



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E SAÚDE**



SARA NUNES VAZ

SALIVA COMO AMOSTRA BIOLÓGICA NA DETECÇÃO DO SARS-COV-2

TESE DE DOUTORADO

**Salvador
2021**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E SAÚDE**



SARA NUNES VAZ

SALIVA COMO AMOSTRA BIOLÓGICA NA DETECÇÃO DO SARS-COV-2

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina e Saúde, da Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Medicina e Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Martins Netto

Co-orientador: Prof. Dr. Jan Felix Drexler

Salvador

2021

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA), com dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Vaz, Sara Nunes

Saliva como amostra biológica na detecção do SARS-CoV-2 / Vaz, Sara Nunes
– Salvador, 2021.

86f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Martins Netto.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina da Bahia/Programa de Pós-graduação em Medicina e Saúde, 2021.

Inclui referências e anexos.

1. SARS-CoV-2. 2. COVID-19. 3. saliva. 4. diagnóstico molecular. 5. GeneXpert.
I. Universidade Federal da Bahia. II. Título.

SARA NUNES VAZ

SALIVA COMO AMOSTRA BIOLÓGICA NA DETECÇÃO DO SARS-COV-2

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina e Saúde, da Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Medicina e Saúde.

Aprovado em 10 de dezembro de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Roberto Brites Alves

Universidade Federal da Bahia

Prof. Dra. Carla Hilário da Cunha Daltro

Universidade Federal da Bahia

Dra. Silvia Caroline Oliveira Santos

HUPES-EBSERH

Dra. Fabianna Marcia Maranhão Bahia Souza

HUPES-EBSERH

Dra. Marcia Lilian Sampaio e Sampaio Sá

Hospital da Bahia

AGRADECIMENTOS

A Deus e meus Protetores;

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Saúde - PPGMS - da Universidade Federal da Bahia;

Ao meu Orientador Professor Doutor Eduardo Martins Netto pelo acolhimento, acompanhamento e apoio durante todas as etapas da minha formação na Pós-Graduação;

Ao meu Co-Orientador Professor Doutor Jan Felix Drexler pela oportunidade de aprendizado em seu laboratório no Instituto Charité, em Berlin, Alemanha;

Ao Professor Doutor Carlos Brites pela confiança, apoio e incentivo à pesquisa, desde a graduação;

À secretaria do PPGMS em nome da sua secretária Carina Santana por todo apoio com as demandas administrativas durante o período do curso;

À Dra. Margarida Costa Neves, coordenadora do serviço ambulatorial de pneumologia do Complexo Hospitalar Professor Edgard Santos e sua equipe pela colaboração;

À equipe do Laboratório de Pesquisa em Infectologia, que compartilhou de todas as etapas da realização deste trabalho;

À Daniele Santana e Felice Deminco, amigos queridos e colegas de laboratório pela paciência, apoio, suporte e enormes contribuições;

À Célia Pedroso Jorge, que já foi minha preceptora de estágio e orientadora de TCC, hoje colega de laboratório e amiga, por me mostrar como podemos ser felizes fazendo pesquisa, apesar de todas as dificuldades;

Aos meus familiares e amigos pelo apoio, força e incentivo.

Gratidão!!!

***“We cannot say this loudly enough or clearly enough or often enough:
All countries can still change the course of this pandemic”.***

*“Nunca seremos capazes de dizer isso alto o bastante, ou claro o bastante,
nem o número de vezes suficientes: Todos os países ainda podem mudar o
curso desta pandemia”.*

(Dr. Tedros Adhanom Ghebreyesus)

RESUMO

Introdução: O coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2) é a causa da Doença por Coronavírus 2019 (COVID-19). Embora a reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa em tempo real (qRT-PCR) de amostras respiratórias seja o teste padrão de referência para a detecção de infecção por SARS-CoV-2, a coleta de swabs nasofaríngeos (NPS) e/ou orofaríngeo (OPS) causa desconforto aos pacientes e pode representar um risco para profissionais de saúde. O uso da saliva como amostra diagnóstica apresenta várias vantagens. **Objetivos:** Validar o uso de saliva como amostra biológica para o diagnóstico de COVID-19 e avaliar o desempenho do teste Xpert Xpress SARS-CoV-2 em comparação com o teste de qRT-PCR convencional, utilizando saliva como espécime. **Casística e Métodos:** Este estudo foi desenvolvido no Complexo Hospitalar Professor Edgard Santos (C-HUPES), em Salvador, Brasil. Os participantes que apresentaram sinais/sintomas sugerindo infecção por SARS-CoV-2 foram convidados a fornecer amostras de NPS/ OPS e saliva auto-coletada. Amostras de saliva foram diluídas, o RNA viral foi isolado e amplificado por qRT-PCR. Os resultados dos testes com mostras padrão de referência e de saliva foram comparados. Amostras de saliva foram usadas para validar a plataforma Xpert Xpress SARS-CoV-2. As análises estatísticas foram realizadas com o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 18.0. Foi realizada estatística descritiva; realizados os testes de Fisher e Mann-Whitney; calculado o coeficiente kappa, coeficiente de determinação e de correlação. **Resultados:** Cento e cinquenta e cinco participantes foram recrutados, e amostras de pares de NPS / OPS e saliva foram coletadas. A sensibilidade e especificidade do qRT-PCR usando amostras de saliva foi 94,4% (IC 95% 86,4 - 97,8) e 97,6% (IC 95% 91,7 - 99,3), respectivamente. A acurácia do teste utilizando saliva foi 96,1%. Quarenta amostras de positivas de saliva foram utilizadas para a validação da metodologia baseada em cartucho. No ensaio Xpert Xpress, o valor de ct do gene E foi 29,7 e do gene N2 foi 31,6. No ensaio convencional, o valor de ct do gene E foi 34,9 e do gene RdRp foi 38,3. A correlação entre os genes da plataforma Xpert Xpress foi 98%; entre os genes do ensaio convencional foi 86%; e entre o gene E dos dois ensaios foi 78%. **Conclusões:** O uso de amostras de saliva auto coletadas é uma alternativa fácil, conveniente e de baixo custo aos testes moleculares convencionais baseados em NPS/OPS. Esses resultados podem permitir um uso mais amplo de testes moleculares para o manejo da pandemia de COVID19, especialmente em ambientes com recursos limitados.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; COVID-19; Saliva; Diagnóstico molecular; GeneXpert.

ABSTRACT

Background: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is the cause of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Although Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) of respiratory specimens is the reference standard test for detection of SARS-CoV-2 infection, collecting nasopharyngeal swabs (NPS) and/or oropharyngeal swabs (OPS) causes discomfort to patients and may represent a considerable risk for healthcare workers. The use of saliva as a diagnostic sample has several advantages. **Objectives:** The aim of this study is to validate the use of saliva as a biological sample for diagnosis of COVID-19 and to evaluate the test performance of the Xpert Xpress SARS-CoV-2 cartridge assay in comparison to a conventional qRT-PCR testing, using saliva as biological specimen. **Method:** This study was developed at Complexo Hospitalar Professor Edgard Santos (C-HUPES), in Salvador, Brazil. Participants presenting with signs/symptoms suggesting SARS-CoV-2 infection, underwent a NPS and/or OPS, and self-saliva collection. Saliva samples were diluted, RNA isolation and qRT-PCR were performed. Results of conventional versus saliva samples testing were compared. Saliva samples were used to validate the Xpert Xpress SARS-CoV-2 platform. Statistical analyses were performed using Statistical Package for the Social Sciences software (SPSS) version 18.0. Descriptive statistics, Fisher and Mann-Whitney tests were performed; kappa coefficient, and coefficient of determination and correlation were calculated. **Results:** One hundred fifty-five participants were recruited, and samples pairs of NPS/OPS and saliva were collected. The sensitivity and specificity of RT-PCR using saliva samples were 94.4% (95% CI 86.4 – 97.8) and 97.6% (95% CI 91.7 – 99.3), respectively. The accuracy of the test using saliva was 96.1%. Forty saliva samples from symptomatic participants were collected. In the Xpert Xpress assay, the median cycle threshold value of the E gene was 29.7, and of the N2 gene was 31.6. In the conventional assay, the median cycle threshold value of the E gene was 34.9, and of the RdRp gene was 38.3. The correlation between Xpert Xpress platform genes was 98%; between conventional PCR genes was 86%; and between E gene from the two assays was 78%. **Conclusions:** The use of self-collected saliva samples is an easy, convenient, and low-cost alternative to conventional NP swab-based molecular tests. These results can allow a broader use of molecular tests for management of COVID19 pandemic, especially in resources-limited settings.

Key-words: SARS-CoV-2; COVID-19; Saliva; Molecular diagnostics; GeneXpert.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE 2	Enzima conversora de angiotensina 2 (<i>Angiotensin converting enzyme 2</i>)
Bat-CoV	Coronavírus de morcego (<i>Bat Coronavirus</i>)
CD	Domínio de conexão (<i>Connector domain</i>)
CH	Hélice central (<i>Central Helix</i>)
Cov	Coronavírus (<i>Coronavirus</i>)
COVID-19	Doença do coronavírus-2019 (<i>Coronavirus Disease-2019</i>)
CT	Domínio citoplasmático (<i>Cytoplasmatic Tail</i>)
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
FDA	U.S Food and Drug Administration
FP	Peptídeo de fusão (<i>Fusion peptide</i>)
HCov	Coronavírus humano (Human coronavirus)
HR1	Região de repetição Heptad 1 (<i>Heptad repeat 1</i>)
HR2	Região de repetição Heptad 2 (<i>Heptad repeat 2</i>)
IC	Intervalo de confiança
ICVT	Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
KB	Kilobases
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
MERS-CoV	Coronavírus da Síndrome respiratória do Oriente Médio (<i>Middle East respiratory syndrome coronavirus</i>)
NPS	Swab nasofaríngeo (<i>nasopharyngeal swab</i>)
nm	Nanômetro
NTD	Domínio n-terminal (<i>N-terminal domain</i>)
OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde (<i>World Health Organization</i>)

OPS	Swab orofaríngeo (<i>Oropharyngeal swab</i>)
ORFs	Regiões Abertas de Leitura (<i>Open Reading Frames</i>)
PBS	Solução salina tamponada com fosfato (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real com transcrição reversa (<i>Real-time Polymerase Chain Reaction</i>)
RDB	Domínio de ligação com o receptor (<i>Receptor Binding Domain</i>)
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (<i>Reverse transcription Polymerase Chain Reaction</i>)
SARS-CoV	Coronavírus da Síndrome respiratória aguda grave (<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus</i>)
SARS-CoV-2	Coronavírus 2 da Síndrome respiratória aguda grave (<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>)
TM	Domínio transmembrana (<i>Transmembrane domain</i>)
UTRs	Regiões Não Traduzidas (<i>Untranslated region</i>)

LISTA DE TABELAS

Table 1.	Characteristics of participants enrolled in this study.....	44
Table 2.	Comparison for the detection of SARS-Cov-2 RT-PCR between NPS/OPS and saliva samples.....	45
Table 3.	Characteristics of participants who had discordant result on detection of SARS-Cov-2 RT-PCR by NPS/OPS or saliva.....	46
Table 1.2.	Positive samples Ct values for the two different molecular assays, by the target gene of SARS-CoV-2.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura do SARS-CoV-2.....	17
Figura 2.	Estrutura genômica do SARS-CoV-2.....	18
Figura 3.	Organização genômica do SARS-CoV-2 e as posições relativas dos genes-alvo.....	24
Figura 4.	Interpretação dos resultados do teste Xpert Xpress para SARS-CoV-2.....	28
Figura 5.	Exemplos de vírus que foram identificados através de testes moleculares de amplificação de ácido nucleico viral.....	30
Figura 6.	Dispositivos de coleta de saliva.....	32
Figure 1.	Correlation of Ct values between different assays and targeted SARS-CoV-2 genes for the positive samples (n = 20).....	58

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
3	REVISÃO DA LITERATURA	16
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS	34
5	RESULTADOS	38
5.1	ARTIGO ORIGINAL 1: Saliva is a Reliable, Non-invasive Specimen for SARS-CoV-2 Detection.....	39
5.2	ARTIGO ORIGINAL 2: Validation of the GeneXpert Xpress SARS-Cov-2 PCR assay using saliva as biological specimen	52
6	DISCUSSÃO	63
7	CONCLUSÕES	66
	REFERÊNCIAS	67
	ANEXOS	73
	ANEXO A – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.....	73
	ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	75
	ANEXO C – Artigo Publicado 1.....	79
	ANEXO D – Artigo Publicado 2	80
	ANEXO E – Artigo Submetido.....	81

1 INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019, a China relatou a Síndrome respiratória aguda grave de coronavírus 2 (SARS-CoV-2) como a causa da Doença por Coronavírus-2019 (COVID-19) (1). Embora as infecções pelo Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV) (2) e coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) (3) tenham uma taxa de mortalidade mais alta do que o SARS-CoV-2, a COVID-19 se espalhou muito mais rapidamente. Em 11 de março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) anunciou que a epidemia do novo coronavírus era uma pandemia e, até 05 de novembro de 2021, o número de casos acumulados globalmente era pouco mais de 248 milhões, associado a quase seis milhões mortes. O Brasil confirmou 21.835.785 de casos acumulados e 668.235 óbitos (4).

A transmissão direta de humano para humano do SARS-CoV-2 ocorre através da inalação de gotículas expelidas, por pessoas infectadas, ao tossir, espirrar ou mesmo falar. As transmissões causadas pelo contato com as membranas das mucosas nasais, ocular e oral também são possíveis. Vários sintomas clínicos estão associados à COVID-19, como febre, tosse, falta de ar, dor de garganta, dor torácica, cefaleia, anosmia e ageusia (5). Embora 80% dos casos apresentem sintomas leves, 20% destes podem desenvolver doença grave e cerca de 5% necessitarão de tratamento intensivo, principalmente aqueles com condições crônicas de saúde, incluindo cardiopatia, hipertensão arterial, diabetes e obesidade (6).

A detecção rápida e precisa do SARS-CoV-2 é uma etapa essencial no controle da pandemia e vários testes diagnósticos, incluindo detecção de antígeno, testes sorológicos e moleculares, foram desenvolvidos rapidamente (2). A reação em cadeia da polimerase em tempo real com transcrição reversa (qRT-PCR) é o teste padrão de referência para detecção de SARS-CoV-2, seja em ensaios com metodologia *in house*, totalmente automatizados ou baseados em cartucho. No entanto, tais ensaios moleculares usam espécimes respiratórios (esfregaços orofaríngeos e nasofaríngeos, lavado broncoalveolar, aspirado traqueal) (7-9). No entanto, a coleta de swabs orofaríngeos e nasofaríngeos causa desconforto ao paciente, o que pode reduzir a possibilidade de consentimento para mais de uma

testagem, além de representar risco considerável para os profissionais de saúde, devido ao seu potencial de induzir o paciente a espirrar ou tossir, expelindo partículas virais (10).

Estudos anteriores mostraram que amostras de saliva para detecção de vírus respiratórios têm sensibilidade semelhante ou até mesmo superior às amostras de swab (11-12). Estudos recentes relataram o uso de fluidos orais/ saliva para a detecção de SARS-CoV-2 (13-17). O uso da saliva como amostra para diagnóstico da COVID-19 apresenta várias vantagens como: facilidade; possibilidade de auto coleta, inclusive em ambiente não laboratorial; não necessitar de pessoal especializado para a coleta; proporcionar maior conforto para o paciente quando comparada ao uso de swabs nasofaríngeos / orofaríngeos (16). Também proporciona economia de tempo e de recursos, pois não requer o uso de equipamentos de proteção individual nem solução de transporte viral.

A utilização de amostras precisas e não invasivas para detecção do SARS-CoV-2 pode facilitar medidas eficazes de controle da pandemia em larga escala, proporcionando resultados de testes moleculares mais rápidos e com menores custos, retardando assim a disseminação da COVID-19.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Validar o uso da saliva como amostra biológica para o diagnóstico de COVID-19.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Avaliar o desempenho da Plataforma Xpert Xpress SARS-CoV-2 quando comparada ao teste convencional de qRT-PCR.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 SARS-COV-2 E COVID-19

Os coronavírus humanos (HCoVs) são membros do grupo dos coronavírus (CoVs) responsáveis por múltiplas doenças respiratórias, com diferentes graus de severidade, como gripe, bronquiolite e pneumonia (18). Atualmente os HCoVs são bem conhecidos pela sua rápida evolução devido à alta taxa de substituição de nucleotídeos e taxa de recombinação (19). Desde o início do século XXI, os HCoVs têm surgido periodicamente em diferentes lugares ao redor do mundo, estando relacionados com os maiores surtos fatais de pneumonia humana (1).

O primeiro surto de CoV foi de SARS-CoV e teve início em novembro de 2002, em Foshan, China (20), se transformando numa infecção mundial em 2003, com taxas de letalidade global de 10% (21). A segunda pandemia de HCoV surge uma década mais tarde, em junho de 2012, em Jeddah, Arábia Saudita (20). Causada pelo MERS-CoV, alcançou taxas globais de fatalidade de 35% (22).

Em dezembro de 2019, em Wuhan, província da China, ocorreu a terceira e maior explosão de HCoV, causada por uma nova cepa altamente homóloga de SARS-CoV, classificada como Coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2). Em 30 de janeiro de 2020, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou a epidemia pelo novo vírus como uma emergência em saúde de preocupação internacional (23).

Em 11 de fevereiro de 2020, a OMS nomeou oficialmente o atual surto como Doença do Coronavírus-2019 (COVID-19) (24) e o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) nomeou o vírus como SARS-CoV-2 (25).

3.1.1 Estrutura do SARS-CoV-2

Os coronavírus são vírus envelopados, com genoma composto por uma molécula de Ácido Ribonucleico (RNA), fita simples, não segmentado, de polaridade positiva (+ssRNA). Os virions são esféricos, com aproximadamente 80-220 nm. Com base na filogenia e taxonomia, o SARS-CoV-2 foi classificado pelo ICTV como um vírus da espécie Severe acute respiratory syndrome-related

coronavirus (SARSr-CoV), pertencente ao gênero *Betacoronavirus*, subfamília *Coronavirinae*, família *Coronaviridae*, ordem *Nidovirales* (26).

O nucleocapsídeo viral é helicoidal, sendo formado por múltiplas cópias de nucleoproteína (N) que estão associadas ao RNA genômico. Envolvendo o nucleocapsídeo está o envelope, formado por uma bicamada lipídica, na qual estão ancoradas as proteínas estruturais de membrana (M), envelope (E) e espícula (S) (27-28). Os trímeros de proteína S dos coronavírus formam espículas na superfície do vírus, conferindo-lhes aparência de coroa quando observados em microscópio eletrônico, o que deu origem ao nome “coronavírus” (28) (Figura 1).

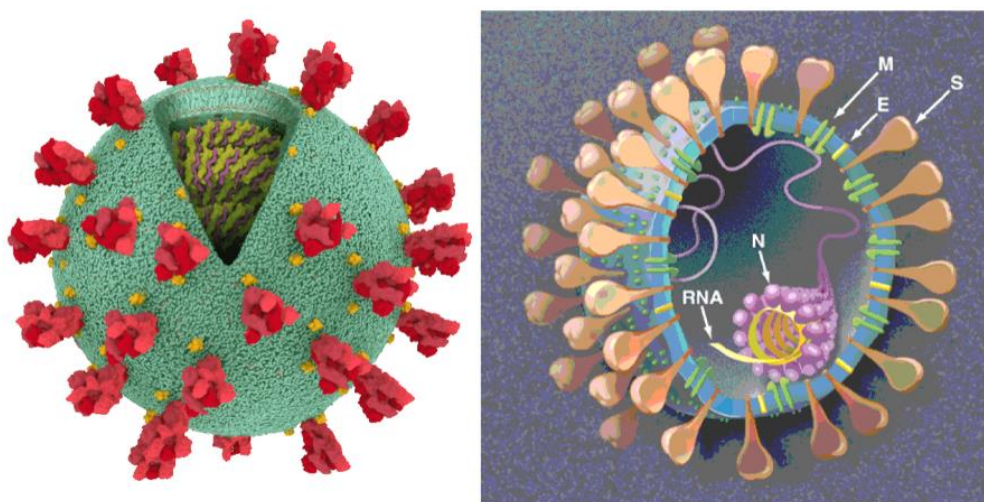


Figura 1: Estrutura do SARS-CoV-2
Fonte: Uzunian, 2020.

O genoma do SARS-CoV-2 possui aproximadamente 30 kb e, junto com os demais coronavírus, está entre os maiores vírus de RNA já identificados até o momento (Figura 2) (25)(29). O RNA genômico apresenta Cap na extremidade 5', cauda de poli-A na extremidade 3', além de duas Regiões Não Traduzidas (UTRs) nestas extremidades. Mais internamente ao genoma existe um número variado de Open Reading Frames (ORFs). A ORF 5' (ORF1a/b) corresponde a 2/3 de todo o genoma viral, sendo traduzida no retículo endoplasmático rugoso da célula hospedeira, nas poliproteínas pp1a e pp1ab, precursoras de 16 proteínas não estruturais, envolvidas na transcrição e replicação do vírus. A ORF 3' consiste nos genes que codificam proteínas acessórias e estruturais. O restante do genoma codifica as principais proteínas estruturais S, E, M e N, além de pelo menos seis

proteínas acessórias, codificadas pelos genes ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF8 e ORF10 (27-28).

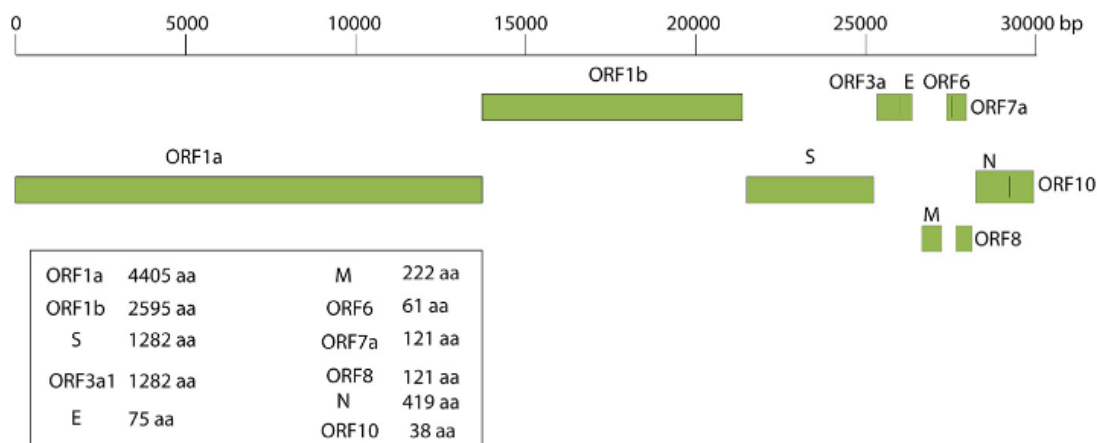


Figura 2: Estrutura genômica do SARS-CoV-2

Fonte: Giovanetti et al, 2021.

A proteína S é a responsável por mediar a entrada dos coronavírus na célula hospedeira através do reconhecimento do receptor, a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2). A estrutura proteica é dividida em duas subunidades funcionais, conhecidas como S1 e S2. A região S1 consiste nos domínios N-terminal (NTD) e de ligação com o receptor – do inglês *Receptor Binding Domain (RBD)*, que medeia a ligação do vírus ao receptor da célula hospedeira, sendo essencial para a determinação do tropismo celular e a capacidade de transmissão viral. A subunidade S2 tem como função fundir as membranas do vírus e da célula hospedeira. Contém um peptídeo de fusão (FP), regiões de repetição Heptad (HR1 e HR2), região transmembrana (TM), domínio de conexão (CD), hélice central (CH) e um domínio citoplasmático (CT). Entre os domínios S1 e S2, existem sítios de clivagem, que podem sofrer ação de proteases celulares, de acordo com o tipo de coronavírus (30).

A proteína E é a menor proteína estrutural e está presente no vírion em menor quantidade que as demais proteínas estruturais, apesar de ser abundantemente expressa na célula hospedeira durante a replicação, atuando no desencadeamento do processo de montagem da partícula viral e brotamento (31).

A proteína M é a mais abundante no envelope, atua na montagem das partículas virais, determina o sítio de brotamento do vírus e a forma do envelope

viral. Sua interação com a proteína N estabiliza o nucleocapsídeo (25)(31). A proteína N forma o nucleocapsídeo e está envolvida na síntese e tradução do RNA, além de atuar como antagonista de interferon e repressor de RNA de interferência, o que parece favorecer a replicação viral (25)(32).

3.1.2 Origem e evolução do SARS-CoV-2

A organização genômica do SARS-CoV-2 compartilha cerca de 89% de identidade de sequência com a de outros CoVs. Análises comparativas de sequências do genoma do SARS-CoV-2 indicam semelhanças marcantes com as sequências de coronavírus de morcego (Bat-CoV), sugerindo que a cepa que infectou humanos em Wuhan possa ter origem nos morcegos (33). A possibilidade de haver outros hospedeiros (animais) intermediários entre os morcegos e os humanos foi discutida.

Acreditava-se que a origem da COVID-19 em humanos tivesse ocorrido através do pangolim, particularmente com base na descoberta de que o vírus destes animais pode usar a ACE2 como receptor nas células hospedeiras. No entanto, resultados mais recentes, utilizando diversas abordagens experimentais, detectaram uma fraca afinidade entre o vírus do pangolim para o receptor ACE2 humano, o que aparentemente isentou os pangolins de um possível papel como hospedeiro intermediário. A questão do hospedeiro intermediário na transmissão do SARS-CoV-2 de morcegos para humanos, portanto, não está resolvida, e parece possível que a transmissão ocorra diretamente. A epidemiologia molecular revelou que a passagem do vírus de morcegos para humanos provavelmente ocorreu entre novembro e dezembro de 2019, e que a partir desse momento a propagação viral ocorreu principalmente pela transmissão de pessoa para pessoa (34).

É comum, em vírus de RNA, uma rapidez nas taxas de substituição de nucleotídeos e essa rápida evolução pode ser moldada principalmente pela seleção natural. A alta taxa de erro viral somada à sua rápida evolução nas populações pode levar ao acúmulo de mutações em aminoácidos, que conseqüentemente pode interferir na transmissibilidade, tropismo e patogenicidade do vírus (35). Os coronavírus são relativamente estáveis devido ao seu mecanismo de correção de erros durante a replicação, no entanto diversas análises genéticas têm identificado

mutações no genoma do SARS-CoV-2, incluindo deleções e alterações de aminoácidos (36-37).

A primeira mutação identificada foi a D614G, na posição 614 da proteína S da cepa de referência de Wuhan, que se espalhou rapidamente pela Europa e América do Norte. No início da pandemia, a maioria das cepas virais tinha um ácido aspártico (D) nessa posição, mas desde março de 2020, uma variante surgiu apresentando uma glicina (G) (37-38).

Outra mutação importante é a N501Y, presente no RBD da proteína S. No sítio 501, o aminoácido tirosina (N) foi substituído pelo aminoácido asparagina (Y). A mutação foi detectada em setembro de 2020 no Reino Unido, onde foram identificadas duas linhagens de SARS-CoV-2 carreando esta alteração genética (39). A primeira linhagem, denominada “501Y variante 1” circulou no País de Gales, não excedendo 2% das amostras sequenciadas. Já a linhagem identificada posteriormente denominada “501Y variante 2” (linhagem B.1.1.7, 20B/501Y.V1 ou VOC-202012/01) começou a circular no final de setembro de 2020, tornando-se a linhagem dominante no Reino Unido em dezembro do mesmo ano. Mutações na posição 501 da proteína S foram identificadas também em outras linhagens. A variante 501Y.V2 (B.1.351) surgiu na África do Sul, no início de outubro de 2020 e se espalhou rapidamente para regiões próximas. A variante africana abriga várias mutações, incluindo três (K417N, E484K e N501Y) no RBD da proteína S, que podem estar associadas à maior transmissibilidade (40).

No Brasil, foram identificadas duas novas linhagens, P1 e P2, originadas da linhagem B.1.1.28. A linhagem P1, identificada em Manaus- Amazonas, que apresenta as mutações N501Y, E484K e K417N; e a linhagem P2, detectada no Rio de Janeiro em outubro de 2020, que exhibe a mutação E484K no RBD da proteína S (41).

A variante Delta (linhagem B.1.617.2) foi detectada pela primeira vez em dezembro de 2020, na Índia, e se tornou a variante mais comumente relatada no país a partir de meados de abril de 2021, se espalhando rapidamente por mais de 60 países, incluindo o Brasil (42). Apresenta mutações significativas na proteína S como a E484Q, L452R e P614R, que facilitam a ligação das espículas virais aos receptores ACE-2. Desta forma o vírus pode infectar e se replicar mais rápido, escapando do sistema imunológico e aumentando o poder de transmissibilidade. A doença causada por esta variante também pode exibir sintomas diferentes de

outras cepas anteriormente descritas e ser responsável por casos graves de COVID-19 e aumento no número de hospitalizações (42).

Os efeitos dessas mutações sobre a patogenicidade e antigenicidade do vírus ainda não foram completamente elucidadas. Diante disso, a avaliação do impacto das mutações sobre a eficácia das vacinas, intervenções terapêuticas e recursos diagnósticos exigirá o monitoramento constante da evolução do SARS-CoV-2 e da imunidade do hospedeiro.

3.1.3 Ciclo replicativo do SARS-Cov-2

Os coronavírus causadores da síndrome respiratória aguda exibem típicas estratégias de replicação e transcrição após a infecção da célula hospedeira. A ligação do HCoV com o receptor celular é a fase inicial da infecção viral: a região RBD da subunidade S1 da glicoproteína viral S interage com receptores de membrana da célula hospedeira (30). A especificidade entre a região RBD da glicoproteína S e os receptores celulares é variável entre as espécies de coronavírus. SARS-CoV e o SARS-CoV-2 ligam-se ao receptor ACE2. Em humanos, este receptor é amplamente expresso em células epiteliais dos alvéolos pulmonares, em enterócitos do intestino delgado, em células endoteliais venosas e arteriais (43) e em células da mucosa oral (44).

Uma vez que ocorre a adsorção da partícula viral à célula-alvo, a glicoproteína S de SARS-CoV-2 é então clivada entre as subunidades S1 e S2, através da ação de proteases celulares. Esta etapa é crucial para entrada do vírus na célula, pois com a proteólise, há exposição do peptídeo de fusão, que mediará a fusão do envelope viral com a membrana celular. Existem várias proteases celulares que podem atuar sobre as proteínas virais, especificidade que varia entre os CoVs e que impacta diretamente no tropismo e disseminação viral (45).

Em seguida, o RNA viral é liberado no citoplasma da célula, podendo já ser imediatamente transcrito. A transcrição acontece utilizando-se da maquinaria celular, iniciando-se pelas ORF1a e ORF1b, que codificam as poliproteínas pp1a e pp1ab. Estas são subsequentemente clivadas em proteínas não estruturais, que compreendem proteases e enzimas do complexo replicase-transcriptase, como a RNA-polimerase RNA dependente, o domínio da RNA helicase e a exoribonuclease (30). A montagem desse complexo cria um ambiente favorável à síntese de RNA

viral, que é então iniciada para gerar tanto RNA genômico, posteriormente utilizado na montagem de novas partículas virais, quanto RNA subgenômico. Os RNA subgenômicos atuam como RNA mensageiro, sendo posteriormente traduzidos nas proteínas estruturais M, E e S (30).

Na sequência, ocorre a montagem dos vírions maduros, através da associação da proteína N ao RNA e brotamento das proteínas estruturais. Os vírions são posteriormente transportados para a superfície celular, onde ocorre a liberação das partículas virais por exocitose (30).

3.1.4 Características clínicas da COVID-19

A patogênese da infecção pelo SARS-CoV-2 em humanos se manifesta desde sintomas leves, até insuficiência respiratória grave. Diversos sintomas clínicos são associados à COVID-19, como febre, tosse, falta de ar, dor de garganta, dor no peito, dor de cabeça, anosmia e ageusia (5). Apesar de 80% dos casos apresentar sintomas leves, os 20% remanescentes podem evoluir para doença severa, destes 5% podem necessitar de tratamento intensivo, especialmente aqueles com condições crônicas de saúde, incluindo cardiopatia, hipertensão arterial, diabetes e obesidade (6).

Ao infectar as células epiteliais do trato respiratório, o vírus começa a se replicar e vai migrando para as vias aéreas inferiores até atingir as células epiteliais alveolares. A rápida replicação do SARS-CoV-2 nos pulmões pode desencadear uma resposta imunológica exacerbada, conhecida como tempestade de citocinas, que causa síndrome do desconforto respiratório agudo e insuficiência respiratória (5)(46). A falência de múltiplos órgãos também foi relatada em alguns casos da doença (1).

A transmissão direta de humano para humano do SARS-CoV-2 ocorre através da inalação de gotículas ao tossir, espirrar ou mesmo falar, e as transmissões causadas pelo contato com as membranas mucosas nasal, ocular e oral também são possíveis (5).

3.2 DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR SARS-COV-2

Desde o início da pandemia de COVID-19, diversos testes para o coronavírus vêm sendo desenvolvidos, uma vez que o diagnóstico precoce é crucial para controlar a disseminação da doença. Os testes imunológicos identificam anticorpos (IgM, IgG, IgA) produzidos pelo sistema imune em resposta à uma ameaça, como a infecção pelo SARS-CoV-2. Os anticorpos podem levar vários dias ou semanas para serem produzidos após a infecção, e alguns deles podem permanecer após a recuperação. Os testes diagnósticos identificam uma infecção ativa pelo coronavírus: os testes de antígenos identificam proteínas virais específicas (proteína S e/ou N); e os testes moleculares identificam o material genético viral (47). Até agosto de 2021, a agência federal do departamento de saúde e serviços humanos dos Estados Unidos (*Food and Drug Administration - FDA*) autorizou de forma emergencial a utilização e comercialização de 402 testes e dispositivos de coleta de amostras. Isso inclui 282 testes moleculares, 87 testes de anticorpos e de resposta imunológica e 33 testes de antígenos (48).

3.2.1 Ensaios moleculares para identificação do SARS-CoV-2

Testes moleculares que identificam o RNA do SARS-CoV-2 são considerados o padrão de referência no mundo atualmente. Muitos kits comerciais e protocolos *in house* para a reação em cadeia da polimerase (PCR) estão disponíveis e os alvos para a detecção do vírus incluem os genes que codificam as proteínas N, E e S; a Orf1ab; e o gene da RNA polimerase dependente de RNA (RdRP), que está localizado dentro da Orf1ab (49)(50) (Figura 3). A escolha dos alvos para a execução de um ensaio molecular deve ser assertiva pois pode afetar a sensibilidade e especificidade dele. O gene E é altamente conservado dentre todos os beta-coronavírus, e o gene N pode apresentar reação cruzada com outros coronavírus (51). Os genes S e RdRP podem ser usados para diferenciar o SARS-CoV-2 do SARS-CoV (52).

No início do surto de COVID-19, a OMS disponibilizou sete ensaios RT-PCR para o diagnóstico da doença, desenvolvidos por cientistas de todo o mundo

(Figura 2). Estes protocolos fornecem acesso a diretrizes técnicas padrão para a detecção do RNA viral. Corman e colaboradores (2020), da Charité, Alemanha, publicaram em 23 de janeiro de 2020 o primeiro o protocolo de qRT-PCR direcionado aos genes RdRP e E do SARSCoV-2. O ensaio direcionado ao gene RdRP resultou na maior sensibilidade (3,6 cópias de RNA / reação com probabilidade de 95% de detecção) (9). Diversos outros protocolos estão disponíveis e utilizam desde um gene até a combinação de três regiões genômicas diferentes.

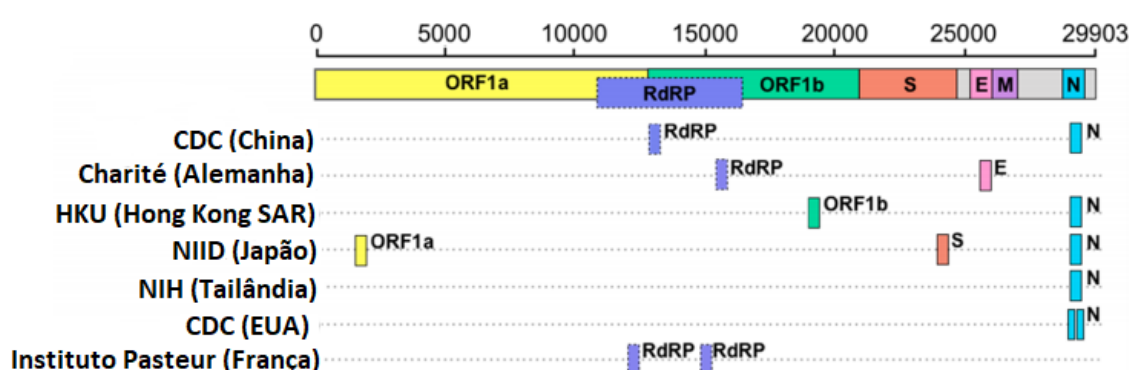


Figura 3: Organização genômica do SARS-CoV-2 e as posições relativas dos genes-alvo utilizados em sete protocolos de RT-PCR *in house*, disponibilizados pela OMS.

Fonte: Adaptado de Feng, et al, 2020.

Observa-se um grande progresso no diagnóstico molecular da COVID-19, com muitos protocolos desenvolvidos em um tempo muito curto. No entanto, a detecção molecular pode ser afetada por diversos fatores. Resultados falsos negativos de pacientes verdadeiro positivos para COVID-19 podem desencadear efeitos prejudiciais, como atrasos no atendimento a pacientes doentes e aumento do risco de transmissão (53).

Embora o SARS-CoV-2 apresente tendência a iniciar a infecção através da entrada pelas cavidades orais ou nasais, durante a infecção ativa o vírus se espalha para o sistema respiratório inferior, onde se estabelece e replica. A carga viral em uma amostra varia com o tempo de infecção e o local a partir do qual a amostra é coletada. Por exemplo, a carga viral de um mesmo paciente pode variar em amostras de swabs nasais e orais, dependendo da data de coleta após o início dos sintomas (54). O número de partículas virais no trato respiratório superior é

maior no início da infecção e tende a diminuir com o tempo (55). A dinâmica da variação de cargas virais em diferentes locais durante a progressão da doença pode complicar a coleta de amostras, contribuindo para assim para resultados falsos negativos (53).

Outro fator que contribui para resultados falso-negativos é o surgimento de novas variantes de SARS-CoV-2. A perda ou alteração de determinados aminoácidos do vírus pode influenciar a capacidade de detecção de um ensaio molecular que emprega sondas voltadas à identificação de determinada região genômica viral. A sonda pode perder a capacidade de se ligar ao *amplicon*, gerando assim um resultado falso-negativo. Ressalta-se neste contexto, a importância da utilização de mais de um alvo molecular nas reações de PCR (56).

Além dos fatores comentados acima, o manuseio e tratamento das amostras, como coleta inadequada; degradação do RNA viral durante o transporte e armazenamento; extração e purificação ineficientes de RNA, também podem contribuir para resultados falso-negativos (53).

Embora resultados positivos de PCR sejam indicativos de infecção pelo SARS-CoV-2, resultados negativos não excluem a infecção viral. Portanto, o diagnóstico molecular deve ser usado de forma combinada com testes sorológicos, observações clínicas, história de exposição do paciente e informações de rastreamento epidemiológico (53).

3.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase

A reação em cadeia da polimerase, ou *polymerase chain reaction* (PCR) é uma técnica de biologia molecular utilizada para amplificar cópias de fragmentos de DNA, a partir de uma molécula molde, gerando milhares a milhões de cópias de uma determinada sequência genética. A PCR foi desenvolvida em 1983 e desde então vem sendo muito utilizada nos laboratórios clínicos e de pesquisa para diversas aplicações, como por exemplo, a detecção de patógenos, diagnóstico e monitoramento de doenças (57).

A PCR está desenhada de acordo com o princípio natural de replicação do DNA. A técnica utiliza um DNA molde, extraído da amostra biológica; uma enzima

polimerase de DNA (*Taq* DNA polimerase); iniciadores (*primers*), que são fragmentos de DNA curtos complementares à sequência alvo a ser amplificada; desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs), além de água e outros reagentes que irão garantir as condições ideais da reação. A técnica depende de ciclos térmicos, com aquecimentos e resfriamentos repetidos, que se repetem em um número específico de vezes. Cada ciclo de PCR consiste em três etapas: 1- desnaturação do DNA molde; 2- anelamento dos *primers*; extensão do fragmento de DNA recém-copiado. O produto amplificado (*amplicon*) é avaliado de forma qualitativa, normalmente através de uma eletroforese em gel, quando o DNA alvo acumulado pode ser observado (58).

Existem algumas variações da técnica básica de PCR, que são aplicadas a depender do que se deseja identificar, da amostra biológica utilizada e da região genômica a ser amplificada. Na transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), as moléculas de RNA são convertidas em DNA complementar (cDNA) através da enzima transcriptase reversa, e os cDNAs recém-sintetizados são então amplificados através dos mesmos procedimentos apresentados para a PCR convencional. A RT-PCR permite amplificar amostras cujo material genético é RNA, logo sua aplicação é amplamente utilizada para detecção de patógenos virais (48)(58).

A reação em cadeia da polimerase em tempo real é também conhecida como PCR quantitativo (qPCR). A técnica se baseia na detecção de um sinal fluorescente produzido proporcionalmente durante a amplificação de um alvo de DNA, o que permite a quantificação do material amplificado em tempo real. Enquanto o PCR convencional identifica o DNA alvo acumulado após um número fixo de ciclos, os ensaios em tempo real determinam o ponto no tempo durante o ciclo, quando a amplificação de um produto de PCR é detectada primeiro. Isto é determinado identificando o número do ciclo no qual a intensidade de emissão da fluorescência atinge um limiar acima do ruído de fundo. Esse número de ciclo é conhecido como o ciclo de limiar (Ct). O Ct é determinado na fase exponencial da reação de qPCR e é inversamente proporcional ao número de cópias do material genético. Assim, quanto maior o número de cópias iniciais do ácido nucleico alvo, mais cedo é observado um aumento significativo na fluorescência, logo menor será o Ct (58-59).

A qPCR pode ser utilizada como um ensaio qualitativo e quantitativo, uma vez que existe uma correlação linear entre o produto de PCR e a intensidade de

fluorescência emitida, que pode ser utilizada para calcular a quantidade de ácido nucléico presente no início da reação (59). A grande vantagem desta técnica é a rapidez na obtenção dos resultados e a possibilidade de ser utilizada em associação à RT-PCR e outras variações da PCR, principalmente na área diagnóstica.

3.2.3 Plataforma Xpert Xpress SARS-CoV-2

O teste Xpert Xpress SARS-CoV-2 é destinado ao diagnóstico *in vitro* automatizado para a detecção qualitativa do RNA do SARS-CoV-2. Consiste num ensaio de RT-PCR em tempo real realizado nos sistemas de instrumentos GeneXpert, que automatizam e integram a preparação de amostras, a extração e amplificação de ácidos nucleicos e a detecção das sequências-alvo em amostras biológicas. Os sistemas utilizam cartuchos independentes e descartáveis, o que minimiza a reação cruzada entre as amostras (60).

Cada cartucho contém os reagentes necessários para a extração de RNA e amplificação do material genético, além de um controle de processamento da amostra (SPC) e um controle de verificação de sonda (PCC). As funções do SPC são: controlar o processamento adequado da amostra; monitorar a presença de inibidores de PCR; assegurar que as condições de temperatura e tempo da reação de PCR estão apropriadas; e garantir que os reagentes da estão funcionais. O PCC verifica a reidratação dos reagentes, o enchimento do tubo de PCR, além de confirmar a presença de todos os componentes da reação no cartucho, incluindo o monitoramento da integridade da sonda e da estabilidade do corante (60).

O teste está padronizado para utilizar amostras de swab de nasofaringe e orofaringe; lavado/aspirado nasal e saliva (61). A amostra é transferida para a câmara de amostra do cartucho e este é então carregado na plataforma do sistema do instrumento GeneXpert. O tempo total de reação é 45 minutos. Os genes alvo do teste são o gene E e gene N2. Os resultados podem ser considerados “positivo”, “presuntivo positivo”, “negativo” ou “inválido”, sendo interpretados automaticamente pelo sistema com base na amplificação dos genes-alvo, e do SPC, como apresentado na Figura 4. O limite de detecção do teste são 250 cópias do RNA viral por mL e o Ct menor do que 45 (60) (62).

Texto do resultado	N2	E	SPC
SARS-CoV-2 POSITIVO (SARS-CoV-2 POSITIVE)	+	+/-	+/-
SARS-CoV-2 POS. PRESUNTIVO (SARS-CoV-2 PRESUMPTIVE POS)	-	+	+/-
SARS-CoV-2 NEGATIVO (SARS-CoV-2 NEGATIVE)	-	-	+
INVÁLIDO (INVALID)	-	-	-

Figura 4: Interpretação dos resultados do teste Xpert Xpress SARS-CoV-2.
Fonte: Adaptado de Cepheid, 2020.

3.3 SALIVA NO DIAGNÓSTICO DE COVID-19

3.3.1 A saliva no diagnóstico de doenças

O fluido bucal total humano é um termo amplo que inclui saliva, fluidos das fendas gengivais, transudato da mucosa oral, muco da cavidade nasal e da faringe, bem como produtos resultantes do metabolismo bacteriano, restos alimentares e células epiteliais descamadas (63). Este biofluido não só fornece lubrificação, proteção, defesa oral e ajuda na fala, mas também tem sido reconhecido como um dos fluidos corporais mais importantes para o diagnóstico de doenças, tanto orais quanto sistêmicas. O fluido bucal total é um termo usado alternadamente com “saliva”, sendo usado nas ciências forenses e toxicologia (64).

A saliva é um líquido hipotônico secretada por três pares de glândulas salivares principais (parótida, submandibular e glândulas sublinguais), além de glândulas salivares menores presentes na cavidade oral (65). Essas glândulas são muito permeáveis e rodeadas de capilares sanguíneos, o que permite o intercâmbio de moléculas e biomarcadores, que são secretados juntamente com a saliva (66). A análise bioquímica da saliva humana revela que ela é composta de constituintes inorgânicos (sódio, potássio, cálcio, magnésio, cloreto e fosfato) e

constituintes orgânicos (proteínas e componentes não proteicos). Os componentes proteicos da saliva humana incluem amilase, mucinas, lisozima, IgA, lactoferrina, proteínas ricas em prolina, histatinas, catelicidinas, defensinas, glicoproteínas, lipoproteínas, estaterinas e metaloproteases de matriz (67).

Nas últimas duas décadas, a saliva humana tem sido cada vez mais utilizada como um difluído para o diagnóstico e prognóstico de doenças orais e sistêmicas, incluindo doenças autoimunes, doenças periodontais, câncer oral e de pulmão, diabetes, doenças cardiovasculares e infecções virais (66).

O diagnóstico de infecções virais depende de biomarcadores salivares como ácido nucleico viral (DNA e/ou RNA), antígenos e anticorpos. A dengue, por exemplo, é uma doença que pode ser diagnosticada através da saliva, apesar de não ser a amostra biológica rotineiramente utilizada, com a identificação do RNA do vírus da dengue (DENV), de antígenos como a proteína 1 não estrutural e de IgM a IgG anti-dengue. Outro exemplo é no recente surto do vírus Zika (ZIKV), que o RNA viral foi detectado na saliva de pacientes no estágio agudo da doença (68). Isso se seguiu a estudos anteriores na Polinésia Francesa que relataram a presença de ZIKV na saliva de uma mãe e de seu filho(69). Em uma revisão publicada por Corstjens e colaboradores (2000), os pesquisadores elencam diversas infecções virais que podem ser diagnosticados através de biomarcadores de fluidos orais, incluindo a saliva. A Figura 5 apresenta alguns exemplos de vírus que foram identificados através de testes moleculares de amplificação de ácido nucleico viral (70).

VÍRUS	GRUPO DE PACIENTES
Vírus da Dengue	Pacientes febris hospitalizados
Enterovírus	Autoimunidade de células beta
Vírus da Hepatite A	Indivíduos expostos durante surto de hepatite
Vírus da Hepatite B	Pacientes com casos agudos de hepatite
Vírus da Hepatite C	Pacientes de gastroenterologia

Papilomavírus Humano	Pacientes de triagem
Vírus Influenza	Crianças acima de 17 anos
Vírus do Sarampo	Parotidite clínica
Vírus da Raiva	Indivíduos hospitalizados
Vírus do Mosaico do tabaco	Fumantes
Vírus Epstein-Barr	Indivíduos infectados com HIV
SARS-CoV	Indivíduos sintomáticos

Figura 5: Exemplos de vírus que foram identificados através de testes moleculares de amplificação de ácido nucleico viral.

Fonte: Adaptado de Corstjens et al, 2000.

No diagnóstico de vírus respiratórios, a saliva também tem se mostrado uma excelente amostra biológica na detecção molecular dos vírus influenza A, influenza B, vírus sincicial respiratório (SRV), metapneumovírus humano, adenovírus, vírus parainfluenza (tipos 1, 2 3 3) (11)(71) e SARS-CoV (12).

Dois estudos de coorte realizados no Hospital Queen Mary, em Hong Kong, compararam a capacidade de identificação de vírus respiratórios e suas respectivas cargas virais em amostras de aspirados de nasofaringe e saliva. Os ensaios moleculares utilizados foram de PCR multiplex (vírus influenza A/B, vírus sincicial respiratório, metapneumovírus humano, adenovírus, vírus parainfluenza 1-3) e a plataforma Xpert Xpress (vírus influenza A/B e vírus sincicial respiratório). Os resultados identificaram a presença de todos os vírus nas amostras de saliva e com carga viral mais alta (para alguns vírus) na saliva quando comparado às demais amostras respiratórias (11)(71).

Sabe-se que tanto o SARS-CoV quanto o SARS-CoV-2, podem ser transmitidos de forma eficiente entre humanos através da geração de gotículas ao falar, tossir ou espirrar. Além disso, interagem com o ACE2 nas células do hospedeiro, expresso nos pulmões, esôfago, íleo, cólon, fígado, bexiga, na glândula salivar e língua (43). Assim, vírus viáveis podem ser encontrados em amostras de saliva, o que torna a cavidade oral um bom reservatório para SARS-

CoVs. Um estudo realizado no Hospital Universitário Nacional de Taiwan revelou uma grande quantidade de RNA isolado ($\pm 6,38 \times 10^8$ cópias/mL) da saliva de pacientes com SARS-CoV. Neste trabalho, o qRT-PCR foi utilizado para investigar a carga viral nas amostras de 17 pacientes sintomáticos com linfopenia, níveis elevados de creatinoquinase trombocitopenia, e pneumonia comprovada através de raio-x de tórax (12).

Não existe um protocolo padrão para a coleta de saliva para fins diagnósticos. O espécime pode ser coletado através de dispositivos, específicos garantindo uma coleta segura e estéril sem comprometer a qualidade e quantidade da amostra (72). A Figura 6 mostra os dispositivos de saliva disponíveis comercialmente e suas respectivas marcas. Os mesmos estão disponíveis para uso tanto na pesquisa quanto em laboratórios de rotina para coleta de saliva (73). No entanto, o uso destes dispositivos vem sendo discutido, podendo não ser tão vantajoso por representar um custo extra, nem sempre viável para certos centros de saúde; além de necessitar do auxílio de um profissional de saúde para a coleta adequada (11).

A forma mais simples e de menor custo é a auto-coleta de saliva. As diferentes abordagens incluem técnica de babar, indução de tosse ou cuspe. Nesta última, o paciente é orientado a cuspir repetidas vezes dentro de um coletor estéril. A coleta pode acontecer fora do ambiente laboratorial/ de saúde, o que proporciona maior conforto ao paciente, além de dispensar a presença de um profissional de saúde (16).



Figura 6: Dispositivos de coleta de saliva. (A) Salivette® (Sarstedt); (B) Quantisal® (Immunoanalysis); (C) SCS® (Greiner-BioOne), (D) Versi_SAL®, e (E) Super_SAL, da Oasis Diagnostics® Corporation
Fonte: Adaptado de Khurshid et al, 2020.

3.3.2 Identificação do SARS-CoV-2 e diagnóstico da COVID-19

Uma das estratégias de controle da pandemia de COVID-19 reside em testar o maior número possível de indivíduos, inclusive os assintomáticos. A OMS recomenda a testagem através de ensaios moleculares, com a coleta de espécimes do trato respiratório superior, como swabs nasofaríngeos e orofaríngeos; e do trato respiratório inferior, como aspirado traqueal e lavado broncoalveolar (4).

No entanto, a coleta destas amostras apresenta uma série de desvantagens como: desconforto do paciente, que pode sentir dor e incômodo, sangramento nasal e ânsia de vômito; necessidade da coleta acontecer dentro de um ambiente controlado (laboratório ou centro de saúde); necessidade de profissional de saúde treinado fazendo uso de equipamentos de proteção individual; uso de instrumentos específicos; exposição da equipe de saúde, uma vez que o paciente pode tossir ou espirrar durante a coleta; tempo de coleta; e principalmente, dificuldade ou impossibilidade de auto coleta, sendo um dos fatores que limita a ampliação dos testes (16)(11).

Neste cenário, o uso da saliva como espécime para diagnóstico da COVID-19 se mostra bastante promissor por não ser um procedimento invasivo, ser mais

cômodo e confortável para o paciente, poder ser auto coletada, possuir protocolos de coleta simples, dispensar a presença de profissional de saúde, ser mais rápido, com melhor custo-benefício (61).

Diversos estudos vêm relatando o uso da saliva como amostra biológica na detecção do SARS-CoV-2. Na revisão integrativa conduzida por da Silva e colaboradores (2020), 25 estudos compararam o uso de saliva em relação às demais amostras respiratórias para a detecção de SARS-CoV-2 e obtiveram resultados promissores. Tanto quanto ao uso da saliva como amostra biológica como seu uso para o diagnóstico e monitoramento da doença. Em todos os estudos sensibilidade e especificidade alcançaram valores acima de 90%. Nove estudos compararam diretamente o uso de saliva na detecção de SARS-CoV-2 com amostras respiratórias e demonstraram resultados de saliva imprecisos, com menor sensibilidade à saliva como uma amostra diagnóstica e um menor tempo de eliminação viral em comparação com amostras do trato respiratório. Cinco estudos não compararam diretamente o uso de saliva na detecção do SARS-CoV-2 com amostras respiratórias. Avaliaram amostras de saliva em coletadas em diferentes momentos durante o dia e em diferentes tempos da infecção (44).

Assim, a saliva se mostra ser um recurso promissor na detecção do SARS-CoV-2, tendo demonstrado desempenho semelhante aos swabs orais e de nasofaringe, além de vantagens como baixo custo, possibilidade de monitoramento do curso da doença, método não invasivo e evitando contato próximo com profissionais de saúde. Além disso, amostras salivares são uma boa alternativa para estudos epidemiológicos, detecção de infecções assintomáticas ou pré-sintomáticas, sendo útil em sistemas de triagem e atendimento odontológico.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO E CASUÍSTICA

Este estudo tem o desenho de corte transversal e foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Infectologia (LAPI), do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (C-HUPES), da Universidade Federal da Bahia, em Salvador, Bahia-Brasil.

A amostra foi de conveniência e incluiu profissionais de saúde do C-HUPES que procuraram o serviço de pneumologia, entre os meses de junho e julho de 2020, apresentando sinais / sintomas sugestivos de infecção por SARS-CoV-2. Também compuseram a amostra pacientes internados na enfermaria COVID-19 do C-HUPES, no mesmo período. Todos os participantes foram convidados a fornecer amostras de swab nasofaríngeo (NPS) e/ou swab orofaríngeo (OPS), além de uma amostra de saliva auto coletada. Não foi realizado cálculo amostral.

4.2 COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

As amostras de swab foram coletadas por profissionais treinados e utilizando os equipamentos de proteção individual seguindo as recomendações preconizadas pela OMS. Para cada participante foi utilizado um conjunto de 2 swabs de Rayon para a região da nasofaringe (um para cada narina) e/ou um swab para a região da orofaringe. Os dois ou três swabs foram imediatamente introduzidos em um tubo estéril, contendo 3mL de meio de cultivo viral ou solução fisiológica. As amostras foram mantidas refrigeradas e encaminhadas ao Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN), laboratório de referência do Estado para a realização dos testes moleculares.

Amostras de saliva foram coletadas utilizando coletores universais estéreis de 30 ml. Os participantes foram instruídos a cuspir repetidamente até que aproximadamente 2 ml de amostra fossem obtidos, evitando muco da orofaringe ou do trato respiratório inferior (escarro). As amostras foram transportadas para o LAPI

em uma caixa térmica a 2-8 ° C e armazenadas a -80 ° C até a extração do ácido nucleico. Sempre que possível, o RNA foi isolado da saliva fresca em até 6 horas após a coleta.

As amostras foram homogeneizadas por pipetagem repetida e diluídas 1: 1 com solução salina tamponada com fosfato (PBS) 1x. O isolamento de RNA foi realizado usando o kit comercial QIAGEN QIAamp® RNA Mini Kit, de acordo com as instruções do fabricante. O ácido nucleico viral foi extraído de 140 µl de saliva diluída e eluído em 60 µl de tampão de eluição.

4.3 ISOLAMENTO DE ÁCIDO NUCLEICO VIRAL E RT-PCR EM TEMPO REAL

As amostras encaminhadas ao LACEN foram amplificadas pelo método qRT-PCR, conforme o protocolo do Kit BIOMOL OneStep / COVID-19 (Instituto de Biologia Molecular do Paraná).

Para amostras de saliva, o RNA viral foi submetido à amplificação de acordo com o protocolo Charité-Berlin(9). Este protocolo consiste em 3 etapas: a primeira (triagem) para amplificar o gene E, uma etapa confirmatória e outra eliminatória, ambas utilizando como alvo a região genômica Orf1ab RdRp. As reações de amplificação foram realizadas no 7500 Real Time PCR detector (Applied Biosystems), e os resultados foram classificados como positivos para SARS-CoV-2 quando os genes E e RdRp foram detectados e o limiar do ciclo (Ct, número de ciclos necessários para o sinal fluorescente exceder nível de fundo) alcançaram valores menores ou iguais a 40.

Algumas amostras de saliva foram agrupadas em pools para avaliar possibilidade de detecção viral. Um pool com uma amostra positiva e quatro negativas e um segundo pool com uma amostra positiva e nove amostras negativas também foi realizado. Foram incluídas amostras sabidamente positivas (qRT- PCR) com baixa carga viral e alta carga viral.

4.4 ENSAIO MOLECULAR XPERT SARS-COV-2 REALIZADO NO EQUIPAMENTO GENEXPERT

O Xpert Xpress SARS-CoV-2 (Cepheid, Sunnyvale, Califórnia, EUA) é um ensaio lançado no início da pandemia somente sob a autorização de uso de emergência pela FDA. Trata-se de um teste de qRT-PCR completamente automatizado, tem um limite de detecção de 250 cópias por mL e um tempo de execução de aproximadamente 45 minutos. Os genes alvo são o gene E e o gene N2 do nucleocapsídeo. A detecção de ambos os alvos ou de N2 sozinho é considerada positiva, e a detecção do gene E sozinho é considerada presumivelmente positiva (valor Ct <45)(60).

Das amostras de saliva previamente diluídas, utilizou-se 300 µL para transferir para a câmara de amostra do cartucho, que foi então carregado na plataforma do sistema do instrumento GeneXpert.

4.5 ENSAIO IMUNOLÓGICO

A fim de confirmar a ausência de infecção por SARS-CoV-2 em alguns resultados discordantes, foi realizado o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (Euroimmun, Lübeck, Alemanha). A detecção de anticorpos IgG foi realizada em amostras de plasma coletadas após 3 semanas do início dos sintomas, de acordo com as instruções do fabricante.

4.6 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira - UFBA (4.042.620) (Anexo A). Todos os participantes foram convidados a participar assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo B). Este estudo foi conduzido em conformidade com os princípios estabelecidos na Resolução CNS 466/12.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A estatística descritiva foi apresentada como frequência simples e relativa para variáveis categóricas e mediana (intervalo interquartil; IQR) para variáveis contínuas. Os testes de Fisher e Mann-Whitney foram usados para variáveis categóricas e contínuas, respectivamente. Sensibilidade, valor preditivo positivo de especificidade, valor preditivo negativo e um intervalo de confiança (IC) de 95% foram calculados para acessar o desempenho diagnóstico. O coeficiente kappa foi utilizado para estimar a concordância entre os resultados de qRT-PCR da saliva e de NPS / OPS. Análises de regressão linear foram utilizadas para calcular o coeficiente de determinação (R^2). O teste de Spearman foi utilizado para calcular o coeficiente de correlação. O teste considerado “teste de referência” foi o que utilizou NPS/OPS Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 18.0.

5 RESULTADOS

Artigo nº 1

Saliva is a Reliable, Non-invasive Specimen for SARS-CoV-2 Detection

The Brazilian Journal of Infectious Disease








Publicado

BRAZ J INFECT DIS 2020;24(5):422-427

Sociedade
Brasileira de
InfectologiaThe Brazilian Journal of
INFECTIOUS DISEASESwww.elsevier.com/locate/bjid

Original article

Saliva is a reliable, non-invasive specimen for SARS-CoV-2 detection

Sara Nunes Vaz ^a, Daniele Souza de Santana ^a, Eduardo Martins Netto ^a,
Celia Pedrosa ^a, Wei-Kung Wang ^b, Felice Deminco Alves Santos ^a,
Carlos Brites ^{a,*}

^a Universidade Federal da Bahia (UFBA), Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES), Laboratório de Pesquisa em Infectologia (LAPI), Salvador, BA, Brazil

^b University of Hawaii at Mānoa (UH Manoa), Department of Tropical Medicine, Medical Microbiology and Pharmacology, Hawaii, USA

Saliva is a Reliable, Non-invasive Specimen for SARS-CoV-2 Detection

Sara Nunes Vaz^a
saranunes02@hotmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-7556-9670>

Daniele Souza de Santana^a
dnssan@hotmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-0829-6817>

Eduardo Martins Netto^a
nettoeduardom@hotmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-1691-6761>

Celia Pedroso^a
cpedrosoj@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-6182-6717>

Wei-Kung Wang^b
wangwk@hawaii.edu
<https://orcid.org/0000-0002-6670-4663>

Felice Deminco Alves Santos^a
fdeminco@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-6132-192X>

Carlos Brites^a
crbrites@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-4673-6991>

^a Universidade Federal da Bahia (UFBA), Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES), Laboratório de Pesquisa em Infectologia (LAPI), Salvador, BA, Brasil.

^b University of Hawaii at Mānoa (UH Manoa). Department of Tropical Medicine, Medical Microbiology and Pharmacology, Hawaii, USA.

ABSTRACT

Background - Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is the cause of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Although Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) of respiratory specimens is the gold standard test for detection of SARS-CoV-2 infection, collecting nasopharyngeal swabs causes discomfort to patients and may represent a considerable risk for healthcare workers. The use of saliva as a diagnostic sample has several advantages. **Objectives** - The aim of this study is to validate the use of saliva as a biological sample for diagnosis of COVID-19. **Methods** - This study was developed at Infectious Diseases Research Laboratory (LAPI), in Salvador, Brazil. Participants presenting with signs/symptoms suggesting SARS-CoV-2 infection, underwent a nasopharyngeal swab (NPS) and/or oropharyngeal swab (OPS), and saliva collection. Saliva samples were diluted in PBS, RNA isolation and RT-Real Time PCR were performed. Results of conventional vs saliva samples testing were compared. Statistical analyses were performed using Statistical Package for the Social Sciences software (SPSS) version 18.0. **Results** - One hundred fifty-five participants were recruited, and samples pairs of NPS/OPS and saliva were collected. The sensitivity and specificity of RT-PCR using saliva samples were 94.4% (95% CI 86.4 – 97.8) and 97.62% (95% CI 91.7 – 99.3), respectively. There was an overall high agreement (96.1%) between the two tests. **Conclusions** – Use of self-collected saliva samples is an easy, convenient, and low-cost alternative to conventional NP swab-based molecular tests. These results can allow a broaden use of molecular tests for management of COVID19 pandemic, especially in resources-limited settings.

KEY-WORDS: SARS-CoV-2; COVID-19; saliva; diagnostics

Introduction

In December 2019, China reported the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) as the cause of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)¹. Although Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV)² and Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV)³ infections have a

higher mortality rate than COVID-19, SARS-CoV-2 spreads much more rapidly than MERS-CoV and SARS-CoV. On March 11, 2020, World Health Organization (WHO) announced that epidemic of the novel coronavirus was a pandemic, and as of July 8, 2020, the number of confirmed cases globally was 11,874,226, associated to over 545,481 deaths in 216 countries or territories⁴. Brazil confirmed over 1.7 million cases, 67,964 deaths, and a mortality rate of 32.3/100,000⁵.

Direct human-to-human transmission of SARS-CoV-2 occurs through droplet inhalation while coughing, sneezing, or even talking, and transmissions caused by contact with nasal, ocular and oral mucous membranes are also possible. Several clinical symptoms are associated to COVID-19, such as fever, cough, shortness of breath, sore throat, chest pain, headache, anosmia and ageusia⁶. Although 80% of cases has light or mild symptoms, the remaining 20% can present with severe disease, and around 5% will require intensive care treatment, especially those with chronic health conditions including cardiopathy, arterial hypertension, diabetes and obesity⁷.

Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) of respiratory specimens (oropharyngeal and nasopharyngeal swabs, bronchoalveolar wash, tracheal aspirate) is the gold standard test for detection of SARS-CoV-2 infection^{8 9 10}. However, collecting nasopharyngeal swabs causes discomfort to patients due to invasiveness of the procedure, which can reduce the possibility of patient consent to retest, and may represent a considerable risk for healthcare workers, because of its potential to induce patients to sneeze or cough, expelling virus particles¹¹.

Previous studies have shown high detection rate using saliva as specimens for laboratory diagnosis of respiratory viruses^{12 13}. Recent studies reported the use of oral fluids / saliva for the detection of SARS-CoV-2^{14 15 16 17 18}. The use of saliva as a diagnostic sample has several advantages, such as easy self-collection even at home, and no need of specialized personnel for sample collection. In addition, saliva collection is much more comfortable for the patient, than nasopharyngeal/oropharyngeal swabs procedure¹⁷. It also saves time, and is less costly, because it does not require the use of personal protective equipment nor viral transportation solution.

Timely, accurate and non-invasive samples for SARS-CoV-2 detection will facilitate effective large-scale pandemic control measures to prevent the spread of COVID-19. The aim of this study is to validate the use of saliva as a biological sample for the diagnosis of COVID-19.

Material and Methods

Study population

This study was developed at Infectious Diseases Research Laboratory (LAPI), of Complexo Hospitalar Professor Edgard Santos (C-HUPES), Federal University of Bahia, in Salvador, Brazil.

C-HUPES healthcare workers presenting with signs/symptoms suggesting SARS-CoV-2 infection, as well as patients at the COVID-19 ward of C-HUPES, underwent a nasopharyngeal swab (NPS) and/or oropharyngeal swab (OPS) collection. All participants recruited to this study, after signing informed consent, were asked to provide a sample of self-collected saliva.

This study was approved by the Research Ethics Committee of Maternidade Clímério de Oliveira – UFBA (4.042.620).

Sample Collection

Saliva samples were collected into 30 ml sterile urine cups. Participants were instructed to repeatedly spit until approximately 2 ml of sample was obtained, thus avoiding mucous secretions from oropharynx or lower respiratory tract (i.e., sputum). Samples were transported to LAPI in a thermal box at 2-8 °C, and stored at -80°C until nucleic acid extraction. Whenever possible, RNA was isolated from fresh saliva within 6 hours after collection.

Sample Processing and Viral nucleic acid isolation

Samples were homogenized by repeated pipetting and diluted 1:1 with PBS 1x (phosphate buffered saline) before RNA isolation. RNA isolation was performed by using QIAGEN QIAamp® RNA Mini Kit, according to manufacturer's instructions. Viral nucleic acid was extracted from 140 µl diluted saliva, and eluted to 60 µl of elution buffer.

Testing of samples pools with one positive and four negative samples and one positive and nine negative samples was also performed. It included positive samples (RT-Real Time PCR) with low viral load and high viral load.

RT-Real Time PCR

Nasopharyngeal and oropharyngeal specimens were sent to Bahia Central Laboratory (LACEN), a State's Reference Laboratory, for SARS-Cov-2 investigation by RT-PCR method, in accordance to BIOMOL OneStep/ COVID-19 Kit (Paraná Molecular Biology Institute) protocol.

For saliva samples RNA template was subjected to amplification according to Charité-Berlin protocol¹⁰. This protocol consisted of 3 stages: the first one (screening) to amplify the E gene, a confirmatory step, and an eliminatory one. The last two stages targeted RdRp gene and were run in case nucleic acid was detected on screening. Amplification reactions were carried out on Applied Biosystems 7500 Real Time PCR detector, and results were classified as positive for SARS-CoV-2 when both E and RdRp genes were detected and cycle threshold (Ct, number of cycles required for the fluorescent signal to exceed background level) values were less than or equal to 40.

Immunological Assay

In order to confirm the absence of SARS-CoV-2 infection in some discordant results, Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Euroimmun, Lübeck, Germany) was performed. Detection of IgG antibodies was attempted in plasma samples collected after 3 weeks of symptoms' onset, according to manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Descriptive statistics were presented as a number (%) for categorical variables and median (interquartile range; IQR) for continuous variables. Fisher's and Mann-Whitney tests were used for categorical and continuous variables, respectively. Sensitivity, specificity positive predictive value, negative predictive value and a 95% CI were calculated to access diagnostic performance. The kappa coefficient was used to estimate the agreement between saliva and NPS/OPS RT-PCR results. All

statistical analyses were performed using Statistical Package for the Social Sciences software (SPSS) version 18.0.

Results

Between 5 May and 5 June 2020, 155 participants were recruited, and samples pairs of NPS/OPS and saliva were collected. Of these, 149 (96.1%) had concordant result on the detection of SARS-CoV-2 RT-PCR in both specimens. Forty-six individuals (30.9%) were male. The median (IQR) age was 40 (33-48.5) years. Median (IQR) time for onset of symptoms was 4 (3-6) days. Participants' characteristics are shown in table 1.

Table 1 - Characteristics of participants enrolled in this study.

	Overall (n=149) ¹	COVID-19 (n=67)	Non-COVID 19 (n=82)	p value
Age (years), median (IQR)	40 (33-48.5)	40 (35-50)	39.5 (33-48.3)	0.588
Male, n. (%)	46 (30.9)	23 (34.32)	23 (28.04)	0.470
Onset of symptoms before the test (days), median (IQR)	4 (3-6)	4 (3-6)	4.5 (3-6)	0.548
Symptoms at sample collection				
Headache, n. (%)	82 (61.2)	33 (53.2)	49 (68.1)	0.109
Cough, n. (%)	60 (45.1)	30 (49.2)	30 (41.7)	0.484
Myalgia, n. (%)	54 (40.3)	25 (40.3)	29 (40.3)	1
Sore throat, n. (%)	50 (37.3)	14 (22.6)	36 (50)	0.001
Fever, n. (%)	37 (27.6)	25 (40.3)	12 (16.7)	0.003
Anosmia, n. (%)	29 (21.6)	20 (32.3)	9 (12.5)	0.007
Ageusia, n. (%)	28 (20.9)	18 (29.0)	10 (13.9)	0.035
Chill, n. (%)	27 (17.9)	10 (16.1)	14 (19.4)	0.658
Chest pain, n. (%)	18 (13.4)	9 (14.5)	9 (12.5)	0.802
Dyspnea, n. (%)	16 (11.9)	9 (14.5)	7 (9.7)	0.433

¹ Concordant result for SARS-CoV-2 by RT-PCR between swab and saliva samples.

The prevalence of COVID-19 diagnosed by NPS/OPS RT-PCR, and by saliva RT-PCR in this study were 45.8% and 43.22% respectively. Most of the tested healthcare workers (51.6%) were nurses/nursing technicians.

All the 67 participants diagnosed with COVID-19 had mild to moderate symptoms. No one needed hospitalization or intubation. No death was reported. The most common symptoms at sampling time were headache (53.2%), cough (49.2%) and myalgia (40.3%). Frequency of fever and anosmia was significantly higher ($p=0.003$; 0.007), among patients tested positive for COVID-19, while frequency of sore throat was significantly lower ($p=0.001$) (table 1).

Based on the result of RT-PCR using NPS/OPS samples, the sensitivity and specificity of RT-PCR using saliva samples were 94.4% (95% CI 86.4 – 97.8) and 97.62% (95% CI 91.7 – 99.3), respectively (Table 2). Positive predictive value and negative predictive value were 97.1% (95% CI 90.0 - 99.2) and 95.35% (95% CI 88.6 – 98.2), respectively. There was an overall high agreement (96.1%) between the two tests (k coefficient 0.922, 95% CI 0.765 – 1.079, $p < 0.001$). The median (IQR) Ct values of the E gene was 33 (29-36.6), and of the RdRp gene was 34 (29.5-37.4).

Table 2 - Comparison for the detection of SARS-Cov-2 RT-PCR between NPS/OPS and saliva samples.

		SWAB			
		Detectable	Non detectable	Total	
	Detectable	n. (%)	67 (94.4)	2 (2.4)	69 (44.5)
SALIVA	Non detectable	n. (%)	4 (5,6)	82 (97.6)	86 (55.5)
	Total	n. (%)	71 (100)	84 (100)	155 (100)

The detection rate of SARS-Cov-2 in saliva was slightly lower than that of NPS/OPS, but without reaching statistical significance. Six participants had discordant results between saliva and NPS/OPS RT-PCR assays, including two participants with virus detected in saliva but not in NPS/OPS, and four participants with virus detected in NPS/OPS but not in saliva (Table 3).

Table 3 – Characteristics of the participants who had discordant result on detection of SARS-Cov-2 RT-PCR by NPS/OPS or saliva.

Participant n.	Gender	Age	NPS/OPS	Saliva	Onset of symptoms (days)	Symptoms	Ct	IgG
1	F	82	ND	D	3	Fever, dyspnea, dry cough and myalgia	35.72	NA
2	M	41	ND	D	3	Chills, myalgia, headache, rhinorrhea, dry cough, anosmia and ageusia	32.24	NA
3	F	41	D	ND	6	Nasal congestion and dry cough	–	R
4	F	27	D	ND	4	Headache, sneezing, runny nose and sore throat	–	R
5	F	39	D	ND	7	Headache, rhinorrhea, dry cough and sore throat	–	NR
6	F	49	D	ND	3	Headache, dry cough and sore throat	–	R

Abbreviations: F, female; M, male; D, detected; ND, not detected; NPS, nasopharyngeal swab; OPS, oropharyngeal swab; Ct, cycle threshold; R, reactive; NR, not reactive; NA, not available

After 20 days of onset of symptoms, participants with negative saliva results (n=4) were invited to collect new blood samples for anti-SARS-CoV-2 antibodies. IgG was reactive in all but one of them, confirming that at least one patient probably was not previously infected by SARS-Cov-2. Participant n. 5 (negative antibodies detection) had unspecific symptoms, common to any viral infection (Table 3). The two participants with saliva positive/NP-negative testing did not provide blood samples for antibodies testing.

One positive and 4 negative (low dilution) and one positive and 9 negatives (high dilution) saliva samples were pooled. Low and high dilution were positive for low Ct samples (high viral load), but only positive in low dilution when a low viral load sample was included.

Discussion

Our findings demonstrate that testing saliva as an alternative to NP swabs is sensitive and specific enough to be used in a routine practice. The concordance between RT-PCR results for SARS-CoV-2 detection in saliva and NP swabs was 96.1%. In addition, among samples with discrepant results we had one that was negative for SARS-CoV-2 antibodies, 3 weeks after diagnosis, suggesting that patient had other diagnosis than COVID-19. In this case, the sensitivity of saliva testing would increase from 94.4 to 95.7%, while the specificity of NP swabs testing would decrease in a similar way.

The use of NP swabs has been the standard of care for SARS-CoV-2 diagnosis in Brazil, but it requires the use of full personal protective equipment, increase the risk of infection for the health professional that collects the sample, and also, the cost of testing. Saliva has been shown as a reliable specimen for detecting SARS coronavirus since 2004. Wang et al (2004) reported a high viral load of SARS-CoV in saliva samples when compared to throat wash¹³. To et al reported a high concordance between saliva and nasopharyngeal aspirates for the detection of respiratory viruses and monitoring SARS-CoV-2 viral load during the course of infection^{12 16}. There are several advantages in using saliva samples for detection of SARS-Cov-2: first, saliva can be provided easily by the patient without any invasive procedures. Therefore, the use of saliva samples could reduce the risk of virus transmission to healthcare professionals¹⁷. Second, the use of saliva will allow

sample collection outside hospitals or health centers areas. Finally, it could be conveniently pooled to screen larger populations, as we demonstrate in this work. In these settings, where a large number of individuals require screening, saliva represents a practical and non-invasive specimen type¹⁹.

In the present study saliva was self-collected by participants inside the hospital area. Despite some authors recommend the use of samples collected immediately upon waking up^{11 16}, without previous food consumption or brushing teethes, we collected saliva any time patients were evaluated and had a test requested by a physician. This easy to perform, simple procedure, was able to provide a similar sensitivity/specificity to samples collected by NP swabs¹¹.

In some previous studies, saliva was obtained using special collection devices²⁰, that leads advantages on the quality and quantity of obtained saliva. However, these collection devices are not usually available in general medical care centers, especially in low-income countries. Furthermore, saliva collection using such devices requires the assistance of healthcare workers. In the present study, participants were instructed to repeatedly spit into a sterile urine cup used routinely in our hospital. As no special device is required, the use of saliva can be implemented as a routine in clinical practice without compromising the sample quality, as previously reported^{19 21}.

The high degree of concordance between the two methods demonstrate that the use saliva for detecting SARS-CoV-2 by RT-PCR is as reliable as the use of NP/OP swabs, but with lower costs and risks. Brazil has almost 1.5 million cases diagnosed so far, which means that a simpler testing procedure could potentially reduce the risks and costs involved in sample collection. Despite these numbers, the proportion of patients tested by PCR in Brazil is very low, and the estimates on the dynamics of the pandemic is largely based on flow lateral immunochromatographic tests, which have been considered inaccurate to define serological status for SARS-CoV-2²².

Our results were comparable to a similar study that used saliva for SARS-CoV-2 detection and were obtained from a population of patients closely followed up in a university hospital²³. The two participants presenting negative results in saliva samples but positive in NP swabs had very non-specific symptoms and could not

fulfill a clinical diagnosis of COVID-19. The most predictive symptoms for COVID-19 in our population were not present in these two cases, increasing the chance of a false-positive result by NP swab. The use of a protocol containing 3 steps of amplification also increases the sensitivity of the test. A recent study showed that some variations in SARS-CoV-2 genome can negatively impact the sensitivity of RT-PCR test used for its detection, and reinforces the need of protocols able to maintain sensitivity and specificity²⁴, like that used in this study.

Our work presents some limitations including the absence of serological confirmation of COVID-19 in all cases, and the lack of ct values for the tests using NPS samples, as they were performed in a referral laboratory and were not available for comparison purposes. However, we were able to closely evaluate health care workers and inpatients admitted to our hospital and compare the use of two approaches for molecular detection of SARS-CoV-2, with a high degree of concordance.

In conclusion, we demonstrated that using self-collected saliva samples is an easy, convenient, and low-cost alternative to conventional NP swab-based molecular tests. These results can allow a broaden use of molecular tests for management of COVID19 pandemic, especially in resources-limited settings.

References

1. Wu F., Zhao S., Yu B., et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020;579(7798):265–9. Doi: 10.1038/s41586-020-2008-3.
2. Cheng VCC., Lau SKP., Woo PCY., Kwok YY. Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(4):660–94. Doi: 10.1128/CMR.00023-07.
3. Chan JFW., Lau SKP., To KKW., Cheng VCC., Woo PCY., Yue KY. Middle East Respiratory syndrome coronavirus: Another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(2):465–522. Doi: 10.1128/CMR.00102-14.
4. World Health Organization. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. Available at: <https://covid19.who.int/>.
5. Ministerio da saude. Painel Coronavirus. Available at:

- <https://covid.saude.gov.br/>.
6. Huang C., Wang Y., Li X., et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020;395(10223):497–506. Doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
 7. Ramanathan K., Antognini D., Combes A., et al. Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: an observational study. *Lancet Microbe*. 2020;(January):19–21.
 8. Center of Disease Control and Prevention. Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens for COVID-19. May 22. Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>.
 9. Wang Y., Kang H., Liu X., Tong Z. Combination of RT-qPCR testing and clinical features for diagnosis of COVID-19 facilitates management of SARS-CoV-2 outbreak. *J Med Virol*. 2020;92(6):538–9. Doi: 10.1002/jmv.25721.
 10. Corman VM., Landt O., Kaiser M., et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*. 2020;25(3):1–8. Doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
 11. Wyllie AL., Fournier J., Casanovas-Massana A., et al. Saliva is more sensitive for SARS-CoV-2 detection in COVID-19 patients than nasopharyngeal swabs. *MedRxiv*. 2020;(2):2020.04.16.20067835. Doi: 10.1101/2020.04.16.20067835.
 12. To KKW., Yip CCY., Lai CYW., et al. Saliva as a diagnostic specimen for testing respiratory virus by a point-of-care molecular assay: a diagnostic validity study. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(3):372–8. Doi: 10.1016/j.cmi.2018.06.009.
 13. Wang W-K., Chen S-Y., Liu I-J., et al. Detection of SARS-associated Coronavirus in Throat Wash and Saliva in Early Diagnosis. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(7):1213–9.
 14. Azzi L., Carcano G., Gianfagna F., et al. Saliva is a reliable tool to detect SARS-CoV-2. *J Infect*. 2020;81(1):e45–50. Doi: 10.1016/j.jinf.2020.04.005.
 15. Chen L., Zhao J., Peng J., et al. Detection of 2019-nCoV in Saliva and Characterization of Oral Symptoms in COVID-19 Patients. *SSRN Electron J*. 2020. Doi: 10.2139/ssrn.3557140.
 16. To KKW., Tsang OTY., Leung WS., et al. 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*. 2020;20(5):565–74. Doi: 10.1016/S1473-3099(20)30196-1.
 17. Williams E., Bond K., Zhang B., Putland M., Williamson DA. Saliva as a non-invasive specimen for detection of SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol*. 2020;50(April). Doi: 10.1128/JCM.00776-20.
 18. McCormick-Baw C., Morgan K., Gaffney D., et al. 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.* 2020;(May). Doi: 10.1128/jcm.01109-20.
19. To KKW., Tsang OTY., Chik-Yan Yip C., et al. Consistent detection of 2019 novel coronavirus in saliva. *Clin Infect Dis.* 2020;(Xx Xxxx):4–6. Doi: 10.1093/cid/ciaa149.
 20. Sueki A., Matsuda K., Yamaguchi A., et al. Evaluation of saliva as diagnostic materials for influenza virus infection by PCR-based assays. *Clin Chim Acta.* 2016;71–4. Doi: 10.1016/j.cca.2015.12.006.
 21. To KK., Lu L., Yip CC., et al. Additional molecular testing of saliva specimens improves the detection of respiratory viruses. *Emerg Microbes Infect.* 2017;6(6). Doi: 10.1038/emi.2017.35.
 22. Ong DSY., Man SJ De., Lindeboom FA., Koeleman JGM. Comparison of diagnostic accuracies of rapid serological tests and ELISA to molecular diagnostics in patients with suspected coronavirus disease 2019 presenting to the hospital. *Clin Infect Dis.* 2020;(January).
 23. Pasomsub E., Watcharananan SP., Boonyawat K., et al. Saliva sample as a non-invasive specimen for the diagnosis of coronavirus disease 2019: a cross-sectional study. *Clin Microbiol Infect.* 2020;(xxxx). Doi: 10.1016/j.cmi.2020.05.001.
 24. Peñarrubia L., Ruiz M., Porco R., et al. Multiple assays in a real-time RT-PCR SARS-CoV-2 panel can mitigate the risk of loss of sensitivity by new genomic variants during the COVID-19 outbreak. *Int J Infect Dis.* 2020;97(January):225–9. Doi: 10.1016/j.ijid.2020.06.027.
 25. Vaz, S.N.; de Santana, D.S.; Netto, E.M.; Pedroso, C.; Wang, W.K.; Santos, F.D.A.; Brites C. Saliva is a reliable, non-invasive specimen for SARS-CoV-2 detection. *Brazilian J Infect Dis.* 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.08.001>.
 26. Cepheid. Xpert® Xpress SARS-CoV-2 Test: package insert. Available at: <https://www.fda.gov/media/136315/download>.
 27. Goldenberger D., Leuzinger K., Sogaard KK., et al. Brief validation of the novel GeneXpert Xpress SARS-CoV-2 PCR assay. *J Virol Methods.* 2020;284(January):1–3.
 28. Becker MG., Taylor T., Kiazzyk S., Cabiles DR., Meyers AFA., Sandstrom PA. Recommendations for sample pooling on the Cepheid GeneXpert® system using the Cepheid Xpert® Xpress SARS-CoV-2 assay. *PLoS One.* 2020;15(11 November):1–9. Doi: 10.1371/journal.pone.0241959.
 29. Broder, K; Babiker, A; White T et al. Test Agreement between Roche Cobas 6800 and Cepheid GeneXpert Xpress SARS-CoV-2 Assays at High Cycle Threshold Ranges. *J Clin Microbiol.* 2020;58(8):1–3.
 30. Loeffelholz MJ., Alland D., Butler-Wu SM., et al. Multicenter evaluation of the cepheid xpert xpress sars-cov-2 test. *J Clin Microbiol.* 2020;58(8):1–8. Doi: 10.1128/JCM.00926-20.

Artigo nº 2

**Validation of the GeneXpert Xpress SARS-Cov-2 PCR assay using saliva
as biological specimen**

The Brazilian Journal of Infectious Disease

Publicado

BRAZ J INFECT DIS (2021);25(2): 1015-43



Sociedade
Brasileira de
Infectologia

The Brazilian Journal of
INFECTIOUS DISEASES

www.elsevier.com/locate/bjid



Brief communication

**Validation of the GeneXpert Xpress SARS-CoV-2
PCR assay using saliva as biological specimen**



Sara Nunes Vaz ^a, Daniele Souza de Santana ^a, Eduardo Martins Netto ^a,
Wei-Kung Wang ^b, Carlos Brites ^{a,*}

^a Universidade Federal da Bahia (UFBA), Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES), Laboratório de Pesquisa em Infectologia (LAPI), Salvador, BA, Brazil

^b University of Hawaii at Mānoa (UH Manoa), Department of Tropical Medicine, Medical Microbiology and Pharmacology, HI, USA

Validation of the GeneXpert Xpress SARS-Cov-2 PCR assay using saliva as biological specimen

Sara Nunes Vaz¹

saranunes02@hotmail.com

<https://orcid.org/0000-0001-7556-9670>

Daniele Souza de Santana¹

dnssan@hotmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-0829-6817>

Eduardo Martins Netto¹

nettoeduardom@hotmail.com

<https://orcid.org/0000-0003-1691-6761>

Wei-Kung Wang²

wangwk@hawaii.edu

<https://orcid.org/0000-0002-6670-4663>

Carlos Brites¹

crbrites@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-4673-6991>

¹ Universidade Federal da Bahia (UFBA), Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES), Laboratório de Pesquisa em Infectologia (LAPI), Salvador, BA, Brasil.

² University of Hawaii at Mānoa (UH Manoa). Department of Tropical Medicine, Medical Microbiology and Pharmacology, Hawaii, USA.

ABSTRACT

In the pandemic, rapid and accurate detection of SARS-CoV-2 is crucial in controlling the outbreak. Recent studies have shown a high detection rate using saliva/ oral fluids as specimens for laboratory detection of the virus. We intended to evaluate the test performance of the Xpert Xpress SARS-CoV-2 cartridge assay in comparison to a conventional qRT-PCR testing, using saliva as biological specimen. Forty saliva samples from symptomatic participants were collected. Conventional q-RT PCR was performed for amplification of E and RdRp genes and the Xpert Xpress SARS-CoV-2 assay amplified E and N2 genes. In the conventional assay, the median cycle threshold value of the E gene was 34.9, and of the RdRp gene was 38.3. In the Xpert Xpress assay, the median cycle threshold value of the E gene was 29.7, and of the N2 gene was 31.6. These results can allow a broaden use of molecular tests for management of COVID-19 pandemic, especially in resources-limited settings.

KEY-WORDS: SARS-CoV-2; saliva; GeneXpert; diagnostics.

Since the beginning of SARS-CoV-2 pandemic, the number of infected people is getting higher. According to World Health Organization (WHO), by October 22th, 2020, a total of 40.890.712 confirmed cases of COVID-19, including 1.126.351 deaths was reported⁴. Rapid and accurate detection of SARS-CoV-2 is an essential step in controlling the outbreak, and multiple diagnostic tests, including antigen detection, serological and molecular assays, have been rapidly developed⁸.

Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) is the gold standard test for detection of SARS-CoV-2, whether using *in house*, fully automated or cartridge-based assays. However, such molecular assays use respiratory specimens (oropharyngeal and nasopharyngeal swabs, bronchoalveolar wash, tracheal aspirate)⁸. Collecting nasopharyngeal swab (NPS)/ oropharyngeal swab (OPS) causes discomfort to patients due to invasiveness of the procedure, which can reduce the possibility of patient consent to retest, and may represent a considerable risk for healthcare workers, because of its potential to induce patients to sneeze or cough, generating virus-containing aerosols¹¹.

Recent studies have shown a high detection rate using saliva/ oral fluids as specimens for laboratory detection of SARS-CoV-2^{11 14 17 25}. The use of saliva as biological sample has several advantages, such as easy self-collection even at home, and no need of trained personnel for sample collection. In addition, saliva collection is much more comfortable for the patient than NPS or OPS procedure. It also saves time, and is less costly, because it does not require the use of personal protective equipment nor viral transportation solution¹⁷.

The aim of this study is to evaluate the test performance of the Xpert Xpress SARS-CoV-2 cartridge assay compared to a qRT-PCR testing, using saliva as biological specimen.

This study was developed at the Infectious Diseases Research Laboratory (LAPI), of Complexo Hospitalar Professor Edgard Santos (C-HUPES), Federal University of Bahia, in Salvador, Brazil. We used forty saliva samples collected during June and July 2020, from a previous validation study from our group²⁵. Saliva samples from symptomatic participants were collected into 30 ml sterile urine cups and kept at -80° C until testing. Participants were instructed to repeatedly spit until approximately 2 ml of sample was obtained, thus avoiding mucous secretions from oropharynx or lower respiratory tract (i.e., sputum). Samples were diluted 1:1 with phosphate buffered saline (PBS) 1x. This study was approved by the Research Ethics Committee of Maternidade Climério de Oliveira – UFBA (approval number: 4.042.620). Informed consent was obtained from all participants enrolled in this study.

RNA isolation was performed by using viral RNA mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany), according to manufacturer's instructions. RNA template was subjected to conventional q-RT PCR amplification according to Charité-Berlin protocol¹⁰, which consists of detection of envelope gene E and Orf1ab RdRp gene. Amplification reactions were carried out on Applied Biosystems 7500 Real Time PCR detector, and results were classified as positive for SARS-CoV-2 when both E and RdRp genes were detected and cycle threshold (Ct, number of cycles required for the fluorescent signal to exceed background level) values were less than 40,9.

The Xpert Xpress SARS-CoV-2 (Cepheid, Sunnyvale, California, USA) is a very recently released assay for use under the Emergency Use Authorization (EUA)

only, from U.S Food and Drug Administration (FDA). The assay is a sample-to-answer q-RT PCR test, requires a sample load of 300µL, has a detection limit of 250 copies per mL, and a running time of approximately 45 minutes. The target genes are gene E and nucleocapsid N2 gene. The detection of both targets or N2 alone is considered positive, and the detection of E gene alone is considered presumptive positive (Ct value<45) ²⁶.

Statistical analyses were performed using Statistical Package for the Social Sciences software (SPSS) version 18.0. Linear regression analysis was used to calculate R². Correlation test was performed using Spearman.

We selected, twenty positive and twenty negative saliva samples already tested by the conventional q-RT PCR assay (Charité-Berlin test) to be validated in the Xpert Xpress SARS-CoV-2 system. A detailed comparison of the assay results is shown in Table 1.

Table 1 – Positive samples Ct values for the two different molecular assays, by the target gene of SARS-CoV-2.

N.	Sample ID	Xpert E gene	Xpert N2 gene	PCR ct E gene	PCR ct RdRp gene
1	SCOV-0072	35.6	37.3	35.72	37.36
2	SCOV-0171	16.1	18.6	21.45	25.66
3	SCOV-0172	25.5	28.4	30.72	34.16
4	SCOV-0183	27.5	30.5	31.86	38.65
5	SCOV-0187	32.9	35.1	34.85	40.64
6	SCOV-0188	26.1	28.5	31.4	35.07
7	SCOV-0201	29.3	32.0	31.91	38.52
8	SCOV-0237	32.5	34.8	36.6	40.06
9	SCOV-0244	35.1	36.9	38.78	40.17
10	SCOV-0247	26.8	28.8	33.9	38.87
11	SCOV-0249	26.2	28.4	31.74	36.42
12	SCOV-0264	35.6	36.8	32.24	33.29
13	SCOV-0272	24.7	27.4	30.89	31.57
14	SCOV-0288	31.8	34.7	36.92	38.34

15	SCOV-0299	35.7	38.1	40.1	39.45
16	SCOV-0306	32.06	31.29	35.04	38.26
17	SCOV-0324	30.1	33.3	39.69	40.03
18	SCOV-0330	32.6	34.8	39.07	39.96
19	SCOV-0338	25.8	27.8	35.4	37.04
20	SCOV-0339	27.0	29.4	36.35	37.45

We observed 100% concordance between both assays. There were no presumptive positive results in the Xpert Xpress assay. In the Charité-Berlin protocol the median (IQR) Ct values of the E gene was 34.9 (31.8-36.8), and of the RdRp gene was 38.3 (35.4-39.8), while in the Xpert Xpress assay, the median (IQR) Ct values of the E gene was 29.7 (26.1-32.8), and of the N2 gene was 31.6 (28.4-35.0). Correlations between Xpert Ct E and N2 genes; Charité Ct RdRp and E genes; Charité and Xpert Ct E gene were respectively 0.98; 0.86 and 0.78 Figure 1 shows the R² values between Ct values for both assays and for the different viral gene targets.

In a previous study we validated the use of saliva as a biological sample for the diagnosis of COVID-19. Results of conventional NPS and/or OPS versus saliva samples testing were compared by performing qRT-Real Time PCR assay²⁵. There was an overall high agreement (96.1%) between the two tests. In the present study, we detected an overall equivalence between results of qRT-Real Time PCR and Xpert Xpress SARS-CoV-2 assay.

The use of the Xpert Xpress SARS-CoV-2 assay was previously validated and results showed a great concordance over a range of SARS-CoV-2 viral loads and across established human coronaviruses^{27 28}. However, the samples used for assay validation were the conventional NPS/OPS. On the other hand, McCormick-Baw et al (2020) have tested a total of 156 paired NPS and saliva specimens and found 98% of agreement¹⁸.

Our results demonstrated that even samples presenting high Ct values (low viral load) in the conventional qRT-Real Time assay, were detected in this cartridge-based assay. Similar results were presented by Broder et al (2020)²⁹, but also using NPS/OPS.

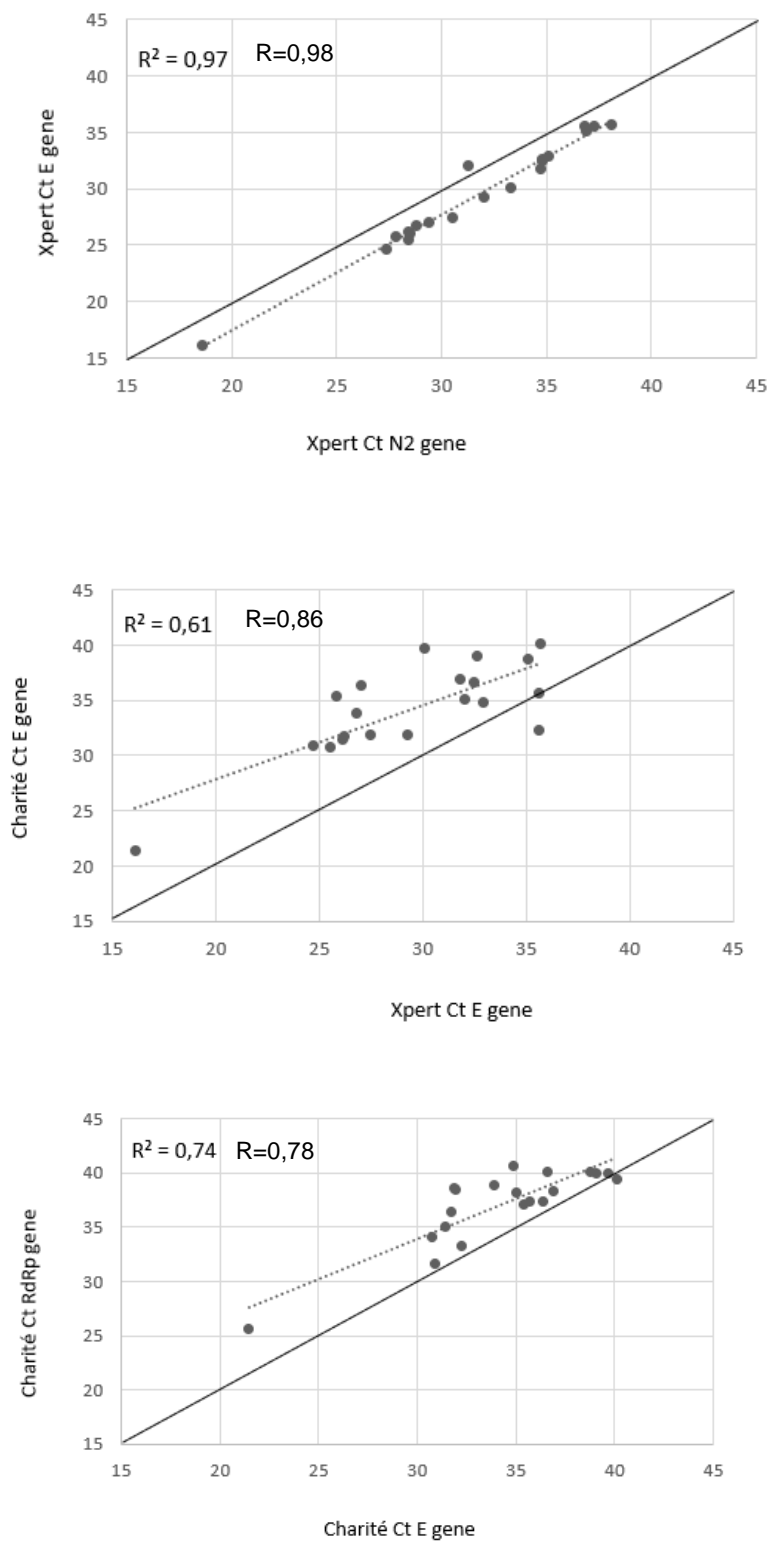


Figure 1- Correlation of Ct values between different assays and targeted SARS-CoV-2 genes for the positive samples (n = 20).

The detected higher correlation in Xpert E and N2 genes (0.98) compared to Charité RdRp and E genes (0.86), can demonstrate a lower test variability of an automated nucleic acid amplification test than conventional RT-PCR, as shown in a recently published study from Loeffelholz et al (2020) ³⁰.

Our work presents some limitations including the impossibility of testing viscous samples. Some saliva samples presenting excess of mucus were not included in this validation study. Only the liquid non-viscous components of each specimen were drawn into the disposable pipets for test cartridge inoculation ²⁶. Although viscous saliva specimens could be treated with Sputasol (Thermo Scientific) or acetylcysteine to liquify the sample, we did not test this strategy in our study.

In conclusion, the Xpert Xpress system allows extensive testing for SARS-CoV-2 outside of the clinical laboratory environment, due to its easy handling. In addition, the use of self-collected saliva specimen is an easy, convenient, and low-cost alternative to conventional NP swab-based molecular tests. These results can allow a broaden use of molecular tests for management of COVID19 pandemic, especially in resources-limited settings.

References

1. Wu F., Zhao S., Yu B., et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020;579(7798):265–9. Doi: 10.1038/s41586-020-2008-3.
2. Cheng VCC., Lau SKP., Woo PCY., Kwok YY. Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(4):660–94. Doi: 10.1128/CMR.00023-07.
3. Chan JFW., Lau SKP., To KKW., Cheng VCC., Woo PCY., Yue KY. Middle East Respiratory syndrome coronavirus: Another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(2):465–522. Doi: 10.1128/CMR.00102-14.

4. World Health Organization. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. Available at: <https://covid19.who.int/>.
5. Ministerio da saude. Painel Coronavirus. Available at: <https://covid.saude.gov.br/>.
6. Huang C., Wang Y., Li X., et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020;395(10223):497–506. Doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
7. Ramanathan K., Antognini D., Combes A., et al. Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: an observational study. *Lancet Microbe*. 2020;(January):19–21.
8. Center of Disease Control and Prevention. Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens for COVID-19. May 22. Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>.
9. Wang Y., Kang H., Liu X., Tong Z. Combination of RT-qPCR testing and clinical features for diagnosis of COVID-19 facilitates management of SARS-CoV-2 outbreak. *J Med Virol*. 2020;92(6):538–9. Doi: 10.1002/jmv.25721.
10. Corman VM., Landt O., Kaiser M., et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*. 2020;25(3):1–8. Doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
11. Wyllie AL., Fournier J., Casanovas-Massana A., et al. Saliva is more sensitive for SARS-CoV-2 detection in COVID-19 patients than nasopharyngeal swabs. *MedRxiv*. 2020;(2):2020.04.16.20067835. Doi: 10.1101/2020.04.16.20067835.
12. To KKW., Yip CCY., Lai CYW., et al. Saliva as a diagnostic specimen for testing respiratory virus by a point-of-care molecular assay: a diagnostic validity study. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(3):372–8. Doi: 10.1016/j.cmi.2018.06.009.
13. Wang W-K., Chen S-Y., Liu I-J., at al. Detection of SARS-associated

- Coronavirus in Throat Wash and Saliva in Early Diagnosis. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(7):1213–9.
14. Azzi L., Carcano G., Gianfagna F., et al. Saliva is a reliable tool to detect SARS-CoV-2. *J Infect.* 2020;81(1):e45–50. Doi: 10.1016/j.jinf.2020.04.005.
 15. Chen L., Zhao J., Peng J., et al. Detection of 2019-nCoV in Saliva and Characterization of Oral Symptoms in COVID-19 Patients. *SSRN Electron J.* 2020. Doi: 10.2139/ssrn.3557140.
 16. To KKW., Tsang OTY., Leung WS., et al. 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.* 2020;20(5):565–74. Doi: 10.1016/S1473-3099(20)30196-1.
 17. Williams E., Bond K., Zhang B., Putland M., Williamson DA. Saliva as a non-invasive specimen for detection of SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol.* 2020;50(April). Doi: 10.1128/JCM.00776-20.
 18. McCormick-Baw C., Morgan K., Gaffney D., et al. 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.* 2020;(May). Doi: 10.1128/jcm.01109-20.
 19. To KKW., Tsang OTY., Chik-Yan Yip C., et al. Consistent detection of 2019 novel coronavirus in saliva. *Clin Infect Dis.* 2020;(Xx Xxxx):4–6. Doi: 10.1093/cid/ciaa149.
 20. Sueki A., Matsuda K., Yamaguchi A., et al. Evaluation of saliva as diagnostic materials for influenza virus infection by PCR-based assays. *Clin Chim Acta.* 2016:71–4. Doi: 10.1016/j.cca.2015.12.006.
 21. To KK., Lu L., Yip CC., et al. Additional molecular testing of saliva specimens improves the detection of respiratory viruses. *Emerg Microbes Infect.* 2017;6(6). Doi: 10.1038/emi.2017.35.
 22. Ong DSY., Man SJ De., Lindeboom FA., Koeleman JGM. Comparison of diagnostic accuracies of rapid serological tests and ELISA to molecular diagnostics in patients with suspected coronavirus disease 2019 presenting to the hospital. *Clin Infect Dis.* 2020;(January).

23. Pasomsub E., Watcharananan SP., Boonyawat K., et al. Saliva sample as a non-invasive specimen for the diagnosis of coronavirus disease 2019: a cross-sectional study. *Clin Microbiol Infect.* 2020;(xxxx). Doi: 10.1016/j.cmi.2020.05.001.
24. Peñarrubia L., Ruiz M., Porco R., et al. Multiple assays in a real-time RT-PCR SARS-CoV-2 panel can mitigate the risk of loss of sensitivity by new genomic variants during the COVID-19 outbreak. *Int J Infect Dis.* 2020;97(January):225–9. Doi: 10.1016/j.ijid.2020.06.027.
25. Vaz, S.N.; de Santana, D.S.; Netto, E.M.; Pedroso, C.; Wang, W.K.; Santos, F.D.A.; Brites C. Saliva is a reliable, non-invasive specimen for SARS-CoV-2 detection. *Brazilian J Infect Dis.* 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.08.001>.
26. Cepheid. Xpert® Xpress SARS-CoV-2 Test: package insert. Available at: <https://www.fda.gov/media/136315/download>.
27. Goldenberger D., Leuzinger K., Sogaard KK., et al. Brief validation of the novel GeneXpert Xpress SARS-CoV-2 PCR assay. *J Virol Methods.* 2020;284(January):1–3.
28. Becker MG., Taylor T., Kiazzyk S., Cabiles DR., Meyers AFA., Sandstrom PA. Recommendations for sample pooling on the Cepheid GeneXpert® system using the Cepheid Xpert® Xpress SARS-CoV-2 assay. *PLoS One.* 2020;15(11 November):1–9. Doi: 10.1371/journal.pone.0241959.
29. Broder, K; Babiker, A; White T et al. Test Agreement between Roche Cobas 6800 and Cepheid GeneXpert Xpress SARS-CoV-2 Assays at High Cycle Threshold Ranges. *J Clin Microbiol.* 2020;58(8):1–3.
30. Loeffelholz MJ., Alland D., Butler-Wu SM., et al. Multicenter evaluation of the cepheid xpert xpress sars-cov-2 test. *J Clin Microbiol.* 2020;58(8):1–8. Doi: 10.1128/JCM.00926-20.

6 DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram que os ensaios moleculares que utilizam saliva como amostra biológica são uma excelente alternativa aos NPSs, sendo sensíveis e específicos o suficiente para serem utilizados nas rotinas laboratoriais. A acurácia do teste foi 96,1%. Além disso, entre as amostras com resultados discrepantes, observamos que uma delas foi negativa para anticorpos de SARS-CoV-2, três semanas após o diagnóstico, sugerindo que o paciente tinha outra infecção que não COVID-19. Nesse caso, a sensibilidade do teste de saliva aumentaria de 94,4% para 95,7%, enquanto a especificidade do teste utilizando NPS diminuiria de maneira semelhante.

No Brasil, o uso de NPS ainda tem sido o método de coleta padrão para o diagnóstico da COVID-19. No entanto, requer o uso de equipamentos de proteção individual e aumenta o risco de infecção dos profissionais de saúde que coletam a amostra. A saliva tem se mostrado um espécime confiável para detectar o coronavírus SARS desde 2004. Wang e colaboradores (2004) relataram uma alta carga viral de SARS-CoV em amostras de saliva quando comparadas ao gargarejo (12). To e colaboradores (2019) evidenciaram uma alta concordância entre saliva e aspirado nasofaríngeo para a detecção de vírus respiratórios e monitoramento da carga viral de SARS-CoV-2 durante o curso da infecção (11)(15).

Existem várias vantagens no uso de amostras de saliva para detecção de SARS-Cov-2: a amostra pode ser coletada facilmente pelo próprio paciente sem quaisquer procedimentos invasivos; a saliva permite a coleta de amostras fora de ambientes hospitalares e/ou laboratoriais e, o uso de pools poderia ser utilizado para rastrear populações maiores, como demonstramos neste trabalho. Nestes ambientes, onde muitos indivíduos necessitam de rastreamento, a saliva representa um tipo de amostra prática e não invasiva (74).

No presente estudo, a saliva foi coletada pelos próprios participantes dentro do ambiente hospitalar. Apesar de alguns autores recomendarem o uso de amostras colhidas imediatamente ao acordar (10)(15), sem consumo prévio de alimentos ou escovação dos dentes, coletamos a saliva sempre que os pacientes eram avaliados e exames médicos eram solicitados. Este procedimento simples e

fácil de realizar foi capaz de fornecer uma sensibilidade / especificidade semelhante às amostras coletadas por NPS (10).

Em um estudo anterior, a saliva era obtida por meio de dispositivos especiais de coleta (75), o que traz vantagens na qualidade e quantidade da saliva obtida. No entanto, esses dispositivos de coleta geralmente não estão disponíveis em centros de saúde, especialmente em países de baixa renda. Além disso, a coleta de saliva por meio de tais dispositivos requer a assistência de profissionais de saúde. No presente estudo, os participantes foram instruídos a cuspir repetidamente em um coletor universal estéril utilizado rotineiramente em nosso hospital. Como nenhum dispositivo especial é necessário, o uso da saliva pode ser implementado como rotina na prática clínica sem comprometer a qualidade da amostra, conforme relatado anteriormente (74)(71).

O alto grau de concordância entre os dois métodos demonstra que o uso de saliva para detecção de SARS-CoV-2 por qRT-PCR é tão confiável quanto o uso de NPS/OPS, porém com menores custos e riscos. O Brasil possui quase 21 milhões de casos acumulados de COVID-19 até o momento, o que significa que um procedimento de teste mais simples pode reduzir potencialmente os riscos e custos envolvidos na coleta de amostras (4)(13).

Nossos resultados foram comparáveis aos de estudos semelhantes que utilizaram saliva para detecção de SARS-CoV-2 e foram obtidos de uma população de pacientes acompanhados de perto em um hospital universitário (76). Os dois participantes que apresentaram resultados negativos em amostras de saliva, mas positivos em NPS, apresentavam sintomas muito inespecíficos e não se encaixavam no diagnóstico clínico de COVID-19. Os sintomas mais prevalentes para COVID-19 na população estudada não estavam presentes nesses dois casos, aumentando a chance de um resultado falso-positivo pelo NPS. O uso de um protocolo contendo 3 etapas de amplificação também aumenta a sensibilidade do teste. Estudo recente mostrou que algumas variações no genoma do SARS-CoV-2 podem impactar negativamente a sensibilidade do teste RT-PCR utilizado para sua detecção e reforça a necessidade de protocolos capazes de manter a sensibilidade e especificidade (77), como o utilizado neste estudo.

O uso do ensaio Xpert Xpress SARS-CoV-2 foi previamente validado e os resultados mostraram uma grande concordância em uma faixa de cargas virais de

SARS-CoV-2 e em coronavírus humanos estabelecidos (62) (78). No entanto, as amostras utilizadas para a validação do ensaio foram as convencionais NPS / OPS. Por outro lado, McCormick-Baw e colaboradores (2020) testaram um total de 156 NPS emparelhados e espécimes de saliva e encontraram 98% de concordância (79).

Nossos resultados demonstraram que mesmo as amostras apresentando altos valores de Ct (baixa carga viral) no ensaio qRT-PCR convencional, foram detectadas neste ensaio baseado em cartucho. Resultados semelhantes foram apresentados por Broder e colaboradores (2020), mas também utilizando NPS / OPS (80).

A correlação mais forte foi detectada entre os genes Xpert E e N2 (0,98) em comparação com os genes Charité RdRp e E (0,86), e pode demonstrar uma menor variabilidade de teste entre um teste automatizado de amplificação de ácido nucleico e outro RT-PCR convencional, conforme mostrado em um estudo de Loeffelholz e colaboradores (2020) (81).

Nosso trabalho apresenta algumas limitações, incluindo a ausência de confirmação sorológica do COVID-19 em todos os casos e a ausência de valores de ct para os testes com amostras NPS, por terem sido realizados em laboratório de referência e não estarem disponíveis para fins de comparação. No entanto, pudemos avaliar de perto os profissionais de saúde e os pacientes internados em nosso hospital e comparar o uso de duas abordagens para detecção molecular de SARS-CoV-2, com alto grau de concordância.

Nos testes utilizando a Plataforma Xpert Xpress SARS-CoV-2 houve impossibilidade de testar amostras viscosas. Algumas amostras de saliva com excesso de muco não foram incluídas neste estudo de validação. Apenas os componentes líquidos não viscosos de cada amostra foram coletados nas pipetas descartáveis para inoculação do cartucho de teste (60). Embora as amostras de saliva viscosa pudessem ser tratadas com Sputasol (Thermo Scientific) ou acetilcisteína para liquidificar a amostra, não testamos esta estratégia em nosso estudo.

7 CONCLUSÃO

Os estudos apresentados demonstram que o uso de amostras de saliva auto coletadas é uma alternativa fácil, conveniente e de baixo custo aos testes moleculares convencionais baseados em *swabs* de naso e orofaringe. A possibilidade da testagem em pools mantendo a especificidade do teste é de extrema importância na redução de custos e triagem em larga escala, principalmente dentro de centros de saúde

A utilização do sistema Xpert Xpress dentro de um ambiente hospitalar permite testes extensivos podendo reduzir bastante custos uma vez que a realização de todo o ensaio molecular ocorre em menos de uma hora. Isso reduz o tempo de resposta, aumenta o giro de leitos e proporciona colaboradores sintomáticos a retornar mais rapidamente ao trabalho em caso de resultado de teste negativo. Em contrapartida, também pode trazer benefícios fora de um ambiente laboratorial devido ao seu fácil manuseio e simplicidade na operacionalização.

Estes resultados podem permitir um uso mais amplo de testes moleculares para o manejo da pandemia de COVID19, especialmente em ambientes com recursos limitados.

REFERÊNCIAS

1. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020;579(7798):265–9.
2. Cheng VCC, Lau SKP, Woo PCY, Kwok YY. Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(4):660–94.
3. Chan JFW, Lau SKP, To KKW, Cheng VCC, Woo PCY, Yue KY. Middle East Respiratory syndrome coronavirus: Another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(2):465–522.
4. Organização Mundial da Saúde. Atualizações sobre a COVID-19 [Internet]. 2021 [cited 2021 Sep 20]. Available from: <https://covid19.who.int/>
5. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020;395(10223):497–506.
6. Ramanathan K, Antognini D, Combes A, Paden M, Zakhary B, Ogino M, et al. Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: an observational study. *Lancet Microbe*. 2020;(January):19–21.
7. Center of Disease Control and Prevention. Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens for COVID-19 [Internet]. Vol. 2019, May 22. 2020. p. 1–5. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>
8. Wang Y, Kang H, Liu X, Tong Z. Combination of RT-qPCR testing and clinical features for diagnosis of COVID-19 facilitates management of SARS-CoV-2 outbreak. *J Med Virol*. 2020;92(6):538–9.
9. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DKW, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*. 2020;25(3):1–8.
10. Wyllie AL, Fournier J, Casanovas-Massana A, Campbell M, Tokuyama M, Vijayakumar P, et al. Saliva is more sensitive for SARS-CoV-2 detection in COVID-19 patients than nasopharyngeal swabs. *medRxiv* [Internet]. 2020;(2):2020.04.16.20067835. Available from: https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.04.16.20067835v1?fbclid=IwAR19q_Mv8NnVtKwnCdZGOpvaKGuOUxNMPHS04tf08gS7vbLq1vkOcsufNIs
11. To KKW, Yip CCY, Lai CYW, Wong CKH, Ho DTY, Pang PKP, et al. Saliva as a diagnostic specimen for testing respiratory virus by a point-of-care molecular assay: a diagnostic validity study. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(3):372–8.
12. Wang W-K, Chen S-Y, Liu I-J, et al. Detection of SARS-associated Coronavirus in Throat Wash and Saliva in Early Diagnosis. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(7):1213–9.
13. 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* [Internet]. 2020;81(1):e45–50. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.04.005>
14. Chen L, Zhao J, Peng J, Li X, Deng X, Geng Z, et al. Detection of 2019-nCoV in Saliva and Characterization of Oral Symptoms in COVID-19 Patients. *SSRN Electron J*. 2020;
 15. To KKW, Tsang OTY, Leung WS, Tam AR, Wu TC, Lung DC, et al. 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* [Internet]. 2020;20(5):565–74. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30196-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30196-1)
 16. Williams E, Bond K, Zhang B, Putland M, Williamson DA. Saliva as a non-invasive specimen for detection of SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol*. 2020;50(April).
 17. McCormick-baw C, Morgan K, Gaffney D, Cazares Y, Jaworski K, Byrd A, et al. Saliva as an Alternate Specimen Source for Detection of SARS- CoV-2 in Symptomatic Patients Using Cepheid Xpert Xpress. *J Clin Microbiol*. 2020;58(8):2–3.
 18. Pene F, Merlat A, Vabret A, Rozenberg F, Buzyn A, Dreyfus F, et al. Coronavirus 229E-Related Pneumonia in Immunocompromised Patients. *Clin Infect Dis*. 2003;37(7):929–32.
 19. Vijgen L, Keyaerts E, Moës E, Maes P, Duson G, Van Ranst M. Development of one-step, real-time, quantitative reverse transcriptase PCR assays for absolute quantitation of human coronaviruses OC43 and 229E. *J Clin Microbiol*. 2005;43(11):5452–6.
 20. Wang LF, Cowled C. Bats and Viruses: A New Frontier of Emerging Infectious Diseases. *Bats Viruses A New Front Emerg Infect Dis*. 2015;1–368.
 21. Nelson Lee, David Hui, Alan Wu et al. A Major Outbreak of Severe Acute Respiratory Syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med*. 2003;348(20):1986-94.
 22. de Groot RJ, Baker SC, Baric RS, Brown CS, Drosten C, Enjuanes L, et al. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV): Announcement of the Coronavirus Study Group. *J Virol*. 2013;87(14):7790–2.
 23. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020;382(8):727–33.
 24. Organização Pan- Americana da Saúde. Histórico da pandemia de COVID-19 [Internet]. 2020. Available from: <https://www.paho.org/pt/covid19/historico-da-pandemia-covid-19>
 25. INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. Coronaviridae. [Internet]. 2011 [cited 2021 Aug 3]. Available from: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_%0Areport/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/222/coronaviridae
 26. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol*. 2020;5(4):536–44.
 27. Li X, Geng M, Peng Y, Meng L, Lu S. Molecular immune pathogenesis and

- diagnosis of COVID-19. *J Pharm Anal* [Internet]. 2020;10(2):102–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.03.001>
28. Helmy YA, Fawzy M, Elasad A, Sobieh A, Kenney SP, Shehata AA. The COVID-19 pandemic: A comprehensive review of taxonomy, genetics, epidemiology, diagnosis, treatment, and control. *J Clin Med*. 2020;9(4).
 29. Chan JF, Kok K. Correction to: Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan (*Emerging Microbes & Infections*, (2020), 9, 1, (221-236), 10.1080/22221751.2020.1719902). *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):540.
 30. FEHR, A. R.; PERLMAN S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. In: Press:Spring H, editor. *Coronaviruses: methods and protocols*. New York; 2015. p. 1–23.
 31. Malik YA. Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. *Malaysian J Pathol*. 2020;42(1):3–11.
 32. Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol*. 2020;92(4):418–23.
 33. Benvenuto D, Giovanetti M, Ciccozzi A, Spoto S, Angeletti S, Ciccozzi M. The 2019-new coronavirus epidemic: Evidence for virus evolution. *J Med Virol*. 2020;92(4):455–9.
 34. Choo SW, Zhou J, Tian X, Zhang S, Qiang S, O'Brien SJ, et al. Are pangolins scapegoats of the COVID-19 outbreak-CoV transmission and pathology evidence? *Conserv Lett*. 2020;13(6):1–12.
 35. Moya A, Elena SF, Bracho A, Miralles R, Barrio E. The evolution of RNA viruses: A population genetics view. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(13):6967–73.
 36. Pachetti M, Marini B, Benedetti F, Giudici F, Mauro E, Storici P, et al. Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. *J Transl Med* [Internet]. 2020;18(1):1–9. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02344-6>
 37. Korber B, Fischer WM, Gnanakaran S, Yoon H, Theiler J, Abfalterer W, et al. Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell*. 2020;182(4):812-827.e19.
 38. Volz E, Hill V, McCrone JT, Price A, Jorgensen D, O'Toole Á, et al. Evaluating the Effects of SARS-CoV-2 Spike Mutation D614G on Transmissibility and Pathogenicity. *Cell*. 2021;184(1):64-75.e11.
 39. Leung K, Shum MHH, Leung GM, Lam TTY, Wu JT. Early transmissibility assessment of the N501Y mutant strains of SARS-CoV-2 in the United Kingdom, October to November 2020. *Eurosurveillance* [Internet]. 2020;26(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.26.1.2002106>
 40. Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, Iranzadeh A, Fonseca V, Giandhari J, et al. Emergence and rapid spread of a new severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) lineage with multiple spike mutations in South Africa. *medRxiv*. 2020;2.
 41. Voloch, Carolina M; Almeida, Ronaldo da S F Luiz G P, de Cardoso, Cynthia et al. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2 lineage from Rio de

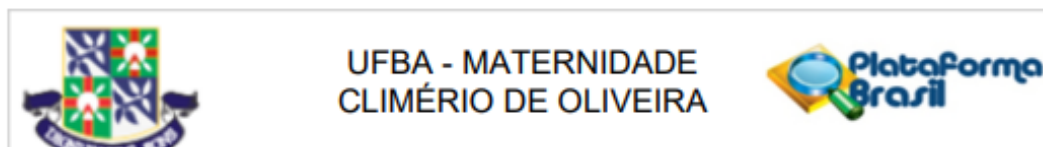
- Janeiro, Brazil. medRxiv Prepr. 2020;
42. European Centre for Disease Prevention and Control. Threat assessment brief: emergence of SARS-CoV-2 B.1.617 variants in India and situation in the EU/EEA. [Internet]. 2021 [cited 2021 May 20]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/threat-assessment-emergence-sars-cov-2-b1617-variants>
 43. Hamming, I.; Timens, W.; Bulthuis L. et al. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis 10.1002. *J Pathol.* 2004;203(2):631–7.
 44. Teles SG da S, Castro MCSR de, Dutra SN, Santos LMS. Uso da saliva como um espécime alternativo para diagnóstico de COVID-19: uma revisão sistemática. *Arch Heal Investig.* 2020;9(4):320–4.
 45. Heald-Sargent T, Gallagher T. Ready, set, fuse! the coronavirus spike protein and acquisition of fusion competence. *Viruses.* 2012;4(4):557–80.
 46. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* [Internet]. 2020;395(10229):1033–4. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30628-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30628-0)
 47. U.S Food and Drug Administration. Coronavirus Testing Basics. 2021.
 48. U.S Food and Drug Administration. In Vitro Diagnostics EUAs - Molecular Diagnostic Tests for SARS-CoV-2 [Internet]. 2021 [cited 2021 Apr 20]. Available from: <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/in-vitro-diagnostics-euas-molecular-diagnostic-tests-sars-cov-2>
 49. Chu DKW, Pan Y, Cheng SMS, Hui KPY, Krishnan P, Liu Y, et al. Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clin Chem.* 2020;66(4):549–55.
 50. Chan, JFW; Yip, CCY; To K et al. Improved Molecular Diagnosis of COVID-19 by the Novel, Highly Sensitive and Specific COVID-19-RdRp/HeI Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay Validated In Vitro and with Clinical Specimens. *J Clin Microbiol.* 2020;58(5):1–10.
 51. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* [Internet]. 2020;395(10224):565–74. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
 52. Zhou P, Yang X Lou, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* [Internet]. 2020;579(7798):270–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
 53. Feng W, Newbigging AM, Le C, Pang B, Peng H, Cao Y, et al. Molecular Diagnosis of COVID-19: Challenges and Research Needs. *Anal Chem.* 2020;92(15):10196–209.
 54. Zou, Lirong; Ruan, Feng; Huang M et al. SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. *N Engl J Med.* 2020;382(12).
 55. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature.*

- 2020;581(7809):465–9.
56. Bal A, Destras G, Gaymard A, Stefic K, Marlet J, Eymieux S, et al. Two-step strategy for the identification of SARS-CoV-2 variant of concern 202012/01 and other variants with spike deletion H69–V70, France, August to December 2020. *Eurosurveillance*. 2021;26(3):1–5.
 57. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* (80-). 1988;239(4839):487–91.
 58. McPherson, MJ.; Moller S. PCR. 1st ed. Beynon, Bob; Howe C, editor. Oxford UK: BIOS Scientific Publishers Limited; 2000. 1–271 p.
 59. Tajadini M, Panjehpour M, Javanmard S. Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Adv Biomed Res*. 2014;3(1):85.
 60. Cepheid. Xpert® Xpress SARS-CoV-2 Test: package insert. [Internet]. 2020. Available from: <https://www.fda.gov/media/136315/download>
 61. Vaz, S.N.; de Santana, D.S.; Netto, E.M.; Pedroso, C.; Wang, W.K.; Santos, F.D.A.; Brites C. Saliva is a reliable, non-invasive specimen for SARS-CoV-2 detection. *Brazilian J Infect Dis* [Internet]. 2020; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.116544>
 62. Goldenberger D, Leuzinger K, Sogaard KK, Gosert R, Rolo T, Naegele K, et al. Brief validation of the novel GeneXpert Xpress SARS-CoV-2 PCR assay. *J Virol Methods*. 2020;284(January):1–3.
 63. Farnaud SJC, Kostic O, Getting SJ, Renshaw D. Saliva: Physiology and diagnostic potential in health and disease. *ScientificWorldJournal*. 2010;10:434–56.
 64. Navazesh M. Saliva in health and disease. *J Calif Dent Assoc*. 2011;39(9):626–8.
 65. Aps JKM, Martens LC. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int*. 2005;150(2–3):119–31.
 66. Sri Santosh T, Parmar R, Anand H, Srikanth K, Saritha M. A Review of Salivary Diagnostics and Its Potential Implication in Detection of Covid-19. *Cureus*. 2020;12(4).
 67. Dodds MWJ, Johnson DA, Yeh CK. Health benefits of saliva: A review. *J Dent*. 2005;33(3 SPEC. ISS.):223–33.
 68. Musso D, Roche C, Nhan TX, Robin E, Teissier A, Cao-Lorme VM. Detection of Zika virus in saliva. *J Clin Virol* [Internet]. 2015;68:53–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2015.04.021>
 69. Besnard M, Lastère S, Teissier A, Cao-Lorme VM, Musso D. Evidence of perinatal transmission of zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Eurosurveillance* [Internet]. 2014;19(13):20751. Available from: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.13.20751>
 70. Corstjens PLAM, Abrams WR, Malamud D. Saliva and viral infections. *Periodontol 2000*. 2016;70(1):93–110.
 71. To KK, Lu L, Yip CC, Poon RW, Fung AM, Cheng A, et al. Additional molecular testing of saliva specimens improves the detection of respiratory

- viruses. *Emerg Microbes Infect.* 2017;6(6).
72. Khurshid Z, Zohaib S, Najeeb S, Zafar MS, Slowey PD, Almas K. Human saliva collection devices for proteomics: An update. *Int J Mol Sci.* 2016;17(6).
 73. Khurshid Z, Asiri FYI, Al Wadaani H. Human saliva: Non-invasive fluid for detecting novel coronavirus (2019-nCoV). *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(7):17–20.
 74. To KKW, Tsang OTY, Chik-Yan Yip C, Chan KH, Wu TC, Chan JMC, et al. Consistent detection of 2019 novel coronavirus in saliva. *Clin Infect Dis.* 2020;(Xx Xxxx):4–6.
 75. Sueki A, Matsuda K, Yamaguchi A, Uehara M, Sugano M, Uehara T, et al. Evaluation of saliva as diagnostic materials for influenza virus infection by PCR-based assays. Vol. 453, *Clinica Chimica Acta.* 2016. p. 71–4.
 76. Pasomsub E, Watcharananan SP, Boonyawat K, Janchompoo P, Wongtabtim G, Sukswan W, et al. Saliva sample as a non-invasive specimen for the diagnosis of coronavirus disease 2019: a cross-sectional study. *Clin Microbiol Infect [Internet].* 2020;(xxxx). Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.05.001>
 77. Peñarrubia L, Ruiz M, Porco R, Rao SN, Juanola-Falgarona M, Manissero D, et al. Multiple assays in a real-time RT-PCR SARS-CoV-2 panel can mitigate the risk of loss of sensitivity by new genomic variants during the COVID-19 outbreak. *Int J Infect Dis.* 2020;97(January):225–9.
 78. Becker MG, Taylor T, Kiazzyk S, Cabiles DR, Meyers AFA, Sandstrom PA. Recommendations for sample pooling on the Cepheid GeneXpert® system using the Cepheid Xpert® Xpress SARS-CoV-2 assay. *PLoS One [Internet].* 2020;15(11 November):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0241959>
 79. McCormick-Baw C, Morgan K, Gaffney D, Cazares Y, Jaworski K, Byrd A, et al. 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.* 2020;(May).
 80. Broder, K; Babiker, A; White T et al. Test Agreement between Roche Cobas 6800 and Cepheid GeneXpert Xpress SARS-CoV-2 Assays at High Cycle Threshold Ranges. *J Clin Microbiol.* 2020;58(8):1–3.
 81. Loeffelholz MJ, Alland D, Butler-Wu SM, Pandey U, Perno CF, Nava A, et al. Multicenter evaluation of the cepheid xpert xpress sars-cov-2 test. *J Clin Microbiol.* 2020;58(8):1–8.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização clínico-epidemiológica, resposta imune, e avaliação diagnóstica da COVID-19 na Bahia.

Pesquisador: CARLOS BRITES

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 31748320.3.1001.5543

Instituição Proponente: Fundação Bahiana de Infectologia

Patrocinador Principal: CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO-CNPQ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.042.620

Apresentação do Projeto:

A doença clínica denominada COVID-19 é causada por um novo betacoronavírus, atualmente chamado SARS-CoV-2. O SARS-CoV-2 compartilha 88% de identidade de sequência com o SARS-CoV, o vírus que causou um grande surto em 2002-2003. O número de casos desta nova doença começou a aumentar exponencialmente, alguns dos quais não já tinham exposição ao mercado animal vivo de Wuhan, sugerindo o fato de que a transmissão humano-humano estava ocorrendo. Os casos continuaram a aumentar exponencialmente e os estudos de modelagem relataram inicialmente uma epidemia duplicando com o tempo de 1,8 d. Dados iniciais mostravam que dos infectados, 20% se apresentavam em estado crítico, 25% se recuperaram e 3310 (3013 na China e 297 em outros países) morreram já no fim de janeiro. Todas as idades são suscetíveis ao SARS-CoV2. A infecção é transmitida através de grandes gotículas geradas durante a tosse e espirro por pacientes sintomáticos, mas também pode ocorrer a partir de pessoas assintomáticas e antes do início dos sintomas. Estudos iniciais têm mostrado maiores cargas virais nas cavidades nasais em comparação com a garganta sem diferença na carga viral entre pessoas sintomáticas e assintomáticas. O vírus pode permanecer viável em superfícies por dias em condições atmosféricas favoráveis, mas são destruídos em menos de um minuto por desinfetantes comuns como hipoclorito sódico, peróxido de hidrogênio, etc. A infecção é adquirida por inalação dessas gotículas ou por superfícies de toque contaminadas por elas e, em seguida, tocando o nariz, boca

Endereço: Rua do Limoeiro, 137

Bairro: Nazaré

UF: BA

Telefone: (71)3283-9210

Município: SALVADOR

CEP: 40.055-150

E-mail: cepmco@ufba.br



Continuação do Parecer: 4.042.620

Pesquisadores	pdf	14:32:27	CARLOS BRITES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_Compromisso_Marcia_Sampaio_HB.pdf	13/05/2020 14:13:12	CARLOS BRITES	Aceito
Outros	Carta_Anuencia_FBal.pdf	13/05/2020 12:55:25	CARLOS BRITES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_de_Infraestrutura_FBal.pdf	13/05/2020 12:55:11	CARLOS BRITES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_Compromisso_Celia_Pedroso.pdf	13/05/2020 12:54:51	CARLOS BRITES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_compromisso_sigilo_Michael.pdf	13/05/2020 12:54:40	CARLOS BRITES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_Compromisso_Nadja_Pacheco.pdf	13/05/2020 12:54:30	CARLOS BRITES	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_13MAIO2020.pdf	13/05/2020 12:54:19	CARLOS BRITES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SALVADOR, 22 de Maio de 2020

Assinado por:
Eduardo Martins Netto
(Coordenador(a))

Endereço: Rua do Limoeiro, 137
Bairro: Nazaré **CEP:** 40.055-150
UF: BA **Município:** SALVADOR
Telefone: (71)3283-9210 **E-mail:** cepmco@ufba.br

Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

<p>Título do Estudo “Caracterização clínico-epidemiológica, resposta imune, e avaliação diagnóstica da COVID-19 na Bahia”</p> <p>Pesquisador Responsável: Dr. Carlos Brites</p>
<p>Introdução:</p> <p>Você está sendo convidado a participar de um estudo porque é profissional de saúde ou portador do HIV ou está em tratamento para tuberculose ou está em uso de hidroxicloroquina. Antes que decida participar ou não como voluntário nesta pesquisa é importante que você leia cuidadosamente este formulário e compreenda por que esta pesquisa está sendo feita, o que ela envolve, como sua participação poderá ajudá-lo (a) e o que é esperado de você durante a pesquisa.</p> <p>Este termo de consentimento foi revisado e aprovado por um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), que é responsável por revisar estudos de pesquisa com o objetivo de proteger os direitos e o bem-estar das pessoas que estão participando. Algumas informações contidas neste termo de consentimento são exigidas por normas brasileiras.</p>
<p>Objetivo do Estudo</p> <p>O objetivo deste estudo é saber quantas pessoas foram e estão infectadas com a COVID-19 em populações específicas na cidade de Salvador e avaliar a evolução dessa doença. Além disso, pretendemos estudar os fatores associados com os diferentes níveis de gravidade da doença.</p>
<p>Duração do Estudo</p> <p>A sua participação no estudo é estimada em 45 dias, pois pretendemos repetir os testes iniciais após este período, para saber se ocorreram infecções em pessoas que antes tinham testes negativos para a doença. Caso seu teste seja positivo nas avaliações iniciais, você será convidado a repetir o exame após 6 meses, para avaliar a mudança nos níveis de anticorpos nesse período.</p>
<p>Descrição do Estudo</p> <p>Este estudo será realizado pela Fundação Bahiana de Infectologia. Incluiremos no estudo profissionais de saúde e indivíduos atendidos nos ambulatórios de referência para COVID-19, HIV e tuberculose.</p>
<p>Procedimento do Estudo</p> <p>Após entender e concordar em participar, solicitaremos seus dados através de entrevista no momento da admissão no estudo, coletaremos amostras de sangue (2 colheres de sopa), e saliva (auto-coleta) para realização dos testes para coronavírus.</p> <p>Para os participantes do grupo de profissionais de saúde será realizado também um questionário de qualidade de vida e uma avaliação dos sinais de esgotamento.</p>

Uso do Material Coletado, Dados e Confidencialidade

Conforme descrito acima, o sangue e saliva armazenados serão mantidos em local seguro no Biorrepositório (local de armazenamento das amostras biológicas). Para esta pesquisa, o biorrepositório ficará no Laboratório de Pesquisa em Infectologia (LAPI), localizado em Salvador, onde esta pesquisa também será realizada.

Nenhuma amostra coletada será identificada com seu nome, usaremos códigos para manter a sua confidencialidade. Esse material poderá ficar armazenado por um período de até 10 anos. Se desejarmos armazenar o material por mais tempo, uma renovação desse período será solicitada às autoridades aplicáveis e o armazenamento só continuará se forem recebidas as devidas aprovações.

Pesquisas futuras serão submetidas a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa, antes de serem iniciadas. Se houver aprovação, você será contatado para dizer se concorda com o uso do seu material biológico (sangue e/ou saliva), a cada nova pesquisa, através da assinatura de novo Termo de Consentimento específico.

Precisamos saber se você aceita que suas amostras sejam armazenadas. Por favor, marque SIM ou NÃO abaixo:

SIM _____ NÃO _____

Você tem direito de saber os resultados obtidos com a utilização do seu material e a receber orientações quanto às consequências destes resultados, caso haja alguma. Para isso você poderá contatar o pesquisador responsável pelo estudo (Dr. Carlos Brites) através do telefone no fim deste documento.

O sangue e/ ou saliva armazenado neste biorrepositório continuará sendo seu, permanecendo, entretanto, sob responsabilidade da instituição. Assim, você, ou seu representante legal, pode retirar o consentimento de armazenamento das amostras a qualquer tempo, sem nenhum prejuízo para você ou seu tratamento. Para isso, você deverá formalizar sua desistência através de um documento assinado e datado por você ou por seu representante legal. A desistência será válida a partir desta data e nós destruiremos suas amostras. Você pode desistir de participar do estudo e manter suas amostras já coletadas armazenadas para o estudo e/ou para estudos futuros, sem nenhum prejuízo.

Riscos Potenciais, Efeitos Colaterais e Desconforto.

Os riscos associados com a coleta de sangue incluem: dor, hematoma, ou outro desconforto no local da coleta do sangue. Raramente desmaio ou infecções no local da coleta podem ocorrer. Para minimizar estes riscos o procedimento será feito por profissional qualificado usando material adequado.

Benefícios para o Participante

Os resultados obtidos com este estudo poderão ajudar os médicos a entender melhor a infecção por Coronavírus, identificar pacientes que podem evoluir com maior gravidade e com isso melhorar o tratamento desses pacientes. Você pode não obter benefício direto nesse estudo, mas, esse conhecimento pode ajudar futuros pacientes. Se houver algum resultado que possa beneficia-lo, iremos comunicar-lhe imediatamente.

Compensação

Você não terá nenhum custo para participar deste protocolo de pesquisa. De acordo com as normas brasileiras, você não será pago por participar deste estudo.

Participação Voluntária/Desistência do Estudo

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária, ou seja, você somente participa se quiser. A não participação nesse estudo não alterará a sua relação da equipe médica caso você esteja em tratamento. Após assinar este consentimento, você terá total liberdade de retirá-lo a qualquer momento e deixar de participar do estudo se assim o desejar, sem quaisquer prejuízos à continuidade do tratamento e acompanhamento na instituição.

Novas Informações

Quaisquer novas informações que possam afetar a sua segurança ou influenciar na sua decisão de continuar a participação no estudo serão fornecidas a você por escrito.

Utilização de Registros Médicos e Confidencialidade

Como participante de pesquisa, sua privacidade será respeitada, seu nome e qualquer outro dado que possa lhe identificar serão mantidos em sigilo. Os pesquisadores se responsabilizam pela guarda e confidencialidade das informações, bem como a não exposição dos dados de pesquisa. Somente nos casos previstos em Lei será possível a quebra do sigilo e confidencialidade.

Todos os questionários e outros formulários utilizados neste projeto serão armazenados em armário trancado. Esses dados serão destruídos assim que não forem mais necessários. Os resultados desta pesquisa serão analisados e possivelmente publicados em revistas médicas, mas em momento algum seu nome será exposto ou divulgado.

Quem Devo Entrar em Contato em Caso de Dúvida

Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O responsável pelo estudo nesta instituição é Dr. Carlos Brites que poderá ser encontrado no endereço abaixo:

Fundação Bahiana de Infectologia, Rua João das Botas, Centro Médico João das Botas, 185, sala 705, Canela. CEP: 40.110-160. Salvador/BA

Número de telefone do centro de pesquisa: (71) 3283-8123 Número de telefone 24 horas: (71) 98643-7227

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar:

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia - Largo do Terreiro de Jesus, s/n, Centro Histórico, CEP 40.026-010, Salvador, Bahia, Brasil.

Tel.: +55 (71) 3283-5564

Registros médicos e assinatura

Eu autorizo a utilização dos meus dados e ou registros médicos (prontuários médicos) pelo pesquisador, autoridades regulatórias e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição. Este consentimento foi elaborado em duas vias. Você vai receber uma via deste consentimento para mantê-lo com você, e outra via ficará com o pesquisador.

Nome do Participante de Pesquisa	Data
Assinatura do Participante de Pesquisa	
Nome do Representante Legal ou Testemunha (quando aplicável)	Data
Assinatura do Representante Legal ou Testemunha (quando aplicável)	

Nome da pessoa que obteve o Consentimento	Data
Assinatura da Pessoa que obteve o Consentimento	

ANEXO C – Artigo Publicado

BRAZ J INFECT DIS. 2021;25(4):101603


 The Brazilian Journal of
INFECTIOUS DISEASES
www.elsevier.com/locate/bjid

Brief Communication
Self-prescribed Ivermectin use is associated with a lower rate of seroconversion in health care workers diagnosed with COVID, in a dose-dependent response


Célia Pedrosa^a, Sara Vaz^{ib}, Eduardo Martins Netto^b, Daniele Souza^a, Felice Deminco^a, Rafaela Mayoral^a, Eliana Menezes^b, Ana Patricia Amancio da Cunha^a, Andres Moreira-Soto^b, Jan Felix Drexler^{b,c}, Carlos Brites^{ib}^{a,*}

^a Federal University of Bahia, Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, Laboratório de Pesquisa em Infectologia (LAPI), Bahia, BA, Brazil

^b Charité-Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, Institute of Virology, Berlin, Germany

^c German Centre for Infection Research, Berlin, Germany

ARTICLE INFO
Article history:

Received 19 May 2021

Accepted 5 July 2021

Available online 12 August 2021

ABSTRACT

Background: Over-the-counter use of ivermectin amongst other drugs as SARS-CoV-2 treatment has been increasingly common, despite the lack of evidence on its clinical efficacy.

Objective: To evaluate the effect of ivermectin use on production of antibodies against SARS-CoV-2 in health care workers (HCW) diagnosed with COVID-19 and of Th1/Th2 cytokines by stimulated peripheral blood mononuclear cells of the same cohort (PBMCs).

Methods: This cross-sectional study evaluated seroconversion and neutralizing antibodies production in HCW at Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (Salvador, Brazil), diagnosed with COVID-19 from May to July, 2020, as well as *in vitro* production of antibody against SARS-CoV-2 and Th1/Th2 cytokines. Analyses were performed between December 2020 and February 2021. Participants were stratified according to the use of ivermectin (≤ 1 dose vs. multiple doses) for treatment of COVID-19.

Results: 45 HCW were included (62% women). Mean age was 39 years, and disease severity was similar across groups. Neutralizing antibodies were detected less frequently in multiple doses (70%) vs. ≤ 1 dose (97%) groups, $p = 0.02$. PBMCs of patients in multiple doses group also were less likely to produce antibodies against SARS-CoV-2 following *in vitro* stimulation with purified spike protein in comparison with patients in ≤ 1 dose group ($p < 0.001$). PBMCs production of Th1/Th2 cytokines levels was similar across groups. Abdominal pain (15% vs 46%, $p = 0.04$), diarrhea (21% vs. 55%, $p = 0.05$) and taste perversion (0% vs. 18%, $p = 0.05$) were more frequently reported by participants that used multiple doses of ivermectin.

Conclusions: Although there was no evidence for differential disease severity upon ivermectin use for treatment of COVID-19 it was associated with more gastro-intestinal side-effects and impairment of anti-SARS-CoV2 antibodies production, in a dose dependent manner.

* Corresponding author.

E-mail address: crbrites@gmail.com (C. Brites).

<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2021.101603>

1413-8670/© 2021 Sociedade Brasileira de Infectologia. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Received: 20 August 2021 | Revised: 25 October 2021 | Accepted: 9 November 2021

DOI: 10.1111/odi.14086

ORIGINAL ARTICLE




Chlorhexidine mouthwash reduces the salivary viral load of SARS-CoV-2: A randomized clinical trial

Denis Damião Costa¹  | Carlos Brites^{2,3}  | Sara Nunes Vaz³  |
Daniele Souza de Santana³  | Jean Nunes dos Santos^{1,4}  | Patricia Ramos Cury^{1,5} 

¹Postgraduate Program in Dentistry and Health, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil

²Infectious Diseases Research Laboratory, Professor Edgard Santos Hospital, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil

³Postgraduate Program in Medicine and Health, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil

⁴Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil

⁵Department of Periodontology, School of Dentistry, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil

Correspondence

Patricia Ramos Cury, School of Dentistry (UFBA), Avenida Araújo Pinho, 62. Zip code 40110-150, Salvador/Bahia, Brazil. Email: patricia.cury@ufba.br

Funding information

The authors were supported by The Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (303861/2018-5 and 407711/2018-0) and The Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (0009/2014)

Abstract

Objectives: This study aimed to evaluate the effect of 0.12% chlorhexidine gluconate on the salivary load of SARS-CoV-2.

Materials and Methods: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial was performed on 100 participants positive for SARS-CoV-2. In the test group ($n = 50$), volunteers gargled with a mouthwash containing 15 ml of 0.12% chlorhexidine gluconate for 1 min, while the control group ($n = 50$) used a placebo. Saliva samples were obtained before (baseline) and 5 and 60 min after using the solutions. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays (qRT-PCR) were carried out and the cycle threshold (Ct) was computed. The chi-square test and t-test were used for group comparison ($p \leq 0.05$).

Results: The differences in Ct values between the 5-min evaluation and baseline (test group: 2.19 ± 4.30 ; control: -0.40 ± 3.87 , $p = 0.002$) and between 60 min and baseline (test group: 2.45 ± 3.88 ; control: 0.76 ± 4.41 , $p = 0.05$) were significantly greater in the test group, revealing a reduction of viral load. Furthermore, there was a reduction in the load of SARS-CoV-2 in 72% of the volunteers using chlorhexidine versus 30% in the control group ($p = 0.001$).

Conclusions: Chlorhexidine gluconate (0.12%) was effective in reducing salivary SARS-CoV-2 load for at least 60 min.

KEYWORDS

clinical trial, COVID-19, infection control, mouthwash, pandemic, viral load

ANEXO E – Artigo submetido

Título do Artigo: High seroprevalence of SARS-CoV-2 in cats, Brazil 2020

Revista: Transboundary and Emerging Diseases. **Fator de Impacto:** 5,005

Submetido em: 28/09/2021

Transboundary and Emerging Diseases - Account Created in ScholarOne Manuscripts



Anjaisana Sashikummar <onbehalfof@manuscriptcentral.com>

Tue, 28/09/2021 09:58

Para: Você

28-Sep-2021

Dear Dr. Vaz:

A manuscript titled High seroprevalence of SARS-CoV-2 in cats, Brazil 2020 (TBED-SC-1186-21) has been submitted by Dr. Edmilson Oliveira-Filho to the Transboundary and Emerging Diseases.

You are listed as a co-author for this manuscript. We have created a reviewer account for you on the ScholarOne peer-review site for Transboundary and Emerging Diseases. We hope that you will consider reviewing manuscripts for us. (Please note that your reviewer account must remain active in our system while any of your own manuscripts are under review.)

Your USER ID and PASSWORD for your account is as follows:

Site URL: <https://na01.safelinks.protection.outlook.com/?url=https%3A%2F%2Fmc.manuscriptcentral.com%2Ftbed&data=04%7C01%7C%7C0a55a5623a314388ad708d982668498%7C84df9e7fe9f640afb435aaaaaaaaaaaa%7C1%7C0%7C637684199100828598%7CUnknown%7CWFpbGZsb3d8evWjoiMCM4wJAwMDA1CjoiV2luMzllLjBTIi6k1haWwici1hWwllCjVXCl6Mm0%3D%7C10000&psdata=y1%2EckBuar8%2Fh5Ja2%2BbFVOBe8xWCyullEncl%28UYkLX%3D&reserved=0>

USER ID: saranunes02@hotmail.com

PASSWORD: https://na01.safelinks.protection.outlook.com/?url=https%3A%2F%2Fmc.manuscriptcentral.com%2Ftbed%3FURL_MASK%3D0f6e66144e543ee9be211d54ba3a1bc&data=04%7C01%7C%7C0a55a5623a314388ad708d982668498%7C84df9e7fe9f640afb435aaaaaaaaaaaa%7C1%7C0%7C637684199100828598%7CUnknown%7CWFpbGZsb3d8evWjoiMCM4wJAwMDA1CjoiV2luMzllLjBTIi6k1haWwici1hWwllCjVXCl6Mm0%3D%7C10000&psdata=u8UDDeclXlVn3QIqWjIQV48Yng%2FRa6ftDR0dYD04%3D&reserved=0

Thank you for your participation.

Sincerely,

Anjaisana Sashikummar
Transboundary and Emerging Diseases Editorial Office
TBEDeditorial@wiley.com

By submitting a manuscript to or reviewing for this publication, your name, email address, and affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication, including sharing with the publisher (Wiley) and partners for production, publication and improvements to the authoring process. The publication and the publisher recognize the importance of protecting the personal information collected from users in the operation of these services, and have practices in place to ensure that steps are taken to maintain the security, integrity, and privacy of the personal data collected and processed. You can learn more at

<https://na01.safelinks.protection.outlook.com/?url=https%3A%2F%2Fwww.wiley.com%2Fprivacy&data=04%7C01%7C%7C0a55a5623a314388ad708d982668498%7C84df9e7fe9f640afb435aaaaaaaaaaaa%7C1%7C0%7C637684199100828598%7CUnknown%7CWFpbGZsb3d8evWjoiMCM4wJAwMDA1CjoiV2luMzllLjBTIi6k1haWwici1hWwllCjVXCl6Mm0%3D%7C10000&psdata=6rC68b395H7ek4eChcvFVWvwmJlknPnKnW5Vj0s%3D&reserved=0>

Log in to Remove This Account - https://na01.safelinks.protection.outlook.com/?url=https%3A%2F%2Fmc.manuscriptcentral.com%2Ftbed%3FURL_MASK%3D0f6e66144e543ee9be211d54ba3a1bc&data=04%7C01%7C%7C0a55a5623a314388ad708d982668498%7C84df9e7fe9f640afb435aaaaaaaaaaaa%7C1%7C0%7C637684199100828598%7CUnknown%7CWFpbGZsb3d8evWjoiMCM4wJAwMDA1CjoiV2luMzllLjBTIi6k1haWwici1hWwllCjVXCl6Mm0%3D%7C10000&psdata=dbKPrclNl8xHMMGszGj6DkxH9FLSHkU5Y7DixYjce%3D&reserved=0

High seroprevalence of SARS-CoV-2 in cats, Brazil 2020

Edmilson F. de Oliveira-Filho^{1*}, Otávio V. de Carvalho², Ianei O. Carneiro³, Fagner D'ambroso Fernandes⁴, Sara Nunes³, Célia Pedroso³, Lilian Gonzales-Auza¹, Victor Carvalho Urbietta¹, Arne Kühne¹, Andrés Moreira-Soto¹, Chantal B.E.M. Reusken⁵, Christian Drosten¹, Eduardo Martins Netto³, Luiz Eduardo Ristow², Rita de Cassia Maia⁶, Fernanda S. Flores⁴, Nadia Rossi de Almeida³, Roberto Franke³, Jan Felix Drexler^{1, 6, #}

¹Institute of Virology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, Germany

²Tecsa Laboratorios, Belo Horizonte, Brazil

³Federal University of Bahia, Salvador, Brazil

⁴Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

⁴Centre for Infectious Disease Control, National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, the Netherlands

⁵Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Brazil

⁶German Centre for Infection Research (DZIF), associated partner site Charité, Berlin, Germany

Corresponding author: Professor Dr. Jan Felix Drexler, Helmut-Ruska-Haus, Institute of Virology, Campus Charité Mitte, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany, Tel.: +49 30 450 625461/Fax: +49 30 450 7525907, felix.drexler@charite.de

Keywords

SARS-CoV-2, cats, serology, zoonosis

ABSTRACT

SARS-CoV-2 can infect carnivores, acquiring mutations during host adaptation. Among 547 cats sampled between July-November 2020 from southern, southeastern and northeastern Brazil, SARS-CoV-2 seroprevalence was 7.3% (95% CI, 5.3-9.8). High seroprevalence substantiated frequent infection of domestic cats and raises concerns on potential SARS-CoV-2 mutations in cats endangering humans upon spillback.

To the editor: Beyond humans, carnivores are particularly susceptible to SARS-CoV-2 (1). Molecular and serological evidence indicated cats globally can be infected by SARS-CoV-2, predominantly from infected humans, but also from other cats (2-4). During the 2003-2004 outbreak of SARS-CoV, it was speculated that mutations enabling efficient infection of humans may have arisen in cive intermediate hosts (1). In minks infected from humans with

SARS-CoV-2, mutations have arisen and caused reduced antibody-mediated neutralization in human serum samples (5). Different from minks that are kept as farmed animals in some countries only, over 370 million cats globally live in close contact with humans (see: <https://www.statista.com/statistics/1044386/dog-and-cat-pet-population-worldwide/>). Brazil is one of the countries most affected by the pandemic with high transmission rates, different variants of concern (VOC), and >half a million of deaths (6). Whether there is infection of cats in Brazil with SARS-CoV-2 and the extent thereof remains unknown.

To assess the SARS-CoV-2 seroprevalence in cats in Brazil during the pandemic, we obtained a total of 547 serum samples from cats sampled for routine laboratory diagnostic between July-November 2020 from different states in Brazil (**Table 1**). Sampling was approved by the Federal University of Bahia's animal ethics committee under authorization no. 74/2019. Serum samples were first screened with a highly specific receptor-binding domain (RBD)-based SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test (cPass, GenScript, <https://www.genscript.com>), which does not require species-specific detection antibodies and should thus be usable in cats. However, because the cPass test is not validated for usage in cats and because it is based on an early SARS-CoV-2 strain that may not be representative of SARS-CoV-2 variants predominating in Brazil, all reactive sera (cPass signal inhibition ratio ≥ 1.0) were confirmed by plaque reduction neutralization test (PRNT) against the SARS-CoV-2 Gamma (10915/2021 lineage B.1.1.28) variant of concern (VOC). We chose the Gamma variant because of its predicted emergence time between June-November 2020 in Brazil (6), which overlaps with our sampling dates and because the Gamma VoC rapidly became the predominant SARS-CoV-2 lineage in Brazil (6), likely due to immune escape mediated by E484K, K417T, N501Y mutations in the RBD of the Gamma variant (7). Additionally, 34 pre-pandemic serum samples from routine laboratory diagnostic were included to investigate whether the immune background caused by infections with common feline pathogens would influence our tests by eliciting false-positive antibody results, as previous shown in humans (8) .

Among the 34 pre-pandemic serum samples, 15 (42.1%, 95% CI, 27.2-62.1) were reactive in the cPass test (**Figure 1B**), and 6 of those serum samples (17.7 %, 95% CI, 6.8-34.5) presented measurable SARS-CoV-2 neutralizing antibodies in a PRNT₅₀ (a serum dilution causing 50% plaque reduction is considered positive; **Figure 1C**), which means that some of those pre-covid serum samples contained low concentrations of antibodies neutralizing SARS-CoV-2, likely from infections with enzootic coronaviruses such as those belonging to the species *Alphacoronavirus 1* and *Betacoronavirus 1* (1). SARS-CoV-2 antibody reactivity in pre-pandemic serum samples showed that investigations of cats for SARS-CoV-2-specific antibodies must be validated to avoid false-positive results (8). None of those cat-derived serum samples showed a positive test result in a more specific PRNT₉₀ (a

serum dilution causing 90% plaque reduction is considered positive; **Figure 1D**). The overall SARS-CoV-2 seroprevalence confirmed by PRNT₉₀ among the 547 serum samples collected during the pandemic was 7.3% (95% CI, 5.3-9.8), ranging from 4.6 (95% CI, 2.2-8.4) to 10.8 (95% CI, 6.4-16.7) in different states of Brazil (**Table 1**). That seroprevalence was consistent with similar data from Wuhan, China among cats from households of COVID-19 patients (3) and from cats living in areas severely affected by the Pandemic in northern Italy (4), substantiating robustness of our results.

Our study was limited by the lack of samples from Northern Brazil, from which high COVID-19 mortality was (6). It should also be noted that since we used serum samples from routine diagnostics, it is possible that unspecific antibody responses are more frequent in our sample than in clinically healthy cats.

In summary, our results indicated high SARS-CoV-2 seroprevalence in late 2020 in cats from six Brazilian states across the southern, southeastern, and northeastern regions. Spillover transmission from mink to humans followed by limited human-to-human transmission has been reported (9). Frequent human-to-cat transmission of SARS-CoV-2 may lead to the emergence of mutations in cats that may be less efficiently neutralized by infection-or vaccination-induced immune responses upon spillover to humans. Genetic characterizations of SARS-CoV-2 strains from cats and humans in a One Health framework to monitor the emergence of potential mutations of concern may allow early detection of cat-associated SARS-CoV-2 variants and potential vaccination of animals to prevent spillover infections of humans (10).

First author biographical sketch

Dr. Oliveira-Filho is a virologist at the Institute of Virology, Charité Universitätsmedizin Berlin. His research interests include the epidemiology and evolution of viruses from animal reservoirs.

Figure 1. Sampling sites and SARS-CoV-2 reactivity. SARS-CoV-2 seroprevalence in Brazil (A). cPass inhibition rate among pandemic and pre-pandemic cats. The 30% inhibition cut-off above which a human serum sample is considered positive is given for comparison (B). Comparison of cPass inhibition rate and reciprocal PRNT₅₀ endpoint titers (C). Reciprocal SARS-CoV-2 PRNT₉₀ endpoint titers among pandemic and pre-pandemic sera (D).

Table 1. SARS-CoV-2 seroprevalence in cats from different states in Brazil**References**

1. Jo WK, de Oliveira-Filho EF, Rasche A, Greenwood AD, Osterrieder K, Drexler JF. Potential zoonotic sources of SARS-CoV-2 infections. *Transbound Emerg Dis*. 2020 Oct 9.
2. Decaro N, Balboni A, Bertolotti L, Martino PA, Mazzei M, Mira F, et al. SARS-CoV-2 Infection in Dogs and Cats: Facts and Speculations. *Front Vet Sci*. 2021;8:619207.
3. Zhang Q, Zhang H, Gao J, Huang K, Yang Y, Hui X, et al. A serological survey of SARS-CoV-2 in cat in Wuhan. *Emerg Microbes Infect*. 2020 Dec;9(1):2013-9.
4. Patterson EI, Elia G, Grassi A, Giordano A, Desario C, Medardo M, et al. Evidence of exposure to SARS-CoV-2 in cats and dogs from households in Italy. *Nat Commun*. 2020 Dec 4;11(1):6231.
5. Hoffmann M, Zhang L, Kruger N, Graichen L, Kleine-Weber H, Hofmann-Winkler H, et al. SARS-CoV-2 mutations acquired in mink reduce antibody-mediated neutralization. *Cell Rep*. 2021 Apr 20;35(3):109017.
6. Faria NR, Mellan TA, Whittaker C, Claro IM, Candido DDS, Mishra S, et al. Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science*. 2021 May 21;372(6544):815-21.
7. Garcia-Beltran WF, Lam EC, St Denis K, Nitido AD, Garcia ZH, Hauser BM, et al. Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity. *Cell*. 2021 Apr 29;184(9):2372-83 e9.
8. Yadouleton A, Sander AL, Moreira-Soto A, Tchibozo C, Hounkanrin G, Badou Y, et al. Limited Specificity of Serologic Tests for SARS-CoV-2 Antibody Detection, Benin. *Emerg Infect Dis*. 2021 Jan;27(1).
9. Oude Munnink BB, Sikkema RS, Nieuwenhuijse DF, Molenaar RJ, Munger E, Molenkamp R, et al. Transmission of SARS-CoV-2 on mink farms between humans and mink and back to humans. *Science*. 2021 Jan 8;371(6525):172-7.
10. Chavda VP, Feehan J, Apostolopoulos V. A Veterinary Vaccine for SARS-CoV-2: The First COVID-19 Vaccine for Animals. *Vaccines (Basel)*. 2021 Jun 10;9(6).

Table 1. SARS-CoV-2 seroprevalence in cats from different states in Brazil

State	No. of Samples	Seroprevalence % (95% CI)	Sampling period (2020)
Bahia	216	4.6 (2.2 – 8.4)	July-November
Minas Gerais	40	5.0 (0.6 – 16.9)	November
Pernambuco	23	8.7 (1.1 – 28.0)	September-November
Paraná	20	10.0 (1.2 – 31.7)	November
Rio de Janeiro	33	9.1 (1.9 – 24.3)	November
Rio Grande do Sul	57	7.0 (1.9 – 17.0)	November
Sao Paulo	158	10.8 (6.4 – 16.7)	November
Total	547	7.3 (5.3 – 9.8)	July-November

