). Vis dėlto, SM ir NM AT-PGR testų ciklą slenksčio (Ct) reikšmė, kuri ir galėtų atspindėti viruso kiekį ėminiuose, nėra pakankamai ištirta ir trūksta duomenų, kad remiantis šiuo rodikliu būtų galima prognozuoti ligos sunkumą (14). Taigi, šio darbo tikslas buvo palyginti suporuotus kiekybinius AT-PGR seilių ir nosiaryklės mėginius, įvertinti šių testų diagnostinę ir klinikinę vertę bei ryšį su COVID-19 ligos sunkumu.

TIRIAMIEJI IR METODAI

Tiriamųjų grupės

NM ir SM buvo surinkti iš 100 dėl COVID-19 infekcijos Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikose (VUL SK) Infekcinių ligų centre hospitalizuotų pacientų nuo 2020 m. liepos mėn. iki 2021 m. birželio mėn. Kontrolinė grupė buvo sudaryta iš 150 sveikų asmenų, atvykusių į VUL SK dėl rutininių procedūrų (vaistų paskyrimui, vakcinacijai ir pnš.) Šiam tyrimui buvo gautas Regioninio biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimas (Nr. 2020/7-N4-1245-725), studija vykdyta remiantis Helsinkio deklaracija. Prieš pradėdant tyrimą, iš visų tiriamųjų surinktos informuoto sutikimo formos. SARS-CoV-2 infekcija tiriamiesiems patvirtinta NM AT-PGR testu dar prieš hospitalizaciją VUL SK. Remiantis *National Institutes*

of Health gairėmis (15), pacientai pagal ligos sunkumą suskirstyti į dvi grupes: lengva ir vidutinio sunkumo (N=47, I grupė) ir sunki ligos eiga (N=53, II grupė).

Mėginių surinkimas

NM buvo renkami laikantis gamintojų protokolų ir ligoninės vidininių procedūrų. Iš 50 pacientų į sterilius mėgintuvėlius buvo surinkta ne mažiau kaip 2 ml seilių ėminių, o iš kitų 50 pacientų 2 ml seilių ėminiai buvo paimti naudojant *Saliva Collection Kit* (#SCK, *Diagnolita*, Vilnius, Lietuva) ir iš karto po surinkimo sumaišyti su 2 ml stabilizuojančios terpės. Visi ėminiai laikyti -20°C temperatūroje iki panaudojimo. Seilių ir nosiaryklės mėginiai buvo rinkti iš tų pačių hospitalizuotų pacientų kas tris dienas. Tyrimo metu surinkti 296 NM (I 100, II 97, III 99) ir 296 SM (I 99, II 98, III 99). Iš viso ištirti 892 ėminiai (592 sergančių pacientų ir 300 kontrolinės grupės).

RNR išskyrimas

Bendra RNR buvo išskirta naudojant *Saliva NA Purification Kit* (#SPK, *Diagnolita*) ir laikantis gamintojo protokolo. Gryninimo tirpalas, sudarytas iš stabilizavimo terpės, rišamojo tirpalo, magnetinių dalelių, redukuojančio reagento ir proteinizės K, buvo sumaišytas su 300 µL nosiaryklės tepinėlio terpės arba 250 µL nestabilizuotų seilių (490 µL seilių stabilizavimo mišinio stabilizuotų seilių mėginiais) ir 10 min. inkubuotas termomikseryje 65 °C temperatūroje, 900 aps/min. Po dviejų plovimo etapų PB1 ir PB2 buferiais (*Diagnolita*), etanolio likučiai buvo pašalinti kaitinant. Išgrynintos nukleino rūgštys buvo išplautos 50 µL eliucijos buferiu. Išskirtos nukleino rūgštys buvo naudojamos iš karto arba laikomos -20 °C temperatūroje iki panaudojimo.

Kopijinės DNR sintezė ir kiekybinė atvirkštinės transkripcijos PGR (AT-PGR)

Penki µL bendros RNR buvo naudojami vieno žingsnio kopijinės DNR (kDNR) sintezei ir AT-PGR reakcijai bendrame 20 µL tūryje, kurį sudarė 20× *Primer-Probe Mix* SARS-CoV-2 aptikimui (#PPM, *Diagnolita*), 4× *TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix* (*Thermo Fisher Scientific* (TFS), Waltham, MA, JAV) ir vanduo be RNazės. AT-PGR reakcijos buvo atliekamos su *QuantStudio 5 Real-Time PCR* sistema naudojant *QuantStudio Design & Analysis* programinės įrangos 1.4.1 versiją ("*Applied Biosystems*", TFS).

Statistinė analizė

Tolydieji kintamieji pateikti vidurkiu ir standartiniu nuokrypiu (SD, *angl. Standard deviation*) arba mediana ir interkvartiliniu pločiu (IQR, *angl. Interquartile range*). Kategoriniai kintamieji pateikti skaičiais ir procentais. Rodiklių skirtumai skirtingose grupėse pagal ligos sunkumą buvo apskaičiuoti naudojant Student'o t testą normaliai pasiskirsčiusiems duomenis ir Mann-Whitney U testą nenormaliai pasiskirsčiusiems duomenims. Kategoriniams kintamiesiems buvo naudotas Pearson'o chi-kvadratu testas arba Fisher'io tikslusis testas. Pearson'o linijinės arba Spearman'o ranginės koreliacijos koeficientai naudoti aptikti asociacijoms tarp klinikinių, laboratorinių rodiklių ir SARS-CoV-2 AT-PGR Ct verčių. Dvinarė logistikos analizė naudota siekiant rasti nepriklausomus faktorius, turinčius reikšmingą įtaką sunkios COVID-19 ligos prognozei. Kaplan-Meier metodas (log-rank testas) naudotas SARS-CoV-2 testų teigiamumo prognozei nustatyti. P-reikšmė $\leq 0,05$ laikyta statistiškai reikšminga. Duomenys apdoroti naudojant *Statistical Package for Social Sciences* programinę įrangą, 21.0 Windows versiją (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

REZULTATAI

Demografiniai ir klinikiniai rodikliai

Demografinių ir klinikinių pacientų rodiklių skirtumai pagal ligos sunkumą (I grupė vs II grupė) yra pateikti 1 ir 2 lentelėje. Vidutinis pacientų amžius $56,7 \pm 13,2$ m. (nuo 25 iki 90 m.), 48 proc. moterys. II grupės pacientai buvo reikšmingai vyresni (vid.: 61,6 vs 52,2 m., $p < 0,001$), jiems buvo nustatytas didesnis *National Early Warning Score* (NEWS, mediana: 3 vs 1, $p < 0,001$) ir Charlson komorbidiškumo indekso (mediana: 2 vs 1, $p < 0,001$) įvertis hospitalizacijos pradžioje. Gydymas deksametazonu (20 vs 8 pacientai, $p = 0,020$), deksametazono ir remdesiviro kombinacija (28 vs 12 pacientų, $p = 0,043$) arba gydymas antibiotikais (47 vs 22 pacientų, $p < 0,01$) dažniau buvo taikytas II grupėje. Trys pacientai iš II grupės buvo gydomi deguonies terapija per didelės tūkmės nosines kaniules, 1 pacientui prireikė intubacijos ir mechaninės ventiliacijos, 3 pacientai mirė. I grupėje daugiau pacientų buvo įtraukti į tyrimą su ligos trukme ≤ 10 dienų, o II grupėje daugiau pacientų buvo įtraukta su ligos trukme > 10 dienų ($p = 0,001$). Vidutinė trukmė nuo simptomų pradžios iki testo paėmimo buvo reikšmingai ilgesnė II grupėje nei I grupėje (I-ojo ėminio mediana: 11 vs 8 dienos, $p = 0,003$).

Laboratorinių testų rodikliai

Hospitalizacijos metu II grupės pacientams buvo nustatyta didesnė interleukino-6 (IL-6, mediana: 43,5 vs 16,9 pg/ml, p=0,001), feritino (mediana: 652 vs 270,2 ng/ml, p=0,010), C-reaktyvaus baltymo (CRB, mediana: 102,5 vs 25,7 mg/dl, p<0,001), d-dimerų (mediana: 465 vs 285 ng/ml, p=0,001), laktatdehidrogenazės (LDH, mediana: 342 vs 238 IU/l, p<0,001) koncentracija nei I grupės pacientams. Tarp grupių rasti reikšmingi leukocitų skaičiaus skirtumai: II grupėje stebėta didesnė leukocitozė (vid.: 7,2 vs 4,9 /mm³, p=0,003), neutrofilija (vid.: 5,2 vs 3,4 /mm³, p<0,001) ir limfopenija < 1,1 /mm³ (64,2 proc. vs 44,7 proc., p=0,040). Neutrofilų ir limfocitų santykis taip pat buvo didesnis II grupėje (mediana: 6,9 vs 2,6, p<0,001).

1 lentelė. COVID-19 sergančių pacientų klinikiniai, laboratoriniai rodikliai ir gydymas priklausomai nuo ligos sunkumo.

Rodiklis	I grupė (N=47)	II grupė (N=53)	p-reikšmė
Amžius, m.			
Vidurkis±SD	51,2±13,6	61,6±10,7	<0,001
<65, N (proc.)	41 (87,2)	35 (66,0)	0,033
≥65, N (proc.)	6 (12,8)	18 (34,0)	
Lytis, N (proc.)			
Vyras	27 (57,4)	25 (47,2)	0,364
Moteris	20 (42,6)	28 (52,8)	
NEWS rodiklis			
Mediana (IQR)	1 (0-2)	3 (2-5)	<0,001
0-4, N (proc.)	45 (95,7)	39 (73,6)	0,008
≥5, N (proc.)	2 (4,3)	14 (26,4)	
Charlson komorbidiškumo indeksas			
Mediana (IQR)	1 (0-2)	2 (1-3)	<0,001
0-2, N (proc.)	42 (89,4)	31 (73,6)	0,003
≥3, N (proc.)	5 (10,6)	22 (41,6)	
Interleukinas-6, pg/ml			
Mediana (IQR)	16,9 (9,2-30,2)	43,5 (22,1-67,6)	0,001
≤55, N (proc.)	39 (88,6)	34 (66,7)	0,029
>55, N (proc.)	5 (11,4)	17 (33,3)	
Feritinas, ng/ml			
Mediana (IQR)	270,2 (139,2-529,7)	652 (269-1096)	0,010
≤500, N (proc.)	35 (74,5)	22 (41,5)	0,004
>500, N (proc.)	12 (25,5)	31 (58,5)	
CRB, mg/dl			
Mediana (IQR)	25,7 (7,67-82,6)	102,5 (54,6-189,1)	<0,001
≤100, N (proc.)	39 (83,0)	26 (49,1)	0,003
>100, N (proc.)	8 (17,0)	27 (50,9)	
Leukocitų skaičius, /mm³			
Mediana (IQR)	4,9 (3,6-7,4)	7,2 (5,5-9,2)	0,003
≤6,0, N (proc.)	30 (63,8)	19 (35,8)	0,005

>6,0, N (proc.)	17 (36,2)	34 (64,2)	
Neutrofilų skaičius, /mm³			
Mediana (IQR)	3,4 (2,09-5,1)	5,2 (4,1-8,1)	<0,001
≤4,0, N (proc.)	29 (61,7)	11 (20,8)	<0,001
>4,0, N (proc.)	18 (38,3)	42 (79,2)	
NLS			
Mediana (IQR)	2,6 (1,9-4,6)	6,9 (3,3-8,9)	<0,001
≤5,94, N (proc.)	42 (89,4)	24 (45,3)	<0,001
>5,94, N (proc.)	5 (10,6)	29 (54,7)	
Limfocitų skaičius, /mm³			
Mediana (IQR)	1,2 (0,8-1,6)	0,9 (0,8-219)	0,055
≤1,1, N (proc.)	21 (44,7)	34 (64,2)	0,040
>1,1, N (proc.)	26 (55,3)	19 (35,8)	
D-dimerai, ng/ml			
Mediana (IQR)	285 (150-495)	465 (350-815)	0,001
≤500, N (proc.)	36 (76,6)	29 (54,7)	0,018
>500, N (proc.)	11 (23,4)	24 (45,3)	
LDH, IU/l			
Mediana (IQR)	238 (192,5-302,5)	342 (280-420)	<0,001
≤245, N (proc.)	24 (51,1)	8 (15,1)	<0,001
>245, N (proc.)	23 (48,9)	45 (84,9)	
Karščiavimo trukmė, dienos			
Mediana (IQR)	9 (6-13,75)	11,5 (8-17,25)	0,055
Skirtas gydymas, N (proc.)			
Remdesiviras	5 (10,6)	2 (3,8)	0,298
Deksametazonas	8 (25,5)	20 (52,8)	0,020
Remdesiviras ir deksametazonas	12 (17,0)	28 (37,7)	0,043
Antibiotikai	22 (46,8)	47 (88,7)	<0,001
Kvėpavimo funkcijos palaikymas, N (proc.)			
Tik deguonis	23 (48,9)	49 (92,4)	<0,001
DTNK	0,0 (0,0)	3 (5,7)	0,245
Invazinė mechaninė ventiliacija	0,0 (0,0)	1 (1,9)	0,530
Hospitalizacijos trukmė, dienos			
Mediana (IQR)	11 (10-15,5)	12 (10-17)	0,163
Mirtis, N (proc.)	0,0 (0,0)	3 (5,7)	0,245

Duomenys pateikti vidurkiu (SD), mediana (IQR) ir N (proc.). Lengva/vidutinė (I grupė) ir sunki ligos eiga (II grupė). Reikšmingos vertės paryškintos.

Sutrumpinimai: CRB, C-reaktyvus baltymas; DTNK, didelės tėkmės nosinės kaniulės; IQR, interkvartilinis plotis; LDH, laktatdehidrogenazė; NEWS, *National Early Warning Score*; NLS, neutrofilų ir limfocitų santykis; SD, standartinis nuokrypis.

2 lentelė. Nosiaryklės ir seilių mėginių SARS-CoV-2 AT-PGR testų rezultatai priklausomai nuo ligos sunkumo.

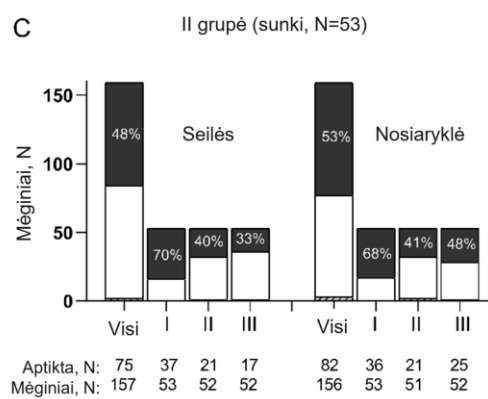
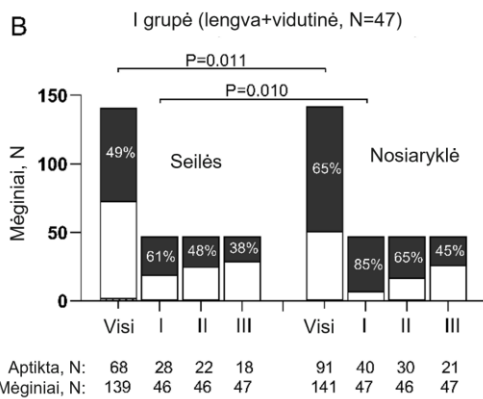
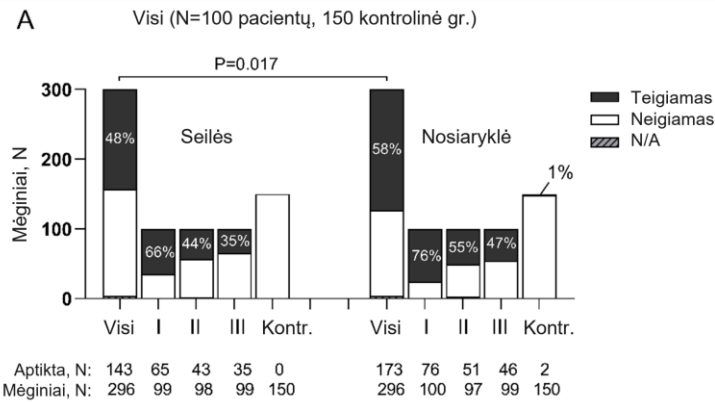
Rodiklis	I grupė (N=47)	II grupė (N=53)	p-reikšmė
Dienų skaičiaus nuo simptomų pradžios iki I-ųjų testų mediana	8 (5,5-11)	11 (9-13)	0,003
Vidutinė SM Ct reikšmė			
Pirmas testas	25,5±4,2	28,0±5,6	0,055
Antras testas	28,3±3,9	28,9±4,4	0,671
Trečias testas	29,1±3,3	29,5±5,9	0,801
Vidutinė NM Ct reikšmė			
Pirmas testas	28,4±5,7	29,3±5,1	0,570
Antras testas	29,8±4,7	30,8±4,7	0,509
Trečias testas	31,1±3,4	32,6±4,9	0,055
SM Ct vertės, I-as testas, N (proc.)			
≤30	25 (89,3)	19 (51,4)	0,001
>30	3 (10,7)	18 (48,6)	
NM Ct vertės, I-as testas, N (proc.)			
≤30	22 (55,0)	16 (44,4)	0,491
>30	18 (45,0)	20 (55,6)	
Vidutinis dienų skaičius iki SARS-CoV-2 testo konversijos			
SM	11,7±3,9	14,8±4,0	0,005
NM	13,4±4,4	14,6±4,6	0,395
Neigiami SARS-CoV-2 AT-PGR testai tyrimo pabaigoje, N (proc.)			
SM	29 (61,7)	35 (66,0)	0,692
NM	26 (55,3)	27 (50,9)	0,692
Dienos nuo simptomų pradžios iki I-ųjų testų, N (proc.)			
≤10	32 (68,1)	18 (34,0)	0,001
>10	15 (31,9)	35 (66,0)	

Duomenys pateikti mediana (IQR) ir N (proc.) Lengva/vidutinė (I grupė) ir sunki ligos eiga (II grupė). Reikšmingos vertės paryškintos.

Sutrupinimai: Ct, ciklą slenkstis; IQR, interkvartilinis plotis; NM, nosiaryklės mėginiai; SM, seilių mėginiai.

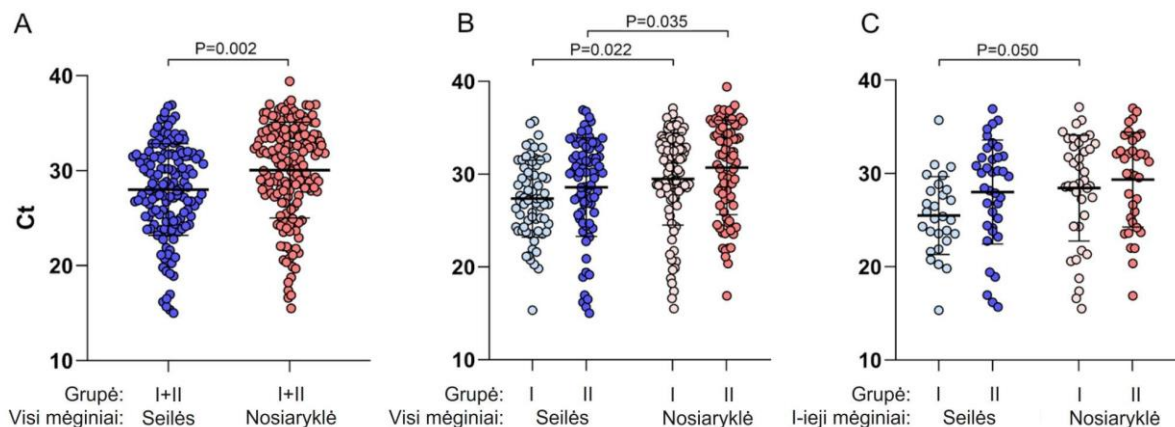
Nosiaryklės ir seilių mėginiai

Iš ištirtų 296 NM ir 296 SM, daugiau aptikta SARS-CoV-2 teigiamų NM, atitinkamai 173 (58 proc.) ir 143 (48 proc.), $p=0,017$ (pav. 1A). Analizuojant pagal grupes, toks pat skirtumas buvo nustatytas I grupėje ($p=0,011$), o ypač išryškėjo atliekant I-ąją AT-PGR testą ($p=0,010$). Palyginimui buvo ištirti NM ir SM, surinkti iš 150 sveikų žmonių. Kontrolinėje grupėje SARS-CoV-2 buvo aptiktas 2 NM ir nė viename SM mėginyje, pasiekus atitinkamai 99 proc. ir 100 proc. specifiškumą.



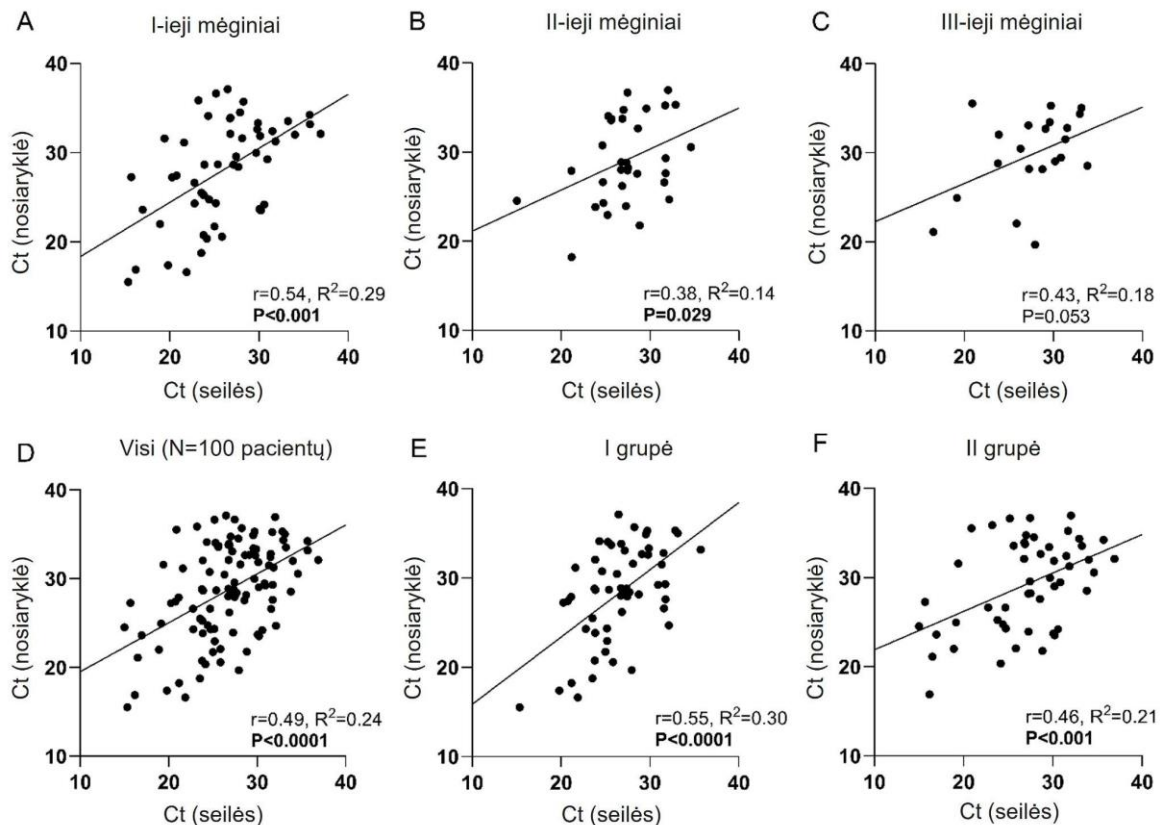
1 paveikslas. SARS-CoV-2 aptikimo dažnis seilių ir nosiaryklės mėginiuose, paimtuose iš COVID-19 sergančių pacientų ir kontrolinės grupės (A), pacientų, kuriems nustatyta lengva/vidutinio sunkumo (B) ir sunki liga (C).

AT-PGR testo Ct vertės seilių mėginiuose buvo reikšmingai mažesnės nei nosiaryklės mėginiuose ($p=0,002$, pav. 2A). Reikšmingas skirtumas tarp SM ir NM išliko išskirsčius duomenis į atskiras grupes (atitinkamai $p=0,022$ ir $p=0,035$, pav. 2B) ir analizuojant tik I-uosius testus ($p=0,05$, pav. 2C). Reikšmingų vidutinių Ct verčių skirtumų tarp grupių nebuvo nustatyta ($p>0,05$, pav. 2B-C).



2 paveikslas. Ciklų slenkščio vertės iš teigiamų seilių ir nosiaryklės mėginių palyginimas: visų mėginių (A); I ir II grupėse atskirai (B); tik I-ojo testo (C).

Buvo atlikta suporuotų, tris kartus kas tris dienas atliktų, NM ir SM SARS-CoV-2 AT-PGR testų rezultatų koreliacinė analizė. Rasta vidutiniškai stipri I-ojo testo ($r=0,54$, $p<0,001$, pav. 3A) ir silpna II-ojo testo koreliacija ($r=0,38$, $p=0,029$, pav. 3B) tarp SM ir NM Ct verčių, tačiau III-ojo testo reikšmės nekoreliavo. Reikšminga koreliacija rasta tarp visų SM ir NM ir atskirai analizuojant I grupės ir II grupės ėminius (pav. 3D-F).

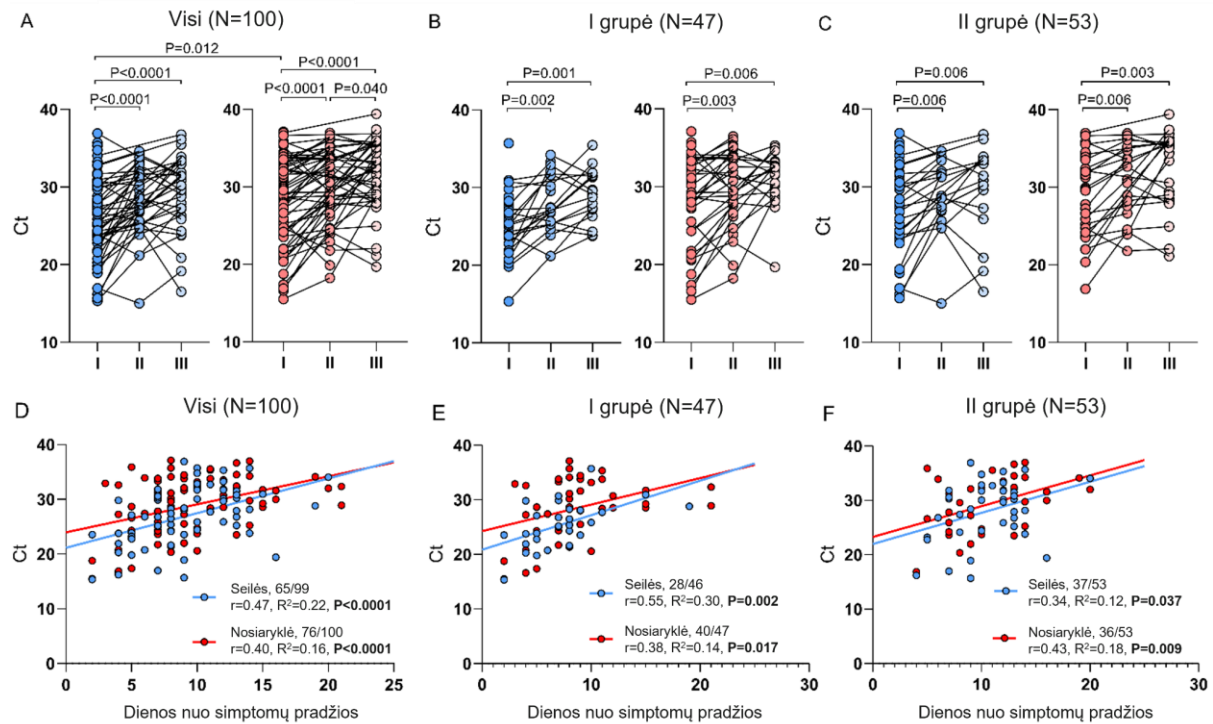


3 paveikslas. Ciklų slenksčio (Ct) verčių iš teigiamų seilių mėginių koreliacija: I-ojo testo (A), II-ojo testo (B) ir III-ojo testo (C), visų testų kartu (D) ir išskirsčius į grupes (E ir F).

Viruso dinamika laike

Viruso dinamikos laike analizė patvirtino, kad tiek NM, tiek SM I-ųjų testų Ct reikšmės buvo mažesnės ir su laiku didėjo II-uosiuose bei III-uosiuose testuose ($p<0,05$, pav. 4A). Analizuojant grupes atskirai tendencijos išliko tos pačios (pav. 3B-C). Taip pat buvo atlikta I-ojo SM ir NM testo Ct verčių ir dienų skaičiaus nuo simptomų pradžios koreliacijos analizė (pav. 4D-F). Ligos trukmė reikšmingai ir vidutiniškai stipriai koreliavo tiek su SM ($r=0,47$, $p<0,001$), tiek su NM ($r=0,41$, $p<0,001$) SARS-CoV-2 AT-PGR Ct vertėmis. I grupėje stipresnė koreliacija stebėta su SM nei NM ($r=0,55$, $p=0,002$ vs $r=0,38$, $p=0,017$), vis dėlto, II grupėje rastas priešingas rezultatas ($r=0,34$, $p=0,037$ vs $r=0,43$, $p=0,009$). SM SARS-CoV-2

AT-PGR testas greičiau neigiamas tapo I grupėje nei II grupėje (vid.: 11,7 d. vs 14,8 d., $p=0,005$), tačiau toks ryšys nebuvo stebėtas NM testuose.



4 paveikslas. Seilių ir nosiaryklės mėginių viruso dinamika laike: ciklų slenksčio (Ct) verčių palyginimas (A-C); NM ir SM Ct verčių ir dienų skaičiaus nuo simptomų pradžios koreliacija (D-F). r, Pearson'o koreliacija.

SARS-CoV-2 Ct vertės ryšys su ligos sunkumo žymenimis

SM (N=61) ir NM (N=73) I-ųjų SARS-CoV-2 AT-PGR testų Ct verčių koreliacija su klinikiniais ir laboratoriniais rodikliais yra pateikta 3 lentelėje. Rasta stipri teigiama koreliacija tarp dienų skaičiaus nuo simptomų pradžios ir tiek SM, tiek NM Ct verčių ($p<0,001$). Seilių ėminių Ct vertės taip pat koreliavo su NEWS įverčiu, feritino, CRB, D-dimerų koncentracijomis, leukocitų, neutrofilų ir limfocitų skaičiumi. Nosiaryklės ėminių Ct vertės koreliavo su CRB, D-dimerų ir LDH koncentracijomis, leukocitų ir neutrofilų skaičiumi.

3 lentelė. Demografinių, klinikinių ir laboratorinių rodiklių koreliacija su seilių ir nosiaryklės mėginių SARS-CoV-2 AT-PGR Ct vertėmis.

Rodiklis	SM Ct vertės N=61		NM Ct vertės N=73	
	r/rho	p-reikšmė	r/rho	p-reikšmė
Amžius, m.	0,055	0,338	0,187	0,057
NEWS rodiklis*	0,278	0,015	0,101	0,199
Charlson komorbidiškumo indeksas*	0,085	0,258	0,098	0,204
Interleukinas-6, pg/ml	0,029	0,414	0,124	0,148
Feritinas, ng/ml	0,305	0,008	0,170	0,076
CRB, mg/dl	0,317	0,006	0,198	0,047
Leukocitų skaičius, /mm ³	0,327	0,005	0,304	0,005
Neutrofilų skaičius, /mm ³	0,330	0,005	0,321	0,003
NLS	0,151	0,123	0,116	0,164
Limfocitų skaičius, /mm ³	0,256	0,023	0,168	0,077
D-dimerai*, ng/ml	0,334	0,004	0,333	0,002
LDH, IU/l	0,195	0,066	0,284	0,007
Dienu skaičius nuo simptomų pradžios	0,477	<0,001	0,411	<0,001

Sutrumpinimai: CRB, C-reaktyvus baltymas; Ct, ciklų slenkstis; LDH, laktatdehidrogenazė; NEWS, *National Early Warning Score*; NLS, neutrofilų ir limfocitų santykis; r, Pearson'o koreliacijos koeficientas; rho, Spearman'o koreliacijos koeficientas; * kintamieji, palyginti naudojant Spearman'o koreliacijos koeficientą.

Seilių mėginių SARS-CoV-2 Ct vertė - nepriklausomas sunkios COVID-19 ligos prognostinis faktorius

Vienmatė ir daugiamatė Cox proporcingos rizikos modelio analizė sunkiai COVID-19 ligai prognozuoti yra pateikta 4 lentelėje. Vienmatės analizės rezultatai parodė, kad amžius, NEWS įvertis, Charlson komorbidiškumo indeksas, IL-6, feritino ir CRB koncentracija, leukocitų ir neutrofilų skaičius, NLS, LDH hospitalizuojant ir SM Ct vertė ≤ 30 yra susiję su sunkia COVID-19 liga (4 lentelė). NM Ct vertės nebuvo prognostinis sunkios ligos faktorius. Daugiamatės analizės metu nustatyta, kad SM Ct vertė yra nepriklausomas sunkios COVID-19 ligos prognostinis faktorius (4 lentelė).

4 lentelė. Vienmatė ir daugiamatė Cox proporcingos rizikos modelio analizė sunkios COVID-19 ligos prognozei.

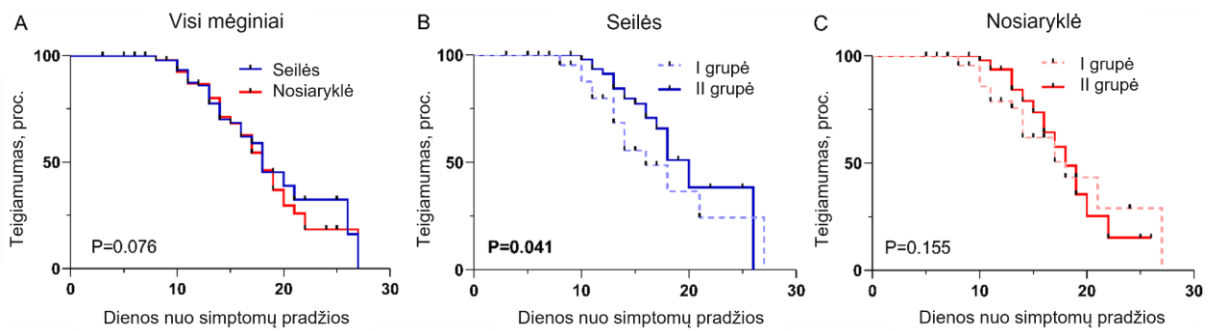
Rodiklis	Vienmatė analizė		Daugiamatė analizė	
	HR (95 proc. CI)	p-reikšmė	HR (95 proc. CI)	p-reikšmė
Amžius ≥ 65 metai	2,832 (1,196-6,703)	0,018	0,617 (0,036-10,468)	0,738
Lytis Vyras	0,614 (0,343-1,098)	0,100		

NEWS	5,035		1,035	
≥5	(1,218-20,821)	0,026	(0,918-10,621)	0,977
CCI	3,589		4,029	
≥3	(1,516-9,822)	0,005	(0,288-56,408)	0,301
Interleukinas-6	2,983		0,380	
>55, pg/ml	(1,168-7,619)	0,022	(0,080-1,799)	0,222
Feritinas	2,170		1,908	
>500, ng/ml	(1,124-4,189)	0,021	(0,424-8,591)	0,400
CRB	2,596		0,551	
>100, mg/dl	(1,208-5,577)	0,014	(0,114-2,669)	0,459
Leukocitų skaičius	2,669		0,562	
>6,0, /mm ³	(1,451-4,912)	0,002	(0,037-8,490)	0,677
Neutrofilų skaičius	4,349		3,862	
>4,0, /mm ³	(2,272-8,325)	<0,001	(0,279-53,406)	0,313
NLS	5,660		5,576	
>5,94	(2,215-14,464)	<0,001	(0,457-70,569)	0,177
Limfocitų skaičius	1,310			
≤1,1, /mm ³	(0,733-2,341)	0,362		
D-dimerai	1,872			
>500, ng/ml	(0,952-3,680)	0,069		
LDH	2,346		1,463	
>245, IU/l	(1,316-4,182)	0,004	(0,443-4,827)	0,532
SM Ct vertė	6,133		10,060	
≤30	(1,841-20,428)	0,003	(1,835-55,140)	0,008
NM Ct vertė	1,793			
≤30	(0,956-3,363)	0,069		

Duomenys yra pateikti pavojaus rizika (HR, angl. *Hazard ratio*) ir 95 proc. pasikliautinoju intervalu (CI, angl. *Confidence interval*). Reikšmingos vertės paryškintos. Visi reikšmingi kintamieji iš vienmatės analizės buvo įtraukti į daugiamatę analizę.

Sutrumpinimai: CCI, Charlson komorbidiškumo indeksas; CRB, C-reaktyvus baltymas; LDH, laktatdehidrogenazė; NEWS, *National Early Warning Score*; NLS, neutrofilų ir limfocitų santykis; NM, nosiaryklės mėginiai; SM, seilių mėginiai.

Kaplan-Meier analizė parodė, kad visų 100 tiriamųjų SARS-CoV-2 testų teigiamumo trukmė tarp SM ir NM reikšmingai nesiskyrė (mediana: 15,0 dienų vs 17,0 dienų, p=0,076) (pav. 5A). II grupės SM testų teigiamumo trukmė buvo reikšmingai ilgesnė nei I grupės naudojant log-rank testą (16,0 dienų [CI, 15,2-16,7] vs 14 dienų [CI, 12,0-15,9]; p=0,041) (pav. 5B). Vis dėlto, skirtingo sunkumo COVID-19 ligos grupėse NM testų teigiamumo trukmė nesiskyrė (16,0 dienų [CI, 14,5-17,5] vs 17,0 dienų [CI, 14,1-19,8]; p=0,155) (pav. 5C).



5 paveikslas. Kaplan-Meier analizė SARS-CoV-2 testų teigiamumo trukmės prognozei iš seilių ir nosiaryklės mėginių: visi testai (A); lengva/vidutinio sunkumo (I grupė) vs sunki (II grupė) ligos eiga seilių mėginiuose (B) ir nosiaryklės mėginiuose (C).

APTARIMAS

Kiekybinė atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandininė reakcija yra laikoma auksiniu standartu COVID-19 ligai patvirtinti, tačiau dažnai NM paėmimas yra nemaloni pacientams procedūra, ypač pediatrinėje populiacijoje, reikalaujanti specifinių sveikatos priežiūros specialistų įgūdžių. Taip pat tokio mėginio surinkimo metu atsiranda aerozolio sugeneravimo rizika, kuri kelia užsikrėtimo riziką sveikatos sektoriaus darbuotojams (4). Kita vertus, SM surinkimas yra neskausminga, paprasta, saugi procedūra, kurią atlikti gali ir pats pacientas. Daugybė tyrimų patvirtina SM tinkamumą SARS-CoV-2 RNR aptikimui (6–11, 16–20). Atliktos meta-analizės taip pat pagrindžia, kad SARS-CoV-2 AT-PGR testai, atlikti iš SM, pasižymi panašiu ar tik šiek tiek mažesniu jautrumu nei NM AT-PGR testai (10, 21, 22). Šio tyrimo rezultatai sutampa su prieš tai atliktais tyrimais ir patvirtina, kad SM yra tinkami COVID-19 ligos diagnozavimui ir kai kuriose klinikinėse situacijose net yra pranašesni už AT-PGR testus, atliktus naudojant NM.

Vienas iš pagrindinių šio tyrimo radinių patvirtina, kad SM Ct vertės, skirtingai nuo NM, yra asocijuotos su COVID-19 ligos sunkumu. Nors ir prieštaringi, tačiau kai kurių tyrimų duomenys patvirtina, kad NM Ct vertės nėra susijusios su ligos sunkumu (23–26). Šiame tyrime nustatyta, kad NM Ct vertės lengvos/vidutinės ir sunkios ligos grupėse taip pat nesiskyrė. Seilių ėminių SARS-CoV-2 AT-PGR testas anksčiau tapo neigiamas lengvos/vidutinės eigos grupėje nei sunkiai sergančių (11,7 d. vs 14,8 d.), tačiau toks skirtumas nestebėtas NM testuose. Taip pat nustatyta, kad SM Ct vertės ≤ 30 yra nepriklausomas prognostinis sunkios COVID-19 ligos faktorius, o viruso kiekis nosiaryklės mėginiuose ligos

sunkumo neprognozavo. Remiantis šiais duomenimis, galima manyti, kad lengvos/vidutinės ligos eigos metu SM SARS-CoV-2 AT-PGR testas tampa anksčiau neigiamu nei NM testas, tačiau sunkios COVID-19 ligos metu SM AT-PGR testo Ct vertės ilgiau išlieka mažos. Vis dar nėra daug tyrimų, kurie analizuotų SM SARS-CoV-2 PGR testo ryšį su ligos sunkumu. *Aydin et al.* nustatė, kad viruso kiekis seilėse ankstyvoje COVID-19 ligos stadijoje galėtų turėti prognostinę vertę ligos eigai pacientų virš 45 m. populiacijoje (19). Panašūs rezultatai buvo pristatyti ir kitame tyrime, kurioje lengvos ligos metu seilių ir skreplių mėginiuose buvo aptiktas didelis viruso kiekis pirmą savaitę, didžiausias antrą savaitę ir vėliau mažėjo, o sunkios ligos metu didelis viruso kiekis buvo aptiktas net ir trečią bei ketvirtą savaitę (27). Nors ir reikalinga atlikti daugiau tyrimų, jau dabar galima pastebėti, kad ilgiau aptinkamos žemos Ct reikšmės seilėse gali numatyti sunkią COVID-19 ligos eigą. Dėl šios priežasties pacientai, kurių seilių SARS-CoV-2 tyrimų Ct vertės yra mažos, turėtų būti atidžiau stebimi, kad sveikatos priežiūros specialistai galėtų juos laiku hospitalizuoti bei taikyti tinkamiausias gydymo priemones.

Kitas įdomus radinys šiame darbe atskleidė, kad viruso kiekis, kurį atspindi Ct vertės, seilėse buvo reikšmingai didesnis nei nosiaryklės mėginiuose, nepriklausomai nuo ligos sunkumo. Žema Ct vertė parodo didelę genetinės medžiagos koncentraciją bei viruso kiekį ėminyje, dažnai koreliuojantį su didesne infekcijos rizika (28). Aukšta Ct vertė atspindi mažą viruso genetinės medžiagos koncentraciją bei mažesnę užkrečiamumo riziką, vis dėlto, didesnės Ct vertės gali būti stebimos vėlesnėje sveikimo stadijoje (29). Tiek SM, tiek NM AT-PGR testų Ct reikšmės aiškiai koreliavo su ligos trukme, kadangi I-uose testuose nustatytos žemesnės Ct vertės, o II-uosiuose - didesnės. Tyrimai rodo (19, 30, 31), kad didele angiotenziną konvertuojančio fermento-2 (ACE2) receptorių koncentracija pasižymintis seilių liaukų kanalėlių ir burnos gleivinės epitelis yra ankstyvos SARS-CoV-2 infekcijos pirmasis taikinytis ir šis faktas galėtų paaiškinti, kodėl būtent ankstyvame ligos etape seilėse stebėtas didžiausias viruso kiekis. Taigi, galima daryti išvadą, kad seilių mėginiai yra patikima medžiaga SARS-CoV-2 infekcijos nustatymui.

SARS-CoV-2 viruso kiekio, nustatyto AT-PGR testu, ir biocheminių bei hematologinių rodiklių ryšys COVID-19 ligos kontekste yra plačiai tyrinėjamas, vis dėlto, duomenys išlieka dviprasmiški. Kai kuriuose tyrimuose (18, 32–35) randamas ryšys tarp žemų Ct verčių hospitalizacijos metu ir ligos sunkumo žymenų, tokių kaip padidėjusi IL-6, LDH, CRB konc., limfopenija, padidėjęs neutrofilų/limfocitų santykis. Visgi, šio tyrimo metu rasta priešinga asociacija - teigiama koreliacija stebėta tarp didesnių NM Ct reikšmių ir padidėjusios LDH, D-

dimerų, CRB konc., leukocitų, neutrofilų skaičiaus, o SM Ct vertės koreliavo su didesne feritino, CRB konc., leukocitų ir neutrofilų skaičiumi. Tiek SM, tiek NM Ct vertės stipriai koreliavo su dienų skaičiumi nuo ligos pradžios. Teigiama koreliacija seilių mėginiuose (tačiau ne NM) rasta su limfocitų skaičiumi ir Ct vertėmis, limfopenija dažniau stebėta didesni viruso kieki turinčiuose seilių mėginiuose. *Chua et al.* atliktame tyrime su pediatrišiais COVID-19 pacientais taip pat buvo nustatyta, kad vaikams, turėjusiems limfopeniją, dažniau nustatytas didesnis viruso kiekis seilėse, tačiau ne nosiaryklės mėginiuose (36). Šie klinikiniai duomenys patvirtina, kad sutrikęs imuninės sistemos atsakas, toks kaip sumažėjęs limfocitų kiekis, yra glaudžiai susijęs su SARS-CoV-2 infekcijos sunkumu ir tą gali atspindėti padidėjęs viruso kiekis seilėse. Ct verčių ir biocheminių bei laboratorinių rodiklių ryšio skirtumai studijose turėtų būti interpretuojami atsargiai, nes skysčių mėginiai, surinkti skirtingais ligos etapais, yra labai heterogeniški. Šio tyrimo duomenys rodo, kad, nepaisant uždegiminių ir hematologinių rodiklių skirtumų, vidutinės Ct vertės tiek SM, tiek NM buvo panašios sunkios ir lengvos/vidutinės ligos grupėse. Vis dėlto, į sunkios ligos grupę daugiau tiriamųjų buvo įtraukta vėlesnėje ligos stadijoje, o į lengvos/vidutinės ligos grupę daugiau pacientų buvo įtraukta ankstesnėje ligos stadijoje. Galima daryti prielaidą, kad sunkia forma sergančių pacientų grupėje padidėjusiems uždegiminiams rodikliams įtakos turėjo vėlesnė ligos stadija, kurios metu hiperaktyvus uždegiminis atsakas yra labiau susijęs su ligos eiga nei pats virusas.

Nepaisant šio darbo rezultatų svarbos, tyrimas turėjo keletą trūkumų. Tyrimo protokole nebuvo numatyta įtraukti visų tiriamųjų specifinę ligos dieną, todėl Ct dinamiką, ryšį su ligos sunkumu ir laboratoriniais rodikliais būtų galima dar tiksliau įvertinti. Kitas trūkumas, į kurį reikėtų atkreipti dėmesį, yra tai, kad AT-PGR testų rezultatai negali atskirti gyvybingų ir negyvybingų virusų, todėl atspindi bendrą virusinės RNR kiekį.

IŠVADOS

Seilių ėminių SARS-CoV-2 kiekybinis atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandininės reakcijos tyrimas yra tinkamas ankstyvai COVID-19 ligos diagnostikai. Nustatyta, kad, priešingai nei nosiaryklės mėginių, seilių mėginių kiekybinio atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandininės reakcijos testo ciklo slenksčio vertė ≤ 30 yra nepriklausomas sunkios COVID-19 ligos prognostinis faktorius, kurio pagalba sveikatos priežiūros specialistai galėtų parinkti pacientams tinkamiausią gydymą.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Weekly epidemiological update on COVID-19 - 11 May 2023 [Internet]. [cited 2023 May 14]. Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---11-may-2023>
2. Lippi G, Simundic AM, Plebani M. Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Clin Chem Lab Med*. 2020 Jun 25;58(7):1070–6.
3. Khiabani K, Amirzade-Iranaq MH. Are saliva and deep throat sputum as reliable as common respiratory specimens for SARS-CoV-2 detection? A systematic review and meta-analysis. *Am J Infect Control*. 2021 Sep;49(9):1165–76.
4. Harding H, Broom A, Broom J. Aerosol-generating procedures and infective risk to healthcare workers from SARS-CoV-2: the limits of the evidence. *J Hosp Infect*. 2020 Aug;105(4):717–25.
5. Karligkiotis A, Arosio A, Castelnuovo P. How to Obtain a Nasopharyngeal Swab Specimen. *N Engl J Med*. 2020 Jul 16;383(3):e14.
6. Bruxvoort K, Tenggardjaja CF, Slezak J, Gullett JC, Broder B, Park CH, et al. Variation in SARS-CoV-2 molecular test sensitivity by specimen types in a large sample of emergency department patients. *Am J Emerg Med*. 2021 Dec 1;50:381–7.
7. LeGoff J, Kernéis S, Elie C, Mercier-Delarue S, Gastli N, Choupeaux L, et al. Evaluation of a saliva molecular point of care for the detection of SARS-CoV-2 in ambulatory care. *Sci Rep*. 2021 Oct 26;11(1):21126.
8. Uddin MKM, Shirin T, Hossain ME, Alam AN, Ami JQ, Hasan R, et al. Diagnostic Performance of Self-Collected Saliva Versus Nasopharyngeal Swab for the Molecular Detection of SARS-CoV-2 in the Clinical Setting. *Microbiol Spectr*. 0(0):e00468-21.
9. Williams E, Bond K, Zhang B, Putland M, Williamson DA. Saliva as a Noninvasive Specimen for Detection of SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol*. 2020 Jul 23;58(8):e00776-20.
10. Czumbel LM, Kiss S, Farkas N, Mandel I, Hegyi A, Nagy Á, et al. Saliva as a Candidate for COVID-19 Diagnostic Testing: A Meta-Analysis. *Front Med*. 2020 Aug 4;7:465.
11. Palikša S, Lopeta M, Belevičius J, Kurmauskaitė V, Ašmenavičiūtė I, Pereckaitė L, et al. Saliva Testing is a Robust Non-Invasive Method for SARS-CoV-2 RNA Detection. *Infect Drug Resist*. 2021;14:2943–51.
12. Yoon JG, Yoon J, Song JY, Yoon SY, Lim CS, Seong H, et al. Clinical Significance of a High SARS-CoV-2 Viral Load in the Saliva. *J Korean Med Sci*. 2020 May 20;35(20):e195.
13. Shenoy S. SARS-CoV-2 (COVID-19), viral load and clinical outcomes; lessons learned one year into the pandemic: A systematic review. *World J Crit Care Med*. 2021 Jul 9;10(4):132–50.
14. IDSA and AMP joint statement on the use of SARS-CoV-2 PCR cycle threshold (Ct) values for clinical decision-making [Internet]. [cited 2023 May 14]. Available from: <https://www.idsociety.org/globalassets/idsa/public-health/covid-19/idsa-amp-statement.pdf>

15. COVID-19 treatment guidelines [Internet]. [cited 2023 May 14]. Available from: <https://files.covid19treatmentguidelines.nih.gov/guidelines/covid19treatmentguidelines.pdf>
16. Leung ECM, Chow VCY, Lee MKP, Lai RWM. Deep throat saliva as an alternative diagnostic specimen type for the detection of SARS-CoV-2. *J Med Virol*. 2021 Jan;93(1):533–6.
17. Wong SCY, Tse H, Siu HK, Kwong TS, Chu MY, Yau FYS, et al. Posterior Oropharyngeal Saliva for the Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2020 Jun 21;ciaa797.
18. Azzi L, Carcano G, Gianfagna F, Grossi P, Gasperina DD, Genoni A, et al. Saliva is a reliable tool to detect SARS-CoV-2. *J Infect*. 2020 Jul;81(1):e45–50.
19. Aydin S, Benk IG, Geckil AA. May viral load detected in saliva in the early stages of infection be a prognostic indicator in COVID-19 patients? *J Virol Methods*. 2021 Aug;294:114198.
20. Nagura-Ikeda M, Imai K, Tabata S, Miyoshi K, Murahara N, Mizuno T, 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.
21. Ibrahim N, Delaunay-Moisan A, Hill C, Le Teuff G, Rupprecht JF, Thuret JY, et al. Screening for SARS-CoV-2 by RT-PCR: Saliva or nasopharyngeal swab? Rapid review and meta-analysis. *PloS One*. 2021;16(6):e0253007.
22. Tsang NNY, So HC, Ng KY, Cowling BJ, Leung GM, Ip DKM. Diagnostic performance of different sampling approaches for SARS-CoV-2 RT-PCR testing: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2021 Sep;21(9):1233–45.
23. Salto-Alejandre S, Berastegui-Cabrera J, Camacho-Martínez P, Infante-Domínguez C, Carretero-Ledesma M, Crespo-Rivas JC, et al. SARS-CoV-2 viral load in nasopharyngeal swabs is not an independent predictor of unfavorable outcome. *Sci Rep*. 2021 Jun 21;11(1):12931.
24. Maltezou HC, Raftopoulos V, Vorou R, Papadima K, Mellou K, Spanakis N, et al. Association Between Upper Respiratory Tract Viral Load, Comorbidities, Disease Severity, and Outcome of Patients With SARS-CoV-2 Infection. *J Infect Dis*. 2021 Apr 8;223(7):1132–8.
25. Argyropoulos KV, Serrano A, Hu J, Black M, Feng X, Shen G, et al. Association of Initial Viral Load in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Patients with Outcome and Symptoms. *Am J Pathol*. 2020 Sep;190(9):1881–7.
26. Lee S, Kim T, Lee E, Lee C, Kim H, Rhee H, et al. Clinical Course and Molecular Viral Shedding Among Asymptomatic and Symptomatic Patients With SARS-CoV-2 Infection in a Community Treatment Center in the Republic of Korea. *JAMA Intern Med*. 2020 Nov 1;180(11):1447–52.
27. Zheng S, Fan J, Yu F, Feng B, Lou B, Zou Q, 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 Apr 21;369:m1443.

28. Rao SN, Manissero D, Steele VR, Pareja J. A Systematic Review of the Clinical Utility of Cycle Threshold Values in the Context of COVID-19. *Infect Dis Ther.* 2020 Sep;9(3):573–86.
29. Sarkar B, Sinha RN, Sarkar K. Initial Viral Load of a COVID-19-Infected Case Indicated by its Cycle Threshold Value of Polymerase Chain Reaction Could be used as a Predictor of its Transmissibility - An Experience from Gujarat, India. *Indian J Community Med Off Publ Indian Assoc Prev Soc Med.* 2020 Sep;45(3):278–82.
30. Liu L, Wei Q, Alvarez X, Wang H, Du Y, Zhu H, et al. Epithelial cells lining salivary gland ducts are early target cells of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection in the upper respiratory tracts of rhesus macaques. *J Virol.* 2011 Apr;85(8):4025–30.
31. Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X, et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci.* 2020 Feb 24;12(1):1–5.
32. Rodríguez-Serrano DA, Roy-Vallejo E, Zurita Cruz ND, Martín Ramírez A, Rodríguez-García SC, Arevalillo-Fernández N, et al. Detection of SARS-CoV-2 RNA in serum is associated with increased mortality risk in hospitalized COVID-19 patients. *Sci Rep.* 2021 Jun 23;11(1):13134.
33. Chen X, Zhao B, Qu Y, Chen Y, Xiong J, Feng Y, et al. Detectable Serum Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viral Load (RNAemia) Is Closely Correlated With Drastically Elevated Interleukin 6 Level in Critically Ill Patients With Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2020 Nov 5;71(8):1937–42.
34. Xia XY, Wu J, Liu HL, Xia H, Jia B, Huang WX. Epidemiological and initial clinical characteristics of patients with family aggregation of COVID-19. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* 2020 Jun;127:104360.
35. Liu Y, Liao W, Wan L, Xiang T, Zhang W. Correlation Between Relative Nasopharyngeal Virus RNA Load and Lymphocyte Count Disease Severity in Patients with COVID-19. *Viral Immunol.* 2021 Jun;34(5):330–5.
36. Chua GT, Wong JSC, To KKW, Lam ICS, Yau FYS, Chan WH, et al. Saliva viral load better correlates with clinical and immunological profiles in children with coronavirus disease 2019. *Emerg Microbes Infect.* 2021 Dec;10(1):235–41.

PRIEDAI

Priedas 1. Leidimas atlikti biomedicininį tyrimą



VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS
sui generis darinys prie VILNIAUS UNIVERSITETO

LEIDIMAS ATLIKTI BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ

2020 07 02 Nr.2020/7-N4-1245-725

Tyrimo pavadinimas:

Medicinos technologijos SARS-CoV-2 ištyrimo gerinimui: inovatyvaus seilių mėginio paėmimo sistemos ir ištyrimo metodo sukūrimas ir išbandymas

Protokolo Nr.: 1
Versija: 2
Data: 2020 06 22

Informuoto asmens sutikimo forma: 3
2020 06 22
4
2020 06 22

Pagrindinės tyrėjos: **Ligita Jančorienė**
Sonata Jarmalaitė
Alina Pūrienė

Įstaigos pavadinimas: VšĮ Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos
Adresas: Santariškių g. 2, Vilnius
Nacionalinis vėžio institutas
Santariškių g. 1, Vilnius
VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Žalgirio klinika
Žalgirio g. 117, Vilnius

Leidimas galioja iki: **2022 06**

Leidimas išduotas Vilniaus regioninio biomedicininių tyrimų etikos komiteto posėdžio (protokolas Nr. 2020/7-N4), vykusio 2020 m. liepos 2 d. sprendimu.

Pirmininkas

prof. dr. (HP) Saulius Vosylius

Viešoji įstaiga
Universiteto g. 3
01513 Vilnius

Duomenys kaupiami ir saugomi
Juridinių asmenų registre
Kodas 211950810

Komiteto duomenys:
M. K. Čiurlionio g. 21, LT- 03101 Vilnius
Tel. (8 5) 268 6998, el. p. rbtek@mf.vu.lt

Priedas 2. Pritarimas biomedicininio tyrimo dokumentų pakeitimams



VILNIAUS REGIONINIS BIOMEDICININIŲ TYRIMŲ ETIKOS KOMITETAS *sui generis* darinys prie VILNIAUS UNIVERSITETO

Biomedicininio tyrimo „Medicinos technologijos SARS-CoV-2 ištyrimo gerinimui: inovatyvaus seilių mėginio paėmimo sistemos ir ištyrimo metodo sukūrimas ir išbandymas“ 2020-11-24 Nr. 2020-LP-82
pagrindinėms tyrėjoms Ligitai Jančorienei, Sonatai Jarmalaitei, Alinai Pūrienei

PRITARIMAS BIOMEDICININIO TYRIMO DOKUMENTŲ PAKEITIMAMS

Leidimo Nr. 2020/7-N4-1245-725 pakeitimas Nr. 1

Vilniaus regioninis biomedicininių tyrimų etikos komitetas išnagrinėjęs prašymą atlikti su vykdomu biomedicininiu tyrimu „*Medicinos technologijos SARS-CoV-2 ištyrimo gerinimui: inovatyvaus seilių mėginio paėmimo sistemos ir ištyrimo metodo sukūrimas ir išbandymas*“ (leidimas Nr. 2020/7-N4-1245-725, išduotas 2020 07 02 d.) susijusių dokumentų pakeitimus pritaria, kad pakeitimai **atitinka** LR biomedicininių tyrimų etikos įstatymo II skyriuje nustatytiems biomedicininių tyrimų etikos reikalavimams. Atsižvelgiant į tai **pritaria**, kad būtų:

- vadovaujamosi protokolu (Nr. 1, versijos Nr. 3, data 2020 08 04 d.);
- teikiamos informuoto asmens sutikimo formos (versijos Nr. 5, data 2020 08 04 d.) ir (versijos Nr. 6, data 2020 08 04 d.);
- įtraukiami tyrėjai – Birutė Zablockienė, Mindaugas Paulauskas, Sigitas Palikša, Martynas Šimanavičius ir kitas tyrimą atliekantis asmuo Tautvilė Smalinskaitė.

Pirmininkas

prof. dr. (HP) Saulius Vosylius