



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Emily Thalia Teixeira da Silva

**A SALIVA COMO MATERIAL BIOLÓGICO NO
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica)

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rejane Maria Tommasini Grotto

Coorientadora: Dr.^a Fabiana Barcelos Furtado

**Botucatu
2023**

Emily Thalia Teixeira da Silva

A SALIVA COMO MATERIAL BIOLÓGICO NO
DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestra em
Pesquisa e Desenvolvimento
(Biotecnologia Médica).

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rejane Maria Tommasini Grotto

Coorientadora: Dr.^a Fabiana Barcelos Furtado

Botucatu

2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Silva, Emily Thalia Teixeira da.

A saliva como material biológico no diagnóstico de
SARS-CoV-2 / Emily Thalia Teixeira da Silva. - Botucatu, 2024

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Rejane Maria Tommasini Grotto
Coorientador: Fabiana Barcelos Furtado
Capes: 20804008

1. COVID-19 (Doença). 2. Diagnóstico. 3. Saliva. 4. Reação
em cadeia da polimerase em tempo real.

Palavras-chave: Covid-19; *Cycle threshold*; Diagnóstico;
Saliva; *Swab*.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE EMILY THALIA TEIXEIRA DA SILVA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PESQUISA E DESENVOLVIMENTO (BIOTECNOLOGIA MÉDICA), DA FACULDADE DE MEDICINA - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 10 dias do mês de janeiro do ano de 2024, às 14:30 horas, no(a) Mini Auditório "Prof. Emérito Paulo Eduardo de Abreu Machado" - Laboratório de Biotecnologia Aplicada - HC/FM/Botucatu - Unesp, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de EMILY THALIA TEIXEIRA DA SILVA, Intitulada **A saliva como material biológico no diagnóstico de SARS-CoV-2**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. REJANE MARIA TOMMASINI GROTTTO (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Depto. de Bioprocessos e Biotecnologia / FCA/Botucatu - Unesp, Prof. Dr. CARLOS MAGNO CASTELO BRANCO FORTALEZA (Participação Presencial) do(a) Depto. de Infectologia, Dermatologia, Diagnóstico por Imagem e Radioterapia / FM/Botucatu - Unesp, Profa. Dra. MARINA DE OLIVEIRA E SOUZA (Participação Presencial) do(a) Bauru/SP. Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. REJANE MARIA TOMMASINI GROTTTO

Rejane Maria T. Grotto

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus que me permitiu ter saúde e sabedoria para que eu chegasse até aqui.

Agradeço aos meus pais e minha família pelo apoio inefável que depuseram todos estes anos em meus sonhos e torceram sempre em todas as fases da minha vida acadêmica e profissional. Por serem um dos pilares que me mantiveram firme em todo o período.

Agradeço à minha orientadora e coorientadora, Rejane Maria Tommasini Grotto e Fabiana Barcelos Furtado, pelos ensinamentos e paciência, à toda equipe da rotina da Biologia Molecular, do LBA e da pesquisa que diretamente ou indiretamente me auxiliaram nos estágios de construção desse trabalho e torceram por mim.

Agradeço às Professoras Doutoras Rejane Maria Tommasini Grotto e Maria Cristina Pereira Lima por terem outorgado o fomento deste trabalho via FAPESP através dos processos 2019/04609-3 e 2017/07711-0, grandes responsáveis pela conclusão e sucesso deste trabalho.

Foi difícil chegar até aqui, mas cada esforço e elo feito por este trabalho é de suma importância para minha vida pessoal e profissional.

RESUMO

O SARS-CoV-2 se tornar um problema de saúde pública global, ficou estabelecido mundialmente que o padrão-ouro para diagnóstico do novo coronavírus seria a Reação em Cadeia Polimerase (PCR) de amostras de swab do trato respiratório superior (TRS). Em meados de 2021, o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HC-FMB) implantou um método de monitoramento utilizando amostra de saliva para o diagnóstico de COVID-19, denominado “*Pool* de Saliva”. Trata-se de um método de triagem para assintomáticos, na qual amostras de salivas são agrupadas e passam por processo de detecção de genes virais de SARS-CoV-2. O método mostrou-se útil durante a pandemia da COVID-19 e devido a várias vantagens com relação a coleta por swab, o objetivo deste trabalho foi determinar a viabilidade e confiabilidade da substituição de swab por saliva para a detecção de SARS-CoV-2 em sintomáticos por PCR em tempo real, objetivando a implementação de novo método de coleta para o diagnóstico de COVID-19 no HC-FMB. Para o processo de validação, foi realizado a correlação de Spearman para a verificação de equivalência quantitativa entre a coleta de saliva e de swab. A concordância entre os métodos também foi avaliada utilizando o teste de Bland-Altman, verificando os *cycle thresholds* (CT). Adicionalmente, foi aplicado o teste de Wilcoxon para comparação das medianas de CT entre swab e saliva e teste de Dunn’s na avaliação da interferência da matriz amostral. Teste de Qui-quadrado foi aplicado com o propósito de avaliar a associação entre parâmetros vacinais versus CTs obtidos para saliva e testes de limite de detecção para os dois métodos de coleta também foram realizados. Os resultados revelaram que, para fins diagnósticos na detecção de SARS-CoV-2, as coletas por saliva e swab apresentaram alta concordância qualitativa de resultados (96,96%), no entanto, em relação a carga viral (avaliação quantitativa), estes métodos apresentam fraca concordância. Em contrapartida, a avaliação da interferência da matriz amostral mostrou que a saliva apresenta menor interferência no diagnóstico em relação ao swab. Adicionalmente, o teste dos limites de detecção mostrou equivalência quanto a sensibilidade para os dois métodos de coleta. O estudo também mostrou ainda que o indivíduo vacinado não tem a detecção viral

prejudicada em um diagnóstico de COVID-19 por nenhum dos dois métodos avaliados. Além disso, a eficácia da vacina, no que diz respeito ao controle da carga viral, não tem relação com as estratégias de ação de cada imunizante. Finalmente, a saliva em comparação ao swab se mostrou menos dispendiosa financeiramente exigindo menor utilização de materiais plásticos, o que a torna mais sustentável. Contudo a utilização da saliva mostrou-se em potencial na substituição do método de coleta por swab, tanto pela equivalência de resultados, quanto em relação a custos e sustentabilidade.

Palavras-chave: saliva; swab; COVID-19; diagnóstico; *cycle threshold*; SARS-CoV-2.

ABSTRACT

After SARS-CoV-2 became a global public health concern, it was established that the gold standard for diagnosing the new coronavirus would be through Polymerase Chain Reaction (PCR) from upper respiratory tract swab samples. In mid-2021, the Hospital das Clínicas of the Botucatu Medical School (HC-FMB) implemented a monitoring method using saliva samples for the diagnosis of COVID-19, called "Saliva Pooling." The saliva pool is a screening method for asymptomatic individuals, where saliva samples are grouped and undergo a process to detect viral genes of SARS-CoV-2. This monitoring method was shown to be efficient during the COVID-19 pandemic, and due to various advantages over swab collection, the objective of this work was to assess the feasibility and reliability of replacing swab collection with saliva for the detection of SARS-CoV-2 in individual symptomatic saliva samples by real-time PCR. The goal was to enable the implementation of a new collection method for the diagnosis of COVID-19 at HC-FMB. For the validation process, Spearman's correlation was used to verify quantitative equivalence between saliva and swab collection. Concordance between the methods was also assessed using the Bland-Altman test, examining the cycle thresholds (CT). Additionally, the Wilcoxon test was applied to compare CT medians between the swab and saliva, and Dunn's test was used to evaluate the interference of the sample matrix. The Chi-square test was applied to assess the association between vaccine parameters versus CTs obtained for saliva. Detection limit tests for both collection methods were also performed. This study showed that, for diagnostic purposes in detecting SARS-CoV-2, saliva and swab collections exhibit high qualitative concordance of results (96.96%). However, in terms of the expression of viral load, these methods show low concordance. On the other hand, the assessment of the interference of the sample matrix showed that saliva has less interference in diagnosis compared to the swab. Furthermore, the detection limit test demonstrated equivalence in sensitivity for both collection methods. Furthermore, the study revealed that the vaccinated individuals do not have impaired viral detection in a diagnosis of COVID-19 using either of the methods evaluated. Moreover, the efficacy of the vaccine, with regard to controlling viral load, is not

related to the action strategies of each vaccine. Finally, compared to the swab, saliva collection incurs lower financial costs and requires less use of plastic materials, making it more sustainable. Consequently, saliva collection has the potential to replace the swab collection method, both in terms of equivalence of the results and in cost-effectiveness, as well as sustainability.

Keywords: saliva; swab; COVID-19; diagnosis; cycle threshold; SARS-CoV-2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Avaliação de concordância entre métodos com base quantitativa (CTs).....	22
Figura 2. Gráfico boxplot para CT de saliva e CT de swab	22
Figura 3. Mediana dos valores de CT	25
Figura 4. Fluxograma das amostras para diagnóstico de SARS-CoV-2	29
Figura 5. Reagentes Allplex™ SARS-CoV-2 Assay	40
Figura 6. Perfil térmico.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação de concordância entre métodos com base qualitativa	21
Tabela 2. Relação entre dados de vacinação categorizados e carga viral das amostras de saliva expressas em intervalos de CTs.	24
Tabela 3. Limite de Detecção (LoD) para amostras de saliva e NPS	26
Tabela 4. Comparação de custos entre exames para detecção de SARS-CoV-2 para coletas realizadas por saliva e swab.....	28
Tabela 5. Volume de reagentes para Extração de RNA.	33
Tabela 6. Ensaio RT-qPCR para uma amostra	34
Tabela 7. Definição do Target Name	35

LISTA DE ABREVIATURAS

CT	Cycle threshold
EPI	Equipamento de proteção individual
PCR	Polymerase Chain Reaction
HC-FMB	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu
RT-qPCR	Reverse transcription quantitative real-time PCR
NPS	Swab Nasopharyngeal
ddPCR	PCR digital em gotas
LoD	Limite de detecção
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
LBA	Laboratório de Biotecnologia Aplicada
COVID-19	Corona Virus Disease 2019

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO	13
2 OBJETIVOS.....	16
3 MATERIAL E MÉTODO	17
3.1 Cycle threshold versus concordância entre os métodos e status vacinal	17
3.2 Verificação a interferência da matriz biológica na detecção de SARS-CoV-2	18
3.3 Identificação do Limite de Detecção (LoD)	19
3.4 Levantamento de custos	19
3.5 Análises estatísticas	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 Comparação entre dados de saliva e swab nasofaríngeo entre amostras pareadas	21
4.2 Cycle threshold versus status vacinal	23
4.3 Verificação da interferência da matriz amostral na detecção de SARS-CoV-2	24
4.4 Identificação do Limite de Detecção (LoD)	26
4.5 Análise de comparação de custos: Swab versus Saliva	28
5 CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	33
APÊNDICES	38
APÊNDICE 1: Detalhamento das metodologias utilizadas no estudo	38
APÊNDICE 2: Procedimento Operacional Padrão: NOVO PROTOCOLO DIAGNÓSTICA USANDO A SALIVA COMO MATERIAL BIOLÓGICO.....	44

1 INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

Após o SARS-CoV-2 se tornar problema de saúde pública global, causando a pandemia vista nos últimos tempos, os estudos se intensificaram para definir o exame diagnóstico adequado (Böger et al., 2021). Ficou estabelecido e comprovado, através de pesquisas, que o padrão-ouro para diagnóstico do novo coronavírus seria por meio da Reação em Cadeia Polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) (Bruce et al., 2020; Taleghani & Taghipour, 2021; Yüce et al., 2021), técnica capaz de identificar a presença de genes específicos em quantidade baixas na amostra, e o material biológico validado inicialmente para este exame foi o lavado brônquico e, posteriormente, amostras de swab do trato respiratório superior (narinas e faringe) (Khalaf et al., 2020; Machado et al., 2021; Ward et al., 2020).

No Brasil, no início da pandemia, apenas algumas instituições ficaram responsáveis pela realização do diagnóstico e liberação do laudo. Logo, pessoas assintomáticas normalmente não faziam a coleta de amostra por swab, e mesmo as que faziam, transmitiam até terem o laudo, que demorava vários dias para ser liberado devido à alta demanda por exames. A disseminação do SARS-CoV-2, de maneira abrupta e sem precedentes (Cherif et al., 2020), impôs desafios na fabricação dos suprimentos necessários à realização dos testes diagnósticos, devido à alta demanda, o que resultou numa escassez global de materiais, afetando a testagem em larga escala (Pratelli et al., 2021; Sri Santosh et al., 2020; Yokota et al., 2021).

Perante estes acontecimentos, em meados de 2021, o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HCFMB) implantou um método de monitoramento específico e de fácil coleta via amostra de saliva para o diagnóstico da COVID-19, denominado “Pool de Saliva”, registrado na Agência Unesp de Inovação (AUIN) como inovação social (20AUIN047).

O *pool* de saliva é um método de triagem para assintomáticos, geralmente aplicado em ambiente laboral, para que seja feito o monitoramento dos profissionais que ali desempenham suas atividades (Rao et al., 2021).

O próprio indivíduo coleta sua saliva em um microtubo, e esta amostra é agrupada com até outras 14 (*pool*) em um outro tubo, que passará por processo de extração do material genético e posterior PCR, que no caso de positivo para os genes do SARS-CoV-2, é processado de maneira individual para a identificação da amostra positiva. Logo, se o *pool* for negativo, significa que todas as amostras ali presentes são negativas para SARS-CoV-2 (Ota et al., 2021). Estudos como o de Cherif et al.

(2020) e Yip et al. (2020) ressaltaram que conforme o número de positivos são menos frequentes, pode-se aumentar o número de amostras no *pool* de saliva, sendo o inverso também aplicável no intuito de se alcançar maior acurácia de diagnóstico pelo método.

Além das análises por *pool*, pesquisas apontam que o teste por meio da saliva apresenta vantagens: a amostra é auto-coletada de forma rápida e com orientações simples; não é um teste invasivo e portanto não causa desconforto e/ou sangramento; não requer contato entre profissional da saúde e paciente, minimizando riscos para estes profissionais; é viável para monitoramento em larga escala por ser mais econômico pois reduz o número de equipamentos de proteção individual (EPIs) dos profissionais de saúde necessários e, os insumos necessários para a coleta, que são menos dispendiosos financeiramente (Al-Hail et al., 2021), sendo os custos do diagnóstico reduzidos de cinco a dez vezes (Alkhateeb et al., 2021).

Com relação à sensibilidade e a aplicação do teste em sintomáticos ou assintomáticos, não há consenso na literatura científica especializada quando se coleta entre swab e saliva. Quando a amostra de saliva individual tem seu CT comparado ao da amostra em *pool*, a concordância é de, em média, 70 a 80%, visto que há fatores interferentes como diluição da amostra, armazenamento e tempo de processamento, que levam à diminuição da sensibilidade (Vander Schaaf et al., 2021). Já quando a amostra de saliva é comparada à amostra de swab nasofaríngeo, alguns pesquisadores mostraram que essa concordância pode alcançar 80 a 99% (Migueres et al., 2021).

Embora alguns estudos tenham comprovado forte grau de concordância entre saliva e swab, outros apontam para diferentes conclusões: Nasiri & Dimitrova (2021) e Roque et al. (2021) afirmaram que o teste por saliva tem resultado equivalente ao do *Swab Nasopharyngeal* (NPS), mas ressaltam a necessidade de mais pesquisas para efetivar a escolha da amostra. Estudo de Pasomsub et al. (2021) concluiu que a saliva se mostrou mais sensível em pacientes sintomáticos, desta forma e nestas condições, a saliva pode ser equivalente ao swab nasofaríngeo em âmbito diagnóstico. Por sua vez, as pesquisas de Herrera et al. (2021) e Teo et al. (2021) mostraram que a saliva pode ser superior ao método de coleta por swab quando comparados os valores CT. Por fim, há ainda pesquisas como as de Tutuncu et al. (2021) e Girón-Pérez et al. (2021), que afirmaram que a saliva é promissora no

monitoramento de pessoas assintomáticas, concluindo que o swab apresenta melhor desempenho diagnóstico sobre a saliva.

Diante de dados divergentes sobre sensibilidade e especificidade da saliva, são necessárias pesquisas científicas que esclareçam melhor estes e outros pontos, principalmente quando a confiabilidade da auto-coleta é colocada em dúvida, podendo afetar os resultados do diagnóstico (Allicock et al., 2022; Sogbesan et al., 2022). A implementação de um método de diagnóstico baseado somente na coleta de saliva em casos de sintomáticos e entre pacientes graves ou com sintomas leves é cada vez mais desejada, pelo fato de apresentar inúmeras vantagens como as aqui apresentadas, podendo ser aplicado não somente para rastreio, como tem sido atualmente. Diante disto, estes resultados vêm para contribuir com mais dados que colaborem para tornar a coleta da amostra de saliva, seguida por análise em PCR em tempo real, padrão ouro para o diagnóstico da COVID-19 no HCFMB.

2 OBJETIVOS

Determinar a viabilidade e confiabilidade da utilização da saliva como material biológico para a detecção de SARS-CoV-2 em amostras obtidas de sintomáticos, por meio da técnica PCR em tempo real, precedida de transcrição reversa.

2.1. Objetivos Específicos

- Implementar um novo método de coleta para o diagnóstico de COVID-19 no HC-FMB;
- Determinar se houve economia utilizando este novo protocolo;
- Comparar os CT da saliva com *status* vacinal;
- Determinar a interferência da matriz biológica na detecção de SARS-CoV-2;
- Identificar os Limites de Detecção (LoD).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Cycle threshold versus concordância entre os métodos e status vacinal*

A execução desta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa da instituição (Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB; CAAE: 49984321.9.0000.5411). Uma análise retrospectiva foi feita a partir de dados do laboratório de Biotecnologia Aplicada do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HC-FMB) de janeiro de 2021 a janeiro de 2022. Foram avaliados dois tipos de amostras: amostras de saliva obtidas no programa de monitoramento de pacientes e funcionários do hospital e amostras de swab de Rayon naso-orofaríngeo dos mesmos pacientes, coletadas até 24 horas após a coleta de saliva, a fim de confirmar a positividade da amostra para SARS-CoV-2 já detectada na saliva. Para esses dados, foram coletadas as informações de CT de um total de 99 amostras, com a finalidade de analisar a porcentagem de concordância entre positivos para amostras de swab e de saliva.

Para obter os resultados dos CTs, as amostras foram submetidas à extração do RNA viral, que foi realizada de forma automatizada (Extract 96 Locus), utilizando uma metodologia "*In house*" por *bead* magnética baseada em imobilização reversível em fase sólida (*Solid Phase Reversible Immobilization*, SPRI), seguida de reação em cadeia de Polimerase em tempo real precedida de transcrição reversa (RT-qPCR), usando o kit de diagnóstico RT-qPCR Allplex™ SARS-CoV-2 Assay, seguindo as especificações do fabricante. A reação foi realizada no equipamento CFX96 *Touch Real-Time PCR Detection System* (BioRad, USA), usando as configurações padrões recomendadas para obtenção dos valores de CT, sendo consideradas amostras positivas aquelas com curvas de amplificação com CTs abaixo ou igual a 40 para pelo menos dois genes dos três analisados (genes E, N e RdRp). O gene considerado para a determinação de CT foi o gene E e a amplificação do controle endógeno foi considerada obrigatória para validação do diagnóstico.

Adicionalmente, um outro conjunto amostral de 159 para coleta feita por saliva também foi organizado a partir da análise retrospectiva feita de dados do laboratório de Biotecnologia Aplicada do HC-FMB, no entanto, análises pareadas entre os valores de CT de swab e saliva não foram feitas, mas sim avaliação de correlação de intervalos de CTs com o status vacinal obtido dos sistemas de vigilância epidemiológica do município (E-sus, SIVEP-Gripe e Vacivida). Nesta avaliação, foram

considerados indivíduos que estavam com até seis dias de sintomas, sendo este número de dias definido pela avaliação da média de CTs em cada dia individualmente e na qual não foram constatadas diferenças estatísticas entre os CTs destes grupos. Os CTs foram categorizados em valores abaixo de 20, entre 20 e 30 e acima de 30 e para análise vacinal, foram considerados indivíduos não vacinados ou vacinados com pelo menos 3 doses de vacinas, das quais foram separados em grupos que receberam o mesmo tipo de tecnologia de vacina (vacina de vetor viral; vírus quimicamente inativado; vacina de RNA) nas 3 doses ou pelo menos dois tipos de tecnologias diferentes dentre as 3 doses.

3.2 Verificação a interferência da matriz biológica na detecção de SARS-CoV-2

A interferência causada pela matriz biológica na detecção qualitativa de SARS-CoV-2 por RT-qPCR utilizando a metodologia adotada na rotina diagnóstica no laboratório de Biologia Molecular do LBA/HCFMB no período de janeiro de 2021 a janeiro de 2022 foi analisada como descrito a seguir. Inicialmente, uma alíquota viral da variante P1 de SARS-CoV-2 foi expandida em cultura celular a partir de uma amostra clínica. A escolha desta variante se deu em função de sua maior predominância durante o período amostral da pesquisa. Foi então realizada diluição seriada em fator 1:10, até diluição 10^{-6} , utilizando o meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) a 4°C como diluente. Em seguida, as amostras correspondentes a cada ponto de diluição foram extraídas de forma automatizada (Extracta 96 Locus), utilizando metodologia "In house" por bead magnética baseada em imobilização reversível em fase sólida. A partir dos valores de CT obtidos por RT-qPCR, optou-se por selecionar o ponto de diluição 10^{-4} , que apresentou CT de aproximadamente 24, valor adequado para a continuidade do experimento.

Em paralelo, foram preparados dois *pools* de 30 amostras clínicas de saliva ou NPS negativas para SARS-CoV-2, utilizando 500 µl de cada amostra, totalizando 15 ml de solução. Os *pools* foram então homogeneizados por vórtex e centrifugados brevemente. Para verificar se o procedimento não havia sido passível de contaminação, foram realizadas novamente as etapas de extração de RNA e RT-qPCR. Confirmada a não detecção de SARS-CoV-2, em 4750µl de cada *pool* de amostras negativas de saliva (Grupo 1) ou NPS (Grupo 2) foram adicionados 250 µL de RNA viral diluído a 10^{-4} . A placa para extração de RNA e posterior RT-qPCR foi preparada de forma a conter 24 replicatas de cada grupo, 8 replicatas de cada um dos

pools somente com amostras negativas (controle negativo) e 8 replicatas de RNA viral diluído a 10^{-4} em tampão Tris-EDTA de baixa concentração (grupo controle).

3.3 Identificação do Limite de Detecção de 95% (LoD)

O teste de limite de detecção determina a concentração mínima detectável de SARS-CoV-2 na qual aproximadamente 95% de todas as replicatas são positivas (positivos verdadeiros).

Para este teste, foram selecionadas 30 amostras retrospectivas de saliva e NPS, mantidas armazenadas a -80°C , positivas para SARS-CoV-2, que apresentaram valores de CTs abaixo de 22 à época do diagnóstico molecular. A partir de 50 μl de cada amostra foram formados dois *pools*, um com amostras positivas de saliva e outro de NPS. Uma nova extração de RNA foi realizada em triplicata, seguida de RT-qPCR para verificar o valor de CT após descongelamento.

Definidos os valores de CT para cada tipo de amostra, foram preparadas diluições seriadas em fator 1:10, até 10^{-7} , para uma verificação preliminar do ponto de diluição em que havia diminuição na sensibilidade de detecção de SARS-CoV-2. Em cada corrida foram adicionadas ainda amostras de uma diluição seriada em fator 1:10 anteriormente utilizada em nosso laboratório para quantificação de número de cópias virais de SARS-CoV-2 por PCR digital em gotas (ddPCR).

Para a definição do LoD, foi realizada uma diluição seriada adicional em fator 1:2 a partir do último ponto com 100% das replicatas positivas identificado na corrida preliminar. Para cada ponto de diluição foram utilizadas 20 replicatas.

3.4 Levantamento de custos

Para a comparação dos custos necessários para a realização de cada técnica, foram feitos levantamentos e cotações com relação aos gastos com EPIs da equipe de coleta, materiais necessários para a coleta, EPIs das equipes de recebimento e processamento, reagentes, consumíveis e mão-de-obra para a execução das etapas. Estes levantamentos foram feitos com base em informações disponibilizadas pela Prefeitura de Botucatu, pela Unidade Auxiliar da Faculdade de Medicina de Botucatu, Centro de Saúde Escola e pelo laboratório de Biologia Molecular do LBA, localizado no HC-FMB.

3.5 Análises estatísticas

Correlação de Spearman foi realizada na verificação de equivalência quantitativa entre a coleta por saliva e por swab. A concordância entre os métodos também foi avaliada utilizando o teste de Bland-Altman, verificando-se os CTs. Adicionalmente, foi aplicado o teste de Wilcoxon para comparação das medianas de CT entre swab e saliva e teste de Dunn's na avaliação da interferência da matriz amostral. Teste de Qui-quadrado foi aplicado com o intuito de avaliar a associação entre parâmetros vacinais versus CTs obtidos para saliva. As análises estatísticas foram realizadas no software Sigma Plot 11.0 e no software R 4.2.0 e os valores de p menores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Comparação entre dados de saliva e swab nasofaríngeo entre amostras pareadas

Um total de 99 resultados de CT foram pareados para comparação de amostras de saliva e swab nasofaríngeo (NPS – *nasopharyngeal swab*), coletadas em um intervalo de no máximo 24 horas. A tabela 1 mostra que dentre as amostras pareadas, 3 foram positivas somente para saliva, sendo duas delas nos limites de detecção (CT=35) e uma não. Portanto a porcentagem de concordância qualitativa entre as coletas de swab e saliva foi de 96,96%, com somente um resultado não condizente, sendo compreensível que nos limites de detecção, que foi o observado para duas amostras, os resultados possam dar hora positivos, hora negativos, devido à baixa carga viral presente na amostra e às restrições da tecnologia relacionadas aos limites de detecção.

Tabela 1. Avaliação de concordância entre métodos com base qualitativa

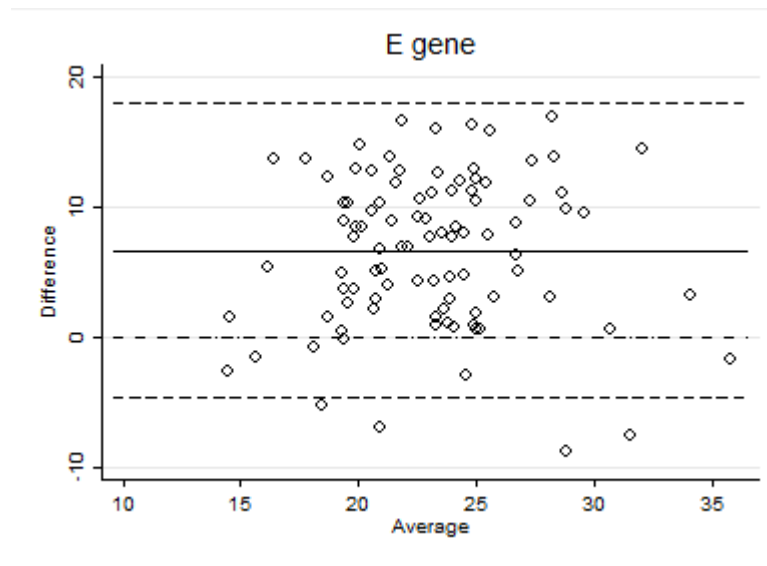
	Saliva+
Swab +	96
Swab -	3
n=99	

Fonte: O autor, 2023

O Teste de Correlação de Spearman entre os dados pareados destas 99 amostras foi aplicado, porém, falhou em demonstrar equivalência estatística entre os dois modos de coleta para o diagnóstico de SARS-CoV-2 por PCR em tempo real quando se considera o aspecto quantitativo (CT) ($p < 0,0621$ e coeficiente de correlação 0,188). Além disso, avaliou-se o CT da saliva e swab, utilizando o teste de Bland-Altman (Figura 1), o que indicou fraca concordância quantitativa entre os métodos de coleta (viés de 6,7 e índice de concordância de Lin de 0,16).

O estudo de Saluzzo et al. (2021), também encontrou concordância qualitativa semelhante entre os dois tipos de coleta (98%), porém, diferente dos nossos resultados, os dados quantitativos de CTs deste estudo mostraram correlação forte e significativa. Esta mesma faixa de concordância também foi observada nas pesquisas de Azzi et al., (2020) e Sagredo-Olivares et al., (2021). Outros estudos também apresentaram graus de equivalência, mas com diferentes resultados. (de Paula Eduardo et al., 2022; De Santi et al., 2021; Johnson et al., 2021; Pierri et al., 2022).

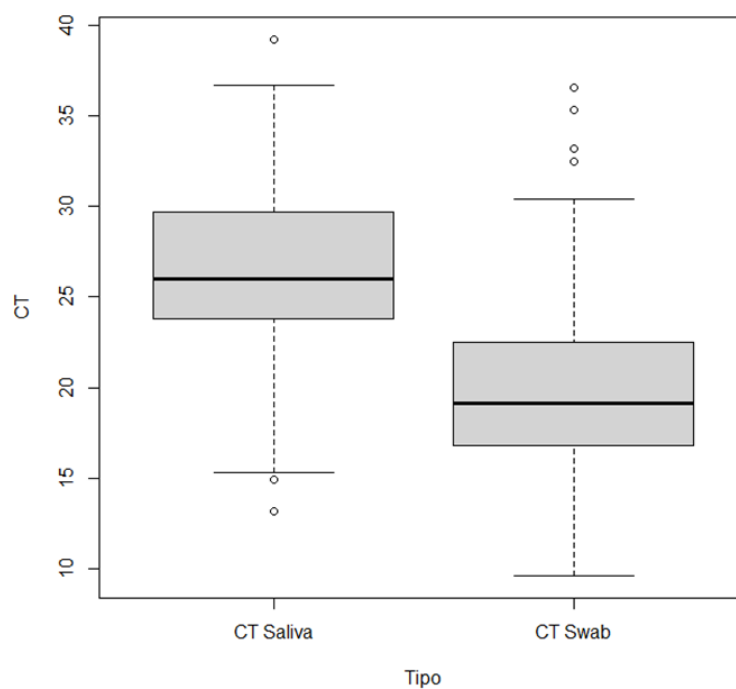
Figura 1. Avaliação de concordância entre métodos com base quantitativa (CTs)



Fonte: O autor, 2023.

O gráfico boxplot foi gerado a partir de um teste de comparação de médias, teste não paramétrico de Wilcoxon, para comparar as medianas e a distribuição dos valores de CTs obtidos para coleta por saliva e por swab, e está representado na Figura 2.

Figura 2. Gráfico boxplot para CT de saliva e CT de swab.



Fonte: O autor, 2023

Quando avaliado o gene E, os valores de CT foram significativamente diferentes ($p < 0,001$) entre amostras provenientes de swab e saliva, com medianas de 19,75 e 26,39 respectivamente, observando-se uma variação de aproximadamente 7 CTs. Uddin et al. (2021) também encontraram um resultado equivalente ao aqui observado, onde a variação de CT foi de aproximadamente 8 unidades a mais para a saliva em relação ao swab. Esse dado converge ainda com o de Hiroi et al. (2021), que constataram que se o valor de CT de NPS for menor ou igual a 26, o resultado da saliva será 100% positivo (considerando 40 como limiar de ciclo máximo), mas se o valor de CT para NPS for maior que 26, a chance de a amostra de saliva ser positiva para SARS-CoV-2 cai para 48% ou menos que isso, à medida que os ciclos forem aumentando. Adicionalmente, Kerimov et al. (2021), encontraram medianas de 22,6 para NPS e 26,7 para saliva, assim como Escobar et al. (2021), que encontraram medianas de 22,84 para swab e 29,26 para CTs de saliva, sendo todos estes trabalhos concordantes com as nossas observações.

Neste mesmo sentido, foi observado que o primeiro quartil de dados de CT para a saliva começa em aproximadamente 15, enquanto no exame de NPS, o 1º quartil se inicia em aproximadamente 10, mostrando um deslocamento nos CTs da saliva, sendo detectados sempre mais tardiamente com relação aos CTs do swab. Esse deslocamento também foi observado por Kerimov et al. (2021), porém com menor amplitude, com o primeiro quartil iniciando em 21,2 para o swab e 22,8 para a saliva. Considerando que os CTs são inversamente proporcionais a carga viral (Aranha et al., 2021; Gentilini et al., 2021), observa-se uma maior carga viral nas amostras provenientes de swab, mostrando este método ser mais eficaz na obtenção de material genético viral para a detecção por PCR em tempo real.

4.2 Cycle threshold versus status vacinal

Para a avaliação dos parâmetros vacinais, a análise de Qui-quadrado foi realizada e os resultados estão expressos na tabela 2. De acordo com os resultados, tomar ou não a vacina não influencia na carga viral do indivíduo infectado posteriormente por SARS-CoV-2. Além disso, tomar doses iguais, ou seja, vacinas baseadas na mesma tecnologia de fabricação, ou vacinas diferentes, também não afetou a carga viral.

Tabela 2. Relação entre dados de vacinação categorizados e carga viral das amostras de saliva expressas em intervalos de CTs.

Status vacinal/CT	Abaixo de 20	Entre 20 e 30	Acima de 30
Nenhuma vacina	3	7	1
3 doses iguais	1	4	3
Pelo menos 2 doses diferentes	13	89	38

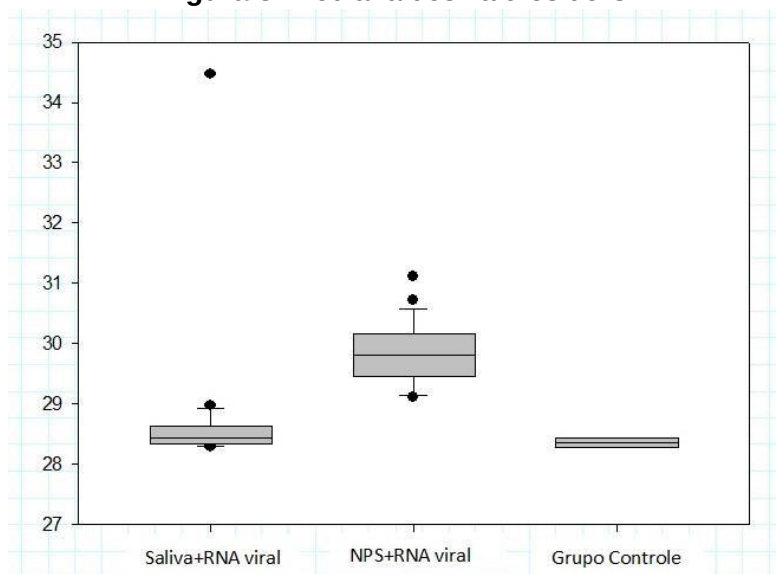
As características que definem a tabela de contingência não estão significativamente relacionadas ($P = 0,289$).

Fonte: O autor, 2023.

A pesquisa realizada por Azzi et al. (2022) mostrou que as quantidades de IgG e IgA, anticorpos neutralizantes presentes na saliva, aumentaram apenas após a segunda dose de vacina, mas ainda assim representava somente 18% da população do estudo. Adicionalmente, Selva et al. (2021) também verificaram a baixa presença de IgA salivar logo após a vacinação, sugerindo pouca relação entre imunidade oral influenciando na carga viral. Portanto, com base nos resultados encontrados e nestes estudos citados, a capacidade de detecção do SARS-CoV-2 via saliva parece ser pouco afetada pelo processo vacinal, não sendo este um problema que poderia levar ao aumento de falsos negativos a partir dos métodos de coleta em uma população vacinada, no entanto, existem estudos que contradizem os resultados aqui encontrados, tais como os de Bergwark et al., 2021 e Eyre et al., 2022, que identificaram uma menor infectividade dentre pessoas vacinadas com base em seus CTs, mostrando que investigações mais aprofundadas devem ser conduzidas à este respeito.

4.3 Verificação da interferência da matriz amostral na detecção de SARS-CoV-2

Na verificação da interferência da matriz amostral na detecção de SARS-CoV-2, a mediana dos valores de CT do Grupo 1 (pool negativo saliva + RNA viral) foi de 28,44 (28,28-34,46) e do Grupo 2 (pool negativo de NPS + RNA viral) foi de 29,82 (29,11-31,11), sendo os grupos 1 e 2 estatisticamente diferentes do grupo controle (28,35) (Figura 3) mostrando, portanto, que a amostra de saliva apresenta menor interferência no diagnóstico em relação aos seus constituintes do que os que compunham a amostra de swab visto que, a variância dos valores de CT foi menor do que os obtidos pelo swab.

Figura 3. Mediana dos valores de CT

Fonte: O autor, 2023.

O swab de rayon usado para coleta de NPS pode afetar potencialmente a detecção de material genético viral em alguns casos. O estudo de (Wyllie et al., 2020) mostrou que a inconsistência na amostragem do swab nasofaríngeo pode ser um dos possíveis problemas para resultados falsos negativos.

Uma outra preocupação ainda consiste na inibição da reação de PCR pelos materiais utilizados na coleta, sendo prejudiciais alguns materiais constituintes de alguns swabs, como alginato de cálcio ou madeira, e por isso são recomendados pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos e pela Organização Mundial da Saúde (OMS) o uso de swabs que sejam de fibras sintética com haste plástica (Garnett et al., 2020), como o swab de Rayon por exemplo, utilizado neste estudo. No entanto, pesquisas mostram que o swab de nylon apresenta um maior rendimento na coleta do genoma viral comparado ao swab de Rayon (Daley et al., 2006; Hernes et al., 2011), que evidencia interferência no aspecto quantitativo do exame, influenciado pelo material de coleta, o que pode ter afetado também os nossos resultados quando se faz uma comparação com a saliva (Figura 3). Portanto, é desejável que a coleta seja influenciada pelo mínimo de variantes possível, o que pode ser alcançado quando a coleta é feita via saliva.

4.4 Identificação do Limite de Detecção (LoD)

Para o ensaio de LoD, as replicatas foram consideradas positivas segundo os critérios estabelecidos pelo Protocolo Operacional Padrão (POP), do Laboratório de Biotecnologia Aplicada (LBA). A partir da RT-qPCR, verificou-se que o pool de amostras para saliva apresentou CT=17 e o pool para amostras de swab apresentou CT=18 para o gene E.

A estimativa do número de cópias de RNA de SARS-CoV-2 presentes nas amostras foi baseada na quantificação por ddPCR anteriormente realizada em nosso laboratório. O número de cópias de RNA e os valores de CT foram relacionados em uma equação da reta obtida a partir da construção de uma curva padrão, a qual foi utilizada neste estudo para estimar o número de cópias de RNA a partir do CT médio das replicatas positivas.

Os resultados iniciais mostraram que para as diluições até 10^{-5} , 100% (9/9) das replicatas dos pools de amostras de saliva e NPS foram positivas. Para a diluição 10^{-6} 22,2% das replicatas dos pools de saliva (2/9) e NPS (2/9) foram positivas.

Para a definição de LoD foi então realizada uma diluição seriada em fator 1:2 a partir da diluição 10^{-5} . Os resultados de uma nova corrida mostraram que para a diluição 10^{-5} , 100% e 95% das replicatas, respectivamente, dos pools de NPS e saliva foram positivas. A diluição em fator 1:2 mostrou positividade de 55% das replicatas tanto para o pool de saliva quanto para o pool de NPS. Portanto, o número mínimo de cópias de RNA de SARS-CoV-2 presentes quando pelo menos 95% das replicatas foram positivas (19/20) foi de 23,36 e de 18,53, respectivamente para saliva e NPS (Tabela 3).

Tabela 3. Limite de Detecção (LoD) para amostras de saliva e NPS

	Saliva		NPS ¹	
Positivos/Total	19/20	11/20	20/20	11/20
Concentração de RNA ²	23,36	8,23	18,53	11,00
CT Médio	36,26	37,88	36,62	37,43
Desvio Padrão (CT)	0,85	1,30	1,19	1,41

¹ Swab orofaríngeo; ²Concentração em cópias de RNA/reacção

Fonte: O autor, 2023.

De acordo com os resultados, para a saliva, a diluição de 5 pontos (10^{-5}) representou 100% de detecção com CT médio de 34,07 (representando 4,74 cópias de RNA viral/ml de reação), enquanto a diluição de 6 pontos (10^{-6}) apresentou limite

de detecção de 77.77% com CT médio de 38,36 (equivalendo à 0,30 cópias de RNA viral/ml de reação), desta maneira, a diluição adequada para continuidade do ensaio foi a de 5 pontos (10^{-5}). O mesmo foi observado para o swab, onde a diluição de 10^{-5} apresentou 100% de detecção, com CT médio de 35,35 (equivalente a 4,74 cópias de RNA viral/ml de reação) enquanto a diluição de 10^{-6} apresentou CT médio de 38,74 (equivalente a 0,30 cópias de RNA viral/ml de reação).

O próximo passo foi realizar uma diluição de fator 2 a partir do limite detectável no fator 10 (diluição de 10^{-5} para ambos os tipos de amostra) para determinar qual CT representa o limite de detecção de 95% para os dois tipos de coleta. Visto isso, a placa de PCR para determinar esse resultado contou com: 20 replicatas para amostras de saliva diluídas à 10^{-5} para fator 10, 20 replicatas para amostras de saliva diluídas à 1:2 para fator 2; 20 replicatas de amostras de swab diluídas à 10^{-5} para fator 10, 20 replicatas de amostras de swab diluídas à 1:2 para fator 2; 2 replicatas de cada diluição à fator 10 para curva padrão de PCR digital (10^{-2} a 10^{-6}) e 1 poço para controle negativo.

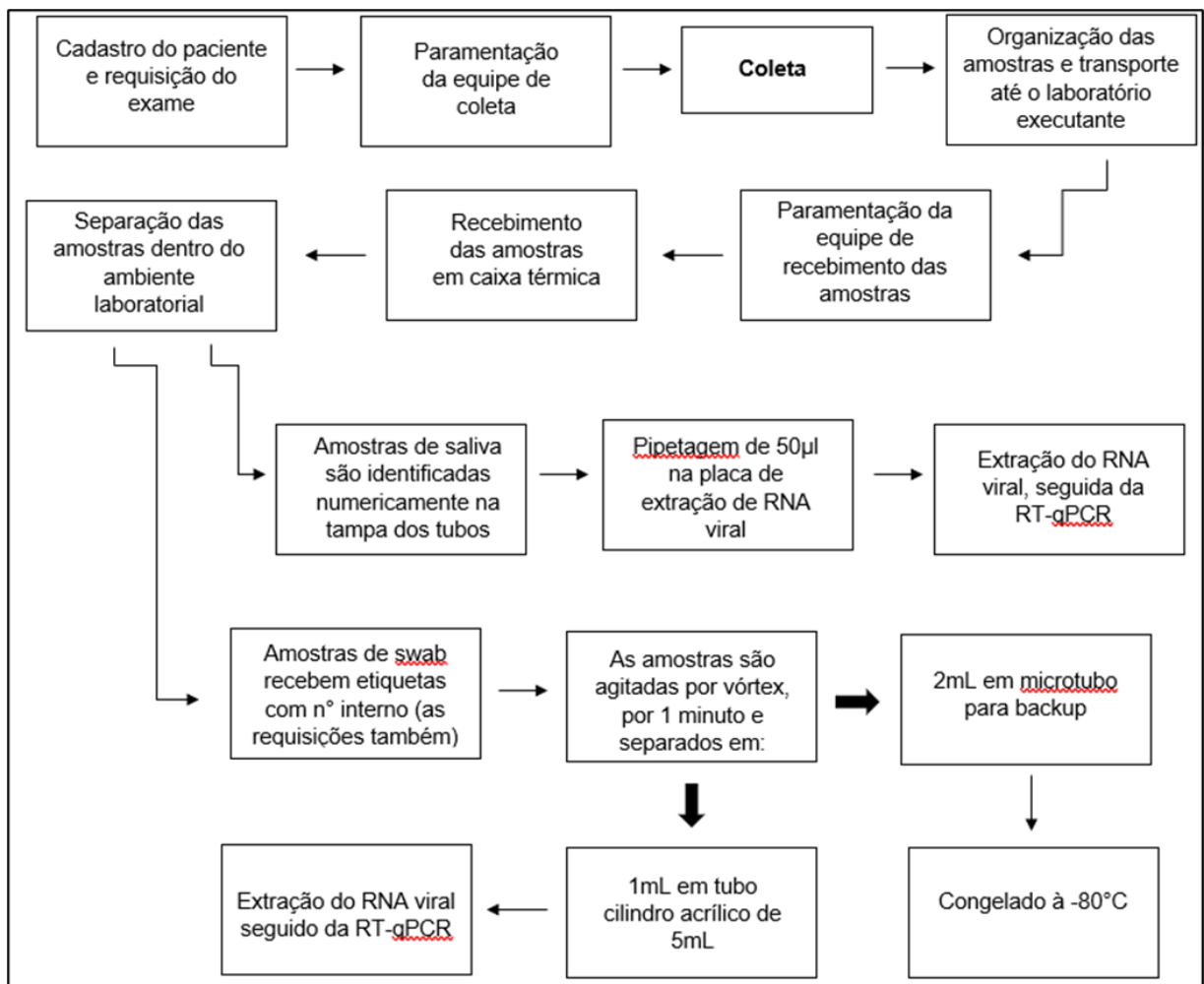
Obedecendo o protocolo criado pelo Laboratório de Biotecnologia Aplicada (LBA) na consideração de amostras positivas, os resultados mostraram que a diluição 1:2 para ambos os tipos de coleta apresentaram CTs acima do detectável pelo protocolo ou não foram detectados. Para a saliva, esse número representou 6 das 20 repetições, ou seja, apenas 14 foram consideradas detectadas de acordo com o protocolo (= 70% das reações); para o NPS, esse número representou 9 das 20 repetições, isto é, apenas 11 repetições foram consideradas detectadas (=55% das reações). Portanto, o Limite de Detecção de 95% das reações foi, para ambas as coletas, a diluição de 5 pontos no fator 10 (10^{-5}), embora, apresentem 100% de detecção neste ponto equivalendo à um CT médio de 34,07 para saliva e de 35,35 para swab ou ao valor de 4,74 cópias de RNA viral/ml de reação.

Apesar da diferença observada entre as medianas de valores de CT de amostras de saliva e NPS, o teste de limite de detecção mostrou equivalência quanto à sensibilidade, indicando que o diagnóstico qualitativo (presença/ausência) de SARS-CoV-2 não é prejudicado quando utilizada saliva em substituição ao swab orofaríngeo. Tais resultados foram também frequentemente observados na literatura, mostrando que a saliva possui grande potencial em substituição ao swab para o diagnóstico da COVID-19 (Bergevin et al., 2021; Salu et al., 2022a; Yokota, Hattori, et al., 2021).

4.5 Análise de comparação de custos: Swab versus Saliva

Neste estudo, foram feitas comparações de custos na execução de exames para diagnóstico da COVID-19 por PCR em tempo Real para coletas feitas por swab e saliva. Foi avaliado o valor gasto quanto ao uso de EPIs (touca, avental descartável, luvas e máscara N95) e outros materiais (pipetas pastêur, tubos cônicos, ponteiros para micropipetas, salina, plásticos), além de reagentes, através de dados disponibilizados pela Prefeitura de Botucatu, pela Unidade Auxiliar da Faculdade de Medicina de Botucatu, Centro de Saúde Escola e pelo laboratório de Biologia Molecular do LBA HC-FMB. Para a compreensão dos materiais e EPIs utilizados, é necessário conhecer o fluxo do laboratório para a realização dos exames (Figura 4).

Figura 4: Fluxograma das amostras para diagnóstico de SARS-CoV-2.



Fonte: O autor, 2023.

Ambas as amostras já devem chegar ao laboratório com as requisições e cadastro nos sistemas específicos. A coleta é feita sob responsabilidade de outros setores e os tubos já devem estar devidamente preparados com 3mL e 0,5mL de salina para swab e saliva, respectivamente.

Na tabela 4 contém os materiais utilizados nos exames de saliva e swab e valores gastos com recursos humanos, desde a coleta até a RT-qPCR.

Tabela 4. Comparação de custos aproximados entre exames para detecção de SARS-CoV-2 para coletas realizadas por saliva e swab.

Etapas de coleta (598 amostras/mês)^{&}		
Material/Recursos humanos	Saliva	Swab
Tubo cônico (unidade)	-	R\$496,34
Swab Rayon (unidade)	-	R\$1.094,34
Microtubo (unidade)	R\$238,00	-
Salina	R\$4,33	R\$26,01
Profissional técnico Enfermagem	-	R\$3.325,00x4 ^E =13.300
TOTAL	R\$242,33	R\$14.916,69
TOTAL/AMOSTRA	R\$0,40	R\$24,94
Etapas de separação e processamento (30 amostras /dia)*		
Material	Saliva	Swab
Ponteira volume 200 uL	R\$17,10	-
Pipeta Pasteur 3 mL	-	R\$4,20
Tubo cilíndrico 4ml	-	R\$1,80
Avental descartável manga longa (unidade)	R\$ 3,48	R\$ 3,48
Luva descartável nitrílica (par)	R\$ 0,24	R\$ 0,24
Máscara descartável N95 (unidade)	R\$ 0,96	R\$ 0,96
Gorro descartável (unidade)	R\$ 0,09	R\$ 0,09
TOTAL	R\$ 21,87	R\$ 10,77
TOTAL/AMOSTRA	R\$ 0,73	R\$ 0,36
Extração do RNA viral (mesmo procedimento para saliva e swab) 96 amostras		
Material	Custo	
Tira encapsulamento magnético	R\$ 50,00	
Placa Deep Well 2,2 mL extração de RNA viral Locus Extracta 96	R\$ 29,05	
Ponteira volume 1000 uL	R\$ 65,00	
Filme Selador para microplaca de PCR (Não óptico)	R\$ 7,80	
Beads magnéticas	R\$ 53,76	
Cloreto de sódio	R\$ 0,96	
Triton x - 100	R\$ 1,92	

Tiocianato de guanidina	R\$ 21,12	
Polietilenoglicol	R\$ 9,60	
TOTAL	R\$ 239,21	
TOTAL/AMOSTRA	R\$ 2,49	
RT-qPCR (mesmo procedimento para saliva e swab) 96 amostras		
Material	Custo	
Kit Allplex™ SARS-CoV-2 Assay	R\$ 2.655,74 [#]	
Ponteira volume 0,5 a 10 uL	R\$ 55,00	
placa de 96 poços para PCR em tempo real - poços de 100 uL	R\$ 19,90	
Adesivo óptico para PCR	R\$ 9,98	
Avental descartável manga longa (unidade)	R\$ 3,48	
Luva descartável nitrílica (par)	R\$ 0,24	
Máscara descartável N95 (unidade)	R\$ 0,96	
Gorro descartável (unidade)	R\$ 0,09	
TOTAL	R\$ 2.745,39	
TOTAL/AMOSTRA	R\$ 28,59	
Custos Totais		
Etapa	Saliva	Swab
Coleta	R\$0,40	R\$24,94
Separação e processamento	R\$ 0,73	R\$ 0,36
Extração do RNA viral	R\$ 2,49	R\$ 2,49
RT-qPCR	R\$ 28,59	R\$ 28,59
TOTAL/AMOSTRA	R\$32,21	R\$56,38

[&]Média mensal do ano de 2021 de amostras coletadas de swab pelo HC-FMB; [£]No ano de 2021, 4 técnicos de enfermagem foram contratados para atender as demandas de coleta de swab do HC-FMB; ^{*}média de amostras recebidas de swab por dia pelo LBA – Biologia Molecular no ano de 2021; [#]calculado com base na cotação média do dólar durante o ano de 2021.

Fonte: O autor, 2023.

A partir da contabilização dos custos, foi possível constatar que os gastos com a coleta por swab chegam a ser aproximadamente 75,15% mais elevados em comparação aos gastos contabilizados por coleta via saliva e o que mais impacta nestes valores são os custos com relação ao profissional que faz a coleta e com insumos não biodegradáveis como o próprio swab e tubos cônicos plásticos, o que envolve também a preocupação com o lixo gerado.

A preocupação em tornar testes diagnósticos mais acessíveis também foi abordada pelos pesquisadores Salu et al. (2022); Vogels et al. (2021), que ressaltam

resultados convergentes com os aqui apresentados, mostrando a saliva ser um método mais acessível e de menor custo para instituições executantes.

A busca pela aplicação de métodos sustentáveis em todo os âmbitos vem aumentando no ambiente hospitalar, devido à grande produção de lixo decorrente das atividades rotineiras e a dificuldade logística e financeira em descartá-los corretamente. Com isto, a análise de ônus financeiro aqui verificada mostra ainda que a coleta por saliva exige menor utilização de materiais plásticos, o que a torna mais sustentável comparada ao método de coleta por swab, favorecendo não somente o paciente com um método mais confortável, o profissional da saúde com um método mais seguro, a instituição executante com um método mais barato, mas também o planeta com um método mais sustentável.

5 CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que, para fins diagnósticos na detecção de SARS-CoV-2, em relação a expressão quantitativa da carga viral, os métodos de coleta por saliva e swab apresentaram fraca concordância, mas forte concordância qualitativa (96,96%). Em contrapartida, foi feita uma avaliação da interferência da matriz amostral, que mostrou que a saliva apresentou menor interferência no diagnóstico em relação ao swab. Adicionalmente, o teste de limite de detecção mostrou equivalência quanto à sensibilidade, indicando que o diagnóstico qualitativo (presença/ausência) de SARS-CoV-2 não é prejudicado quando utilizada saliva em substituição ao swab orofaríngeo.

O estudo mostrou ainda que o indivíduo vacinado não tem a detecção viral prejudicada em um diagnóstico de COVID-19 por nenhum dos dois métodos avaliados, não havendo riscos de falsos positivos como haveria de se supor, análise esta importante por ainda serem conflitantes na literatura informações sobre a infectividade oral em decorrência da COVID-19 pós-vacina. A eficácia da vacina, no que diz respeito ao controle da carga viral, não tem relação com as estratégias de ação de cada imunizante.

A saliva em comparação ao swab apresentou menos custos financeiros e exige menor utilização de materiais plásticos, o que a torna mais sustentável. Deste modo, uma vez que o diagnóstico da COVID-19 não depende diretamente da carga viral, mas sim de uma avaliação qualitativa de presença ou ausência de material genético do SARS-CoV-2, a coleta via saliva mostrou-se potencial em substituição ao método de coleta por swab.

O teste de diagnóstico utilizando saliva como material biológico foi implementado no HC-FMB para pacientes sintomáticos.

REFERÊNCIAS

- Al-Hail, H., Mirza, F., Al Hashemi, A., Ahmad, M. N., Iqbal, M., Tang, P., & Hasan, M. R. (2021). Evaluation of automated molecular tests for the detection of SARS-CoV-2 in pooled nasopharyngeal and saliva specimens. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 35(8). <https://doi.org/10.1002/jcla.23876>
- Alkhateeb, K. J., Cahill, M. N., Ross, A. S., Arnold, F. W., & Snyder, J. W. (2021). The reliability of saliva for the detection of SARS-CoV-2 in symptomatic and asymptomatic patients: Insights on the diagnostic performance and utility for COVID-19 screening. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 101(3). <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2021.115450>
- Allicock, O. M., Petrone, M. E., Yolda-Carr, D., Breban, M., Walsh, H., Watkins, A. E., Rothman, J. E., Farhadian, S. F., Grubaugh, N. D., & Wyllie, A. L. (2022). Evaluation of saliva self-collection devices for SARS-CoV-2 diagnostics. *BMC Infectious Diseases*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07285-7>
- Aranha, C., Patel, V., Bhor, V., & Gogoi, D. (2021). Cycle threshold values in RT-PCR to determine dynamics of SARS-CoV-2 viral load: An approach to reduce the isolation period for COVID-19 patients. *Journal of Medical Virology*, 93(12), 6794–6797. <https://doi.org/10.1002/jmv.27206>
- Azzi, L., Carcano, G., Gianfagna, F., Grossi, P., Gasperina, D. D., Genoni, A., Fasano, M., Sessa, F., Tettamanti, L., Carinci, F., Maurino, V., Rossi, A., Tagliabue, A., & Baj, A. (2020). Saliva is a reliable tool to detect SARS-CoV-2. *Journal of Infection*, 81(1), e45–e50. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.04.005>
- Baloch, S., Baloch, M. A., Zheng, T., & Pei, X. (2020). The coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic. In *Tohoku Journal of Experimental Medicine* (Vol. 250, Issue 4, pp. 271–278). Tohoku University Medical Press. <https://doi.org/10.1620/tjem.250.271>
- Böger, B., Fachi, M. M., Vilhena, R. O., Cobre, A. F., Tonin, F. S., & Pontarolo, R. (2021). Systematic review with meta-analysis of the accuracy of diagnostic tests for COVID-19. *American Journal of Infection Control*, 49(1), 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2020.07.011>
- Bruce, E. A., Huang, M. L., Perchetti, G. A., Tighe, S., Laaguiby, P., Hoffman, J. J., Gerrard, D. L., Nalla, A. K., Wei, Y., Greninger, A. L., Diehl, S. A., Shirley, D. J., Leonard, D. G. B., Huston, C. D., Kirkpatrick, B. D., Dragon, J. A., Crothers, J. W., Jerome, K. R., & Botten, J. W. (2020). Direct RT-qPCR detection of SARS-CoV-2 RNA from patient nasopharyngeal swabs without an RNA extraction step. *PLoS Biology*, 18(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000896>
- Cherif, A., Grobe, N., Wang, X., & Kotanko, P. (2020). Simulation of Pool Testing to Identify Patients With Coronavirus Disease 2019 Under Conditions of Limited Test Availability. *JAMA Network Open*, 3(6), e2013075. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.13075>
- Daley, P., Castriano, S., Chernesky, M., & Smieja, M. (2006). Comparison of Flocked and Rayon Swabs for Collection of Respiratory Epithelial Cells from Uninfected Volunteers and Symptomatic Patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(6), 2265–2267. <https://doi.org/10.1128/JCM.02055-05>
- de Paula Eduardo, F., Bezinelli, L. M., de Araujo, C. A. R., Moraes, J. V. V., Birbrair, A., Pinho, J. R. R., Hamerschlag, N., Al-Hashimi, I., & Heller, D. (2022). Self-collected unstimulated saliva, oral swab, and nasopharyngeal swab specimens in the

- detection of SARS-CoV-2. *Clinical Oral Investigations*, 26(2), 1561–1567.
<https://doi.org/10.1007/s00784-021-04129-7>
- De Santi, C., Jacob, B., Kroich, P., Doyle, S., Ward, R., Li, B., Donnelly, O., Dykes, A., Neelakant, T., Neary, D., McGuinness, R., Cafferkey, J., Ryan, K., Quadu, V., McGrogan, K., Garcia Leon, A., Mallon, P., Fitzpatrick, F., Humphreys, H., ... Cavalleri, G. L. (2021). Concordance between PCR-based extraction-free saliva and nasopharyngeal swabs for SARS-CoV-2 testing. *HRB Open Research*, 4, 85.
<https://doi.org/10.12688/hrbopenres.13353.1>
- Escobar, D. F., Díaz, P., Díaz-Dinamarca, D., Puentes, R., Alarcón, P., Alarcón, B., Rodríguez, I., Manzo, R. A., Soto, D. A., Lamperti, L., Díaz, J., García-Escorza, H. E., & Vasquez, A. E. (2021). Validation of a Methodology for the Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Saliva by Real-Time Reverse Transcriptase-PCR. *Frontiers in Public Health*, 9.
<https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.743300>
- Garnett, L., Bello, A., Tran, K. N., Audet, J., Leung, A., Schiffman, Z., Griffin, B. D., Tailor, N., Kobasa, D., & Strong, J. E. (2020). Comparison analysis of different swabs and transport mediums suitable for SARS-CoV-2 testing following shortages. *Journal of Virological Methods*, 285, 113947.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113947>
- Gentilini, F., Turba, M. E., Taddei, F., Gritti, T., Fantini, M., Dirani, G., & Sambri, V. (2021). Modelling RT-qPCR cycle-threshold using digital PCR data for implementing SARS-CoV-2 viral load studies. *PLoS ONE*, 16(12 December).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260884>
- Hernes, S. S., Quarsten, H., Hagen, E., Lyngroth, A. L., Pripp, A. H., Bjorvatn, B., & Bakke, P. S. (2011). Swabbing for respiratory viral infections in older patients: a comparison of rayon and nylon flocked swabs. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 30(2), 159–165.
<https://doi.org/10.1007/s10096-010-1064-2>
- Herrera, L. A., Hidalgo-Miranda, A., Reynoso-Noverón, N., Meneses-García, A. A., Mendoza-Vargas, A., Reyes-Grajeda, J. P., Vadillo-Ortega, F., Cedro-Tanda, A., Peñaloza, F., Frías-Jimenez, E., Arriaga-Canon, C., Ruiz, R., Angulo, O., López-Villaseñor, I., Amador-Bedolla, C., Vilar-Compte, D., Cornejo, P., Cisneros-Villanueva, M., Hurtado-Cordova, E., ... Escobar-Escamilla, N. (2021). Saliva is a reliable and accessible source for the detection of SARS-CoV-2. *International Journal of Infectious Diseases*, 105, 83–90.
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.02.009>
- Hiroi, S., Kubota-Koketsu, R., Sasaki, T., Morikawa, S., Motomura, K., Nakayama, E. E., Okuno, Y., & Shioda, T. (2021). Infectivity assay for detection of SARS-CoV-2 in samples from patients with COVID-19. *Journal of Medical Virology*, 93(10), 5917–5923. <https://doi.org/10.1002/jmv.27145>
- Johnson, A. J., Zhou, S., Hoops, S. L., Hillmann, B., Schomaker, M., Kincaid, R., Daniel, J., Beckman, K., Gohl, D. M., Yohe, S., Knights, D., & Nelson, A. C. (2021). Saliva Testing Is Accurate for Early-Stage and Presymptomatic COVID-19. *Microbiology Spectrum*, 9(1). <https://doi.org/10.1128/spectrum.00086-21>
- Kerimov, D., Tamminen, P., Viskari, H., Lehtimäki, L., & Aittoniemi, J. (2021). Sampling site for SARS-CoV-2 RT-PCR-An inpatient four-site comparison from Tampere, Finland. *PLoS ONE*, 16(11 November).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260184>

- Khalaf, K., Papp, N., Chou, J. T. T., Hana, D., Mackiewicz, A., & Kaczmarek, M. (2020). SARS-CoV-2: Pathogenesis, and Advancements in Diagnostics and Treatment. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.570927>
- Machado, B. A. S., Hodel, K. V. S., Barbosa-Júnior, V. G., Soares, M. B. P., & Badaró, R. (2021). The main molecular and serological methods for diagnosing covid-19: An overview based on the literature. In *Viruses* (Vol. 13, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v13010040>
- Miguères, M., Vellas, C., Abravanel, F., Da Silva, I., Dimeglio, C., Ferrer, V., Raymond, S., Mansuy, J. M., & Izopet, J. (2021). Testing individual and pooled saliva samples for sars-cov-2 nucleic acid: a prospective study. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 101(3). <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2021.115478>
- Nasiri, K., & Dimitrova, A. (2021). Comparing saliva and nasopharyngeal swab specimens in the detection of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. In *Journal of Dental Sciences* (Vol. 16, Issue 3, pp. 799–805). Association for Dental Sciences of the Republic of China. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2021.01.010>
- Ota, K., Yanagihara, K., Sasaki, D., Kaku, N., Uno, N., Sakamoto, K., Kosai, K., Miyazaki, T., Hasegawa, H., Fujita, A., Tashiro, M., Tanaka, T., Izumikawa, K., Ariyoshi, K., Mukae, H., Yasuda, J., Morita, K., & Kohno, S. (2021). Detection of SARS-CoV-2 using qRT-PCR in saliva obtained from asymptomatic or mild COVID-19 patients, comparative analysis with matched nasopharyngeal samples. *PLoS ONE*, 16(6 June). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252964>
- Pierri, B., Tafuro, M., Cuomo, M. C., Concilio, D. Di, Vassallo, L., Pierri, A., Ferro, A., Rofrano, G., Gallo, A., Stasio, A. Di, Mancusi, A., Galdi, L., Coppola, A., Buonerba, C., Atripaldi, L., & Cerino, P. (2022). Assessment of Saliva Specimens' Reliability for COVID-19 Surveillance. *Frontiers in Public Health*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.840996>
- Pratelli, A., Lucente, M. S., Mari, V., Cordisco, M., Sposato, A., Capozza, P., Lanave, G., Martella, V., & Buonavoglia, A. (2021). A simple pooling salivary test for SARS-CoV-2 diagnosis: A Columbus' egg? *Virus Research*, 305. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198575>
- Rao, M., Rashid, F. A., Sabri, F. S. A. H., Jamil, N. N., Zain, R., Hashim, R., Amran, F., Kok, H. T., Abd Samad, M. A., & Ahmad, N. (2021). Comparing Nasopharyngeal Swab and Early Morning Saliva for the Identification of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clinical Infectious Diseases*, 72(9), E352–E356. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1156>
- Roque, M., Proudfoot, K., Mathys, V., Yu, S., Krieger, N., Gernon, T., Gokli, K., Hamilton, S., Cook, C., & Fong, Y. (2021). A review of nasopharyngeal swab and saliva tests for SARS-CoV-2 infection: Disease timelines, relative sensitivities, and test optimization. In *Journal of Surgical Oncology* (Vol. 124, Issue 4, pp. 465–475). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jso.26561>
- Sagredo-Olivares, K., Morales-Gómez, C., & Aitken-Saavedra, J. (2021). Evaluation of saliva as a complementary technique to the diagnosis of COVID-19: A systematic review. In *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal* (Vol. 26, Issue 4, pp. e526–e532). Medicina Oral S.L. <https://doi.org/10.4317/medoral.24424>
- Salu, O. B., Akase, I. E., Anyanwu, R. A., Orenolu, M. R., Abdullah, M. A., Giwa-Tubosun, T., Oloko, S. A., Oshinjo, A. M., Abiola, A. A., Oyedeji, K. S., & Omilabu, S. A. (2022). Saliva sample for detection of SARS-CoV-2: A possible alternative for

- mass testing. *PLOS ONE*, 17(9), e0275201.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0275201>
- Saluzzo, F., Mantegani, P., De Chaurand, V. P., Cugnata, F., Rovere-Querini, P., Cilla, M., Erba, P. P., Racca, S., Tresoldi, C., Uberti-Foppa, C., Di Serio, C., & Cirillo, D. M. (2021). Saliva molecular testing for SARS-CoV-2: Simplifying the diagnosis without losing accuracy. In *European Respiratory Journal* (Vol. 58, Issue 6). European Respiratory Society. <https://doi.org/10.1183/13993003.02099-2021>
- Sharma, A., Ahmad Farouk, I., & Lal, S. K. (2021). Covid-19: A review on the novel coronavirus disease evolution, transmission, detection, control and prevention. In *Viruses* (Vol. 13, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v13020202>
- Sogbesan, K., Sogbesan, T., Hata, D. J., White, E. L., Daniel, W., Gasson, S. L., Jones, D. S., Vicari, B. R., Van Siclen, C. P., Palmucci, C., Marquez, C. P., Parkulo, M. A., Thielen, K. R., & Nassar, A. (2022). Use of Self-Collected Saliva Samples for the Detection of SARS-CoV-2. *Laboratory Medicine*.
<https://doi.org/10.1093/labmed/lmac051>
- Sri Santosh, T., Parmar, R., Anand, H., Srikanth, K., & Saritha, M. (2020). A Review of Salivary Diagnostics and Its Potential Implication in Detection of Covid-19. *Cureus*.
<https://doi.org/10.7759/cureus.7708>
- Taleghani, N., & Taghipour, F. (2021). Diagnosis of COVID-19 for controlling the pandemic: A review of the state-of-the-art. In *Biosensors and Bioelectronics* (Vol. 174). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112830>
- Teo, A. K. J., Choudhury, Y., Tan, I. B., Cher, C. Y., Chew, S. H., Wan, Z. Y., Cheng, L. T. E., Oon, L. L. E., Tan, M. H., Chan, K. S., & Hsu, L. Y. (2021). Saliva is more sensitive than nasopharyngeal or nasal swabs for diagnosis of asymptomatic and mild COVID-19 infection. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82787-z>
- Tutuncu, E. E., Ozgur, D., & Karamese, M. (2021). Saliva samples for detection of SARS-CoV-2 in mildly symptomatic and asymptomatic patients. *Journal of Medical Virology*, 93(5), 2932–2937. <https://doi.org/10.1002/jmv.26821>
- Uddin, M. K. M., Shirin, T., Hossain, M. E., Alam, A. N., Ami, J. Q., Hasan, R., Miah, M., Shaly, N. J., Ahmed, S., Rahman, S. M. M., Rahman, M., & Banu, S. (2021). Diagnostic Performance of Self-Collected Saliva Versus Nasopharyngeal Swab for the Molecular Detection of SARS-CoV-2 in the Clinical Setting. *Microbiology Spectrum*, 9(3). <https://doi.org/10.1128/spectrum.00468-21>
- Umakanthan, S., Sahu, P., Ranade, A. V., Bukelo, M. M., Rao, J. S., Abrahao-Machado, L. F., Dahal, S., Kumar, H., & Kv, D. (2020). Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19). In *Postgraduate Medical Journal* (Vol. 96, Issue 1142, pp. 753–758). BMJ Publishing Group.
<https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2020-138234>
- Vander Schaaf, N. A., Fund, A. J., Munnich, B. V., Zastrow, A. L., Fund, E. E., Senti, T. L., Lynn, A. F., Kane, J. J., Love, J. L., Long, G. J., Troendle, N. J., & Sharda, D. R. (2021). Routine, Cost-Effective SARS-CoV-2 Surveillance Testing Using Pooled Saliva Limits Viral Spread on a Residential College Campus. *Microbiology Spectrum*, 9(2). <https://doi.org/10.1128/spectrum.01089-21>
- Vogels, C. B. F., Watkins, A. E., Harden, C. A., Brackney, D. E., Shafer, J., Wang, J., Caraballo, C., Kalinich, C. C., Ott, I. M., Fauver, J. R., Kudo, E., Lu, P., Venkataraman, A., Tokuyama, M., Moore, A. J., Muenker, M. C., Casanovas-Massana, A., Fournier, J., Bermejo, S., ... Grubaugh, N. D. (2021). SalivaDirect: A

- simplified and flexible platform to enhance SARS-CoV-2 testing capacity. *Med*, 2(3), 263-280.e6. <https://doi.org/10.1016/j.medj.2020.12.010>
- Ward, S., Lindsley, A., Courter, J., & Assa'ad, A. (2020). Clinical testing for COVID-19. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 146(1), 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.05.012>
- Wyllie, A. L., Fournier, J., Casanovas-Massana, A., Campbell, M., Tokuyama, M., Vijayakumar, P., Warren, J. L., Geng, B., Muenker, M. C., Moore, A. J., Vogels, C. B. F., Petrone, M. E., Ott, I. M., Lu, P., Venkataraman, A., Lu-Culligan, A., Klein, J., Earnest, R., Simonov, M., ... Ko, A. I. (2020). Saliva or Nasopharyngeal Swab Specimens for Detection of SARS-CoV-2. *New England Journal of Medicine*, 383(13), 1283–1286. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2016359>
- Yip, C. C. Y., Sridhar, S., Leung, K. H., Ng, A. C. K., Chan, K. H., Chan, J. F. W., Tsang, O. T. Y., Hung, I. F. N., Cheng, V. C. C., Yuen, K. Y., & To, K. K. W. (2020). Development and evaluation of novel and highly sensitive single-tube nested real-time rt-pcr assays for sars-cov-2 detection. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ijms21165674>
- Yokota, I., Shane, P. Y., Okada, K., Unoki, Y., Yang, Y., Inao, T., Sakamaki, K., Iwasaki, S., Hayasaka, K., Sugita, J., Nishida, M., Fujisawa, S., & Teshima, T. (2021). Mass Screening of Asymptomatic Persons for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Using Saliva. *Clinical Infectious Diseases*, 73(3), E559–E565. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1388>
- Yüce, M., Filiztekin, E., & Özkaya, K. G. (2021). COVID-19 diagnosis —A review of current methods. *Biosensors and Bioelectronics*, 172. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112752>
- Yue Zu, Z., Di Jiang, M., Peng Xu, P., Chen, W., Qian Ni, Q., Ming Lu, G., & Jiang Zhang, L. (n.d.). *A Perspective from China*.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 Detalhamento das metodologias utilizadas no estudo

Cultura viral

Cultivo celular de células VERO 81

As células VERO foram mantidas em frasco de cultura celular de 75cm² com meio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Sigma ®) suplementado com soro fetal bovino (SFB - Nova Biotecnologia ®) 10% inativado e 1% de antibiótico/antifúngico a 37°C e 5% CO₂.

Propagação viral

A infecção viral ocorreu em frascos de cultivo celular cujas células apresentaram uma confluência $\geq 90\%$. Assim, o meio de cultivo foi removido do frasco de cultura celular de 75cm² e, adicionado 1000µL de alíquota viral. Em seguida, o frasco de cultura celular foi colocado em um agitador gangorra (K40-3012 - Kasvi) a 37°C e 5% CO₂ por 60 minutos. Logo após, o sobrenadante do frasco de cultura celular foi descartado e houve a lavagem da cultura com PBS (phosphate- buffered saline). Por fim, foi adicionado 12mL de meio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Sigma ®) suplementado com soro fetal bovino (SFB, Nova Biotecnologia ®) 2% inativado e 1% de antibiótico/antifúngico. As células infectadas com os vírus foram incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 7 dias. Após observar o efeito citopático, o sobrenadante foi centrifugado a 4.000rpm por 5 minutos, aliquoteado e armazenado em freezer a -80°C. O pellet contendo os debris celulares foi descartado.

Extração de RNA com metodologia Extracta 96 Loccus

A extração de RNA foi realizada de maneira automatizada com base no protocolo Extracta 96 do Equipamento Loccus. Para obtenção da espécie foram utilizadas 4 placas de poço fundo identificadas como "PP2 Lise", "PP3 Wash 1", "PP4 Wash 2" e "PP8 Elution". Posteriormente, as placas foram preenchidas com o volume que se segue:

Tabela 5. Volume de reagentes para Extração de RNA

Nome da Placa	Reagente	Volume
PP2 Lise	Lise	100 µL
	Tampão de lise e Beads magnéticas (LB)	250 µL
	Beads	260 µL
PP3 Wash 1	Etanol 80%	500 µL
	Tampão de lavagem 1 (WB1)	250 µL
PP4 Wash 2	Etanol 80%	500 µL
	Tampão de lavagem 2(WB2)	175 µL
PP8 Elution	Água ultrapura	100 µL
	Solução de Eluição (EB)	50 µL

Em seguida, as placas foram apostas no equipamento ao qual realizou o processo reacional para a conclusão da extração da amostra de RNA.

Protocolo de RT-qPCR com base no POP do Laboratório de Biotecnologia Aplicada do HCFMB

O kit RT-qPCR Allplex™ SARS-CoV-2 Assay deve ser manuseado em fluxo laminar de uso exclusivo para reagentes. O kit contém os seguintes reagentes abaixo:

Figura 5: Reagentes Allplex™ SARS-CoV-2 Assay

Allplex™ SARS-CoV-2 Assay			
Símbolo	Conteúdos	Volume	Descrição
	SARS2 MOM	250 µL	Oligo Mix - Reagente de amplificação e detecção
	EM8	250 µL	- RTase - DNA polimerase - Uracil-DNA glicosilase (UDG) - Tampão contendo dNTPs
	SARS2 PC	25 µL	Controlo Positivo (PC): - Mistura de clones de patógenos e IC
	RP-V IC 2	500 µL	Controlo Interno Exógeno (IC)
	RNase-free Water	1.000 µL	Qualidade ultrapura, grau de PCR
	Manual do usuário		

Fonte: Manual Allplex™ SARS-CoV-2 Assay. Disponível em:
https://seegenebrazil.com.br/wp-content/uploads/2021/01/RV10247Y_V1-15_PT-Manual.pdf

Estes reagentes foram dispersados da seguinte maneira:

Tabela 6. Ensaio RT-qPCR para uma amostra

Reagente	Quantidade
SARS2 MOM	5µl
EM8	5µl
RNase-free Water	4µl
RP-V IC 2	1µl
Volume total kit por poço	15µl
Amostra	5µl
Volume total do ensaio por poço	20µl

Diante disso, o preparo do master mix deve ser feito dentro do fluxo laminar e distribuído na placa de 96 poços para RT-qPCR e a amostra deve ser acrescentada externamente ao fluxo. Posteriormente, os 2 últimos poços (12G e 12H) devem ser destinados para o controle positivo e negativo, respectivamente.

Programação do equipamento Applied Biosystems™ 7500 (SDS software v2.0.5)

O primeiro passo é definir os alvos e as amostras, sendo que:

Tabela 7. Definição do target name

Nome do alvo (Target Name)	Corante (Reporter)
Gene E	FAM
IC	VIC
RdRP	ROX
Gene N	CY5

Logo, o último passo é definir o perfil térmico, bem como, seu número de ciclagem, da maneira que se segue:

Figura 6. Perfil térmico

Etapa	N.º de ciclos	Temperatura	Duração
1	1	50°C	20 min
2		95°C	15 min
3	45	95°C	10 seg
4*		60°C	30 seg
5		72°C	10 seg

Fonte: Manual Allplex™ SARS-CoV-2 Assay. Disponível em: https://seegenebrazil.com.br/wp-content/uploads/2021/01/RV10247Y_V1-15_PT-Manual.pdf

São considerados resultados válidos aqueles que obedecerem aos seguintes critérios:

- 1) As amostras e o controle positivo deveriam apresentar Ct menor ou igual a 35 e o controle negativo valor de Ct não determinado para o gene do controle interno (IC);
- 2) As amostras que não obedecerem ao critério de amplificação para o gene do controle interno (IC) serão extraídas novamente e caso falhe novamente, poderia ser solicitado nova amostra;

- 3) Se o controle negativo da RT-qPCR amplificar o gene IC, todas as amostras na mesma placa deveriam ser amplificadas novamente;
- 4) Caso o gene E não amplifique no controle positivo todas as amostras que não amplificaram o gene E devem ser repetidas;
- 5) O Sars-CoV-2 será considerado detectado se: o Ct para o Gene E, Gene N e Gene RdRp for menor ou igual a 40,0 (pelo menos 2 genes com CT ≤ 40 simultaneamente). Amostras com Ct igual ou maior que 40,1 serão consideradas não detectadas para Sars-CoV-2;

RT-ddPCR para quantificação absoluta de SARS-CoV-2

As amostras foram preparadas em triplicatas, no equipamento de PCR digital em gotas (Droplet Digital PCR - ddPCR) utilizando o kit 1-Step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes (Biorad, Cat. 1864021). Foram usados 5 μ L das amostras e mix para a reação. Com as amostras já nas devidas posições no cartucho de geração de gotas (DG8 Cartridges), foi adicionado Droplet Generation Oil for Probes na posição correspondente do cartucho, para a posterior geração de gotas no equipamento Automated Droplet Generator. Depois da geração das gotas, a solução obtida foi levada ao termociclador e lidas no equipamento QX200 Droplet Reader (BIO-RAD).

Cálculo da curva padrão

Com base nos dados obtidos na quantificação absoluta por RT-ddPCR e por RT-qPCR para o gene E foi possível montar uma curva padrão para a reação de RT-qPCR.

APÊNDICE 2: Procedimento Operacional Padrão: NOVO PROTOCOLO DIAGNÓSTICA USANDO A SALIVA COMO MATERIAL BIOLÓGICO



LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – ROTINA DIAGNÓSTICAS

NOVO PROTOCOLO DIAGNÓSTICO PARA SARS-COV-2 USANDO A SALIVA COMO MATERIAL BIOLÓGICO

**Botucatu
2023**

**PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – ROTINA
DIAGNÓSTICAS**

**NOVO PROTOCOLO DIAGNÓSTICO PARA SARS-COV-2 USANDO A
SALIVA COMO MATERIAL BIOLÓGICO**

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n - Unesp - Campus de Botucatu CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6154 RAMAL 210		POP SALIVA Pág.: 3
			Emissão:
	NOVO PROTOCOLO DIAGNÓSTICO PARA SARS-COV-2 USANDO A SALIVA COMO MATERIAL BIOLÓGICO		Revisão nº:
			Última Revisão:

ÍNDICE

APRESENTAÇÃO.....	4
1. Limpeza e descontaminação.....	6
2. Coleta, manuseio e transporte de amostra de saliva individual.....	8
3. Recebimento e identificação das amostras de saliva individual.....	10
4. Extração de RNA Extracta 96.....	12
5. Extração de RNA Unixtractor 32.....	15
6. Preparo da reação de RT-PCR e distribuição das amostras.....	18
7. Análise dos resultados (In House).....	21
Referências.....	22
Anexos.....	23
Anexo 01 – Fluxograma da rotina diagnóstica do LBA na COVID-19.....	23

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n - Unesp - Campus de Botucatu CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6154 RAMAL 210	Pág.: 4
	NOVO PROTOCOLO DIAGNÓSTICO PARA SARS-COV-2 USANDO A SALIVA COMO MATERIAL BIOLÓGICO	Emissão:
		Revisão nº:
		Última Revisão:
1. APRESENTAÇÃO		

APRESENTAÇÃO

Após o SARS-CoV-2 se tornar um problema de saúde pública global, ficou estabelecido que o padrão-ouro para diagnóstico do novo coronavírus seria por meio da Reação em Cadeia Polimerase de amostras de swab do trato respiratório superior. Em meados de 2021, o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HCFMB) implantou um método de monitoramento via amostra de saliva para o diagnóstico de COVID-19, denominado “Pool de Saliva”. O pool de saliva é um método de triagem para assintomáticos, na qual amostras de salivas são agrupadas e passam por processo de detecção de genes virais de SARS-CoV-2. Este método de monitoramento performou com eficiência durante a pandemia da Covid-19 e devido a várias vantagens com relação a coleta por saliva, o objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade e confiabilidade na troca da coleta do swab por saliva para a detecção de SARS-CoV-2 em salivas individuais de sintomáticos por PCR em tempo real, com o intuito de permitir a implementação de um novo método de coleta para o diagnóstico de COVID-19 no HCFMB. Para o processo de validação, correlação de Spearman foi feita na verificação de equivalência entre a coleta por saliva e por swab. A concordância entre os métodos foi avaliada utilizando o teste de Bland-Altman, verificando-se os cycle thresholds (CT). Adicionalmente, foi aplicado o teste de Wilcoxon para comparação das medianas de CT entre swab e saliva. Testes de correlação foram realizados e aplicados com o intuito de avaliar a associação entre parâmetros clínicos e vacinais versus CTs obtidos para saliva e swab. A análise de componentes principais foi realizada com o intuito de separar clusters para avaliação de parâmetros clínicos e status vacinal. Verificação da interferência da matriz amostral, sendo aplicado teste estatístico de Dunn's', e testes de limite de detecção para os dois métodos de coleta também foram realizados. Este estudo mostrou que, para fins diagnósticos na detecção de SARS-CoV-2, as coletas por saliva e swab apresentam alta concordância de resultados (96,96%), no entanto, em relação a expressão da carga viral, estes métodos apresentam baixa concordância, apresentando o swab maior eficácia na obtenção de material genético viral para detecção por PCR em tempo real. Em contrapartida, a avaliação da interferência da matriz amostral mostrou que a saliva apresenta menor interferência no diagnóstico em relação ao swab. Adicionalmente, o teste dos limites de detecção mostrou equivalência quanto a sensibilidade para os dois métodos de coleta. O estudo mostrou ainda que o

Aprovação: Gestão de Qualidade – LBA/HCFMB	Aprovação: Responsável Técnico – LBA/HCFMB
--	--

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n - Unesp - Campus de Botucatu CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6154 RAMAL 210	Pág.: 5
		Emissão:
		Revisão nº:
		Última Revisão:
NOVO PROTOCOLO DIAGNÓSTICO PARA SARS-COV-2 USANDO A SALIVA COMO MATERIAL BIOLÓGICO		
1. APRESENTAÇÃO		

indivíduo vacinado não tem a detecção viral prejudicada em um diagnóstico de Covid-19 por nenhum dos dois métodos avaliados. Além disso, a eficácia da vacina, no que diz respeito a prevenção de agravamento da doença, não tem relação com as estratégias de ação de cada imunizante. Finalmente, a saliva em comparação ao swab apresentou menos custos financeiros e exige menor utilização de materiais plásticos, o que a torna mais sustentável. Com isto, a coleta via saliva mostrou potencial na substituição do método de coleta por swab, tanto pela equivalência de resultados, quanto com relação a custos e sustentabilidade.

Aprovação: Gestão de Qualidade – LBA/HCFMB	Aprovação: Responsável Técnico – LBA/HCFMB
--	--

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n - Unesp - Campus de Botucatu CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6154 RAMAL 210	Pág.: 6
	NOVO PROTOCOLO DIAGNÓSTICO PARA SARS-COV-2 USANDO A SALIVA COMO MATERIAL BIOLÓGICO	Emissão:
		Revisão nº:
		Última Revisão:
2. LIMPEZA E DESINFECÇÃO		

**MANUAL SOBRE O MANUSEIO E IMPLEMENTAÇÃO DA SALIVA COMO
AMOSTRA PADRÃO-OURO NA DETECÇÃO DE SARS-CoV-2:**

❖ LIMPEZA E DESINFECÇÃO

Este procedimento garante a descontaminação do ambiente de manuseio e evita a perda de amostras biológicas por contaminação e/ou resultados incorretos na detecção de presença ou ausência de SARS-CoV-2. Pode ser realizado por Técnicos de laboratório, Auxiliares de laboratório, Doutores, Biólogos e Biomédicos.

Uso de EPIs:

- I. Avental descartável de gramatura 50 com manga longa, punho de malha e comprimento até o joelho.
- II. Touca
- III. Máscara
- IV. Luvas sem talco
- V. Óculos de proteção
- VI. Sapatos fechados

Materiais:

- I. Hipoclorito 1%
- II. Álcool 70%
- III. Gaze
- IV. Extran
- V. Água MilliQ

Procedimentos diários:

- As bancadas e fluxo laminar deverão ser limpos com solução de hipoclorito a 1%, água destilada e solução de etanol 70% a cada início e fim de procedimento, pelo próprio usuário.
- As centrífugas deverão ser limpas com solução de álcool 70% após cada utilização, procedimento este de responsabilidade do usuário.

Aprovação: Gestão de Qualidade – LBA/HCFMB	Aprovação: Responsável Técnico – LBA/HCFMB
--	--

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n - Unesp - Campus de Botucatu CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6154 RAMAL 210	Pág.: 7
		Emissão:
		Revisão nº:
		Última Revisão:
NOVO PROTOCOLO DIAGNÓSTICO PARA SARS-COV-2 USANDO A SALIVA COMO MATERIAL BIOLÓGICO		
2. LIMPEZA E DESINFECÇÃO		

- As maçanetas deverão ser limpas com solução de Álcool 70%, procedimento este de responsabilidade do setor de limpeza da FMB.

Procedimentos semanais:

- O chão deverá ser limpo com solução de cloro ou fenol quaternário diluído segundo fabricante, procedimento este de responsabilidade do setor de limpeza da FMB.
- Os panos para as áreas pré e pós deverão ser separados.
- Tirar o pó das prateleiras com pano tipo perfix umedecido com água, organizar as gavetas, limpar as quatro paredes do fluxo utilizando álcool 70% ou álcool iodado.

Procedimentos mensais:

- Descongelar freezers, limpar todos os armários.

Procedimentos semestral:

- Limpeza do fluxo laminar, desmontar as partes do interior do fluxo e com o auxílio de uma esponja lavá-las, com detergente extran e realizar o enxague com água de torneira.
- Realizar o mesmo procedimento de lavagem no interior do fluxo a retirada do sabão é mais delicada, com o auxílio de uma pisseta de água e um pano limpo.
- Secar o interior do fluxo e as partes retiradas, montá-lo.
- Ligar o fluxo na ventilação, luz UV por no máximo 15 minutos.

Referência

(SEGURANÇA E SAÚDE NO TRABALHO EM SERVIÇOS DE SAÚDE, 2023)

Aprovação: Gestão de Qualidade – LBA/HCFMB	Aprovação: Responsável Técnico – LBA/HCFMB
--	--

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n - Unesp - Campus de Botucatu CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6154 RAMAL 210	Pág.: 8
		Emissão:
		Revisão nº:
		Última Revisão:
NOVO PROTOCOLO DIAGNÓSTICO PARA SARS-COV-2 USANDO A SALIVA COMO MATERIAL BIOLÓGICO		
3. COLETA, MANUSEIO E TRANSPORTE DE AMOSTRA DE SALIVA INDIVIDUAL		

❖ COLETA, MANUSEIO E TRANSPORTE DE AMOSTRA DE SALIVA INDIVIDUAL

Essencial para garantir a coleta da amostra biológica e transporte adequado pelas unidades que enviam amostras até o laboratório. Pode ser realizado por Técnicos de laboratório, Auxiliares de laboratório, Doutores, Biólogos, Biomédicos, Enfermeiros e Técnicos de enfermagem. Realizando este passo corretamente evita-se perda de amostras devido à: sem volume adequado, pelo acondicionamento ou transporte inadequado (refrigeração) ou estar fora do prazo de viabilidade da amostra (72 horas após a coleta).

EPIs necessários para o Profissional da Saúde:

Como se trata de uma auto coleta o profissional da saúde apenas assistirá a coleta como forma de apoio às instruções, portanto, o mesmo deverá usar:

- I. Toca
- II. Um par de luvas sem talco descartável
- III. Máscara descartável

Materiais:

- I. Tubo tipo eppendorf 2mL free de RNase e DNase

Método:

- A coleta deve ser feita em jejum de alimento e sem escovar os dentes por um intervalo de no mínimo 2 horas. Água *ad libitum*;
- O paciente deve cuspir no tubo de exame (tubo tipo eppendorf de 2 mL) até atingir a proporção de ½ de saliva no tubo;
 - Obs: em casos especiais, o paciente poderá utilizar copinho descartável de café como meio de transferir a saliva para o tubo de exame;
- Em seguida, é recomendado que o próprio paciente tampe e higienize a parte externa do tubo com água corrente (na pia de banheiro) e, após com álcool 70%.
- Rotular o tubo com etiqueta de identificação do paciente.
- Enviar as amostras juntamente com a lista, a qual contém o nome do paciente, documento do paciente, nome do setor, nome do responsável pela coleta das amostras e o código da etiqueta;

Aprovação: Gestão de Qualidade – LBA/HCFMB	Aprovação: Responsável Técnico – LBA/HCFMB
--	--

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n - Unesp - Campus de Botucatu CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6154 RAMAL 210	Pág.: 9
		Emissão:
		Revisão nº:
		Última Revisão:
NOVO PROTOCOLO DIAGNÓSTICO PARA SARS-COV-2 USANDO A SALIVA COMO MATERIAL BIOLÓGICO		
3. COLETA, MANUSEIO E TRANSPORTE DE AMOSTRA DE SALIVA INDIVIDUAL		

- Armazenar as amostras entre 4 e 8° C até o encaminhamento ao laboratório que executará a análise;
- As amostras devem ser enviadas para o laboratório dentro de caixa térmica rígida contendo gelox a fim de manter a temperatura das amostras.

Referência

(Laboratório de Biologia Molecular, 2021)

Aprovação: Gestão de Qualidade – LBA/HCFMB	Aprovação: Responsável Técnico – LBA/HCFMB
--	--

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n - Unesp - Campus de Botucatu CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6154 RAMAL 210	Pág.: 10
		Emissão:
	NOVO PROTOCOLO DIAGNÓSTICO PARA SARS-COV-2 USANDO A SALIVA COMO MATERIAL BIOLÓGICO	Revisão nº:
		Última Revisão:
4. RECEBIMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SALIVA INDIVIDUAL		

❖ RECEBIMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SALIVA INDIVIDUAL

Este procedimento garante o recebimento e identificação da maneira adequada, a confecção desta etapa de maneira incorreta pode ocasionar em tubos de amostras biológicas trocados e, conseqüentemente, posteriores resultados.

Uso de EPIs:

- I. Avental descartável de gramatura 50 com manga longa, punho de malha e comprimento até o Joelho.
- II. Touca
- III. Máscara N95
- IV. Luvas de procedimentos sem talco.
- V. Face Shield (Viseira)
- VI. Sapatos fechados

Materiais:

- I. Tubo tipo eppendorf 2mL free de RNase e DNase
- II. Solicitação de exame para diagnóstico de Covid-19

Recebimento e identificação das amostras de saliva:

- Utilizar os equipamentos de proteção individual e coletiva.
- Na chegada das caixas térmicas contendo as amostras ao laboratório, borrifar álcool 70% por fora da caixa, retirar as amostras, borrifar álcool 70% dentro da caixa térmica e devolver para o profissional.
- Transferir as amostras da caixa para estante de tubos
- Cada tubo é numerado com um número interno correspondente ao número da solicitação de exame;
- Os dados contidos no tubo de cada amostra será confrontado com os dados contido no seu respectivo pedido de exame para verificação.
- Em seguida o tubo é vortexado para homogeneizar a amostra.
- A partir desse momento o tubo será processado e analisado igual a uma amostra de swab de SARS CoV-2.

Aprovação: Gestão de Qualidade – LBA/HCFMB	Aprovação: Responsável Técnico – LBA/HCFMB
--	--

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n - Unesp - Campus de Botucatu CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6154 RAMAL 210	Pág.: 11
		Emissão:
	NOVO PROTOCOLO DIAGNÓSTICO PARA SARS-COV-2 USANDO A SALIVA COMO MATERIAL BIOLÓGICO	Revisão nº:
		Última Revisão:
4. RECEBIMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SALIVA INDIVIDUAL		

Referência:

Protocolo estabelecido pelo laboratório

Aprovação: Gestão de Qualidade – LBA/HCFMB	Aprovação: Responsável Técnico – LBA/HCFMB
--	--

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n - Unesp - Campus de Botucatu CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6154 RAMAL 210	Pág.: 12
		Emissão:
	NOVO PROTOCOLO DIAGNÓSTICO PARA SARS-COV-2 USANDO A SALIVA COMO MATERIAL BIOLÓGICO	Revisão nº:
		Última Revisão:
5. EXTRAÇÃO DE RNA EXTRACTA 96		

❖ EXTRAÇÃO DE RNA EXTRACTA 96

Materiais:

- I. Tubo tipo eppendorf 2mL free de RNase e DNase contendo a amostra de saliva
- II. Pipeta Multicanal de 300µL e 1200 µL
- III. Placa de 96 poços
- IV. Equipamento Extracta96
- V. Kit de extração “SPRI RNA Extraction” ou “MVXA-P096 Fast Encapsulador “96 Tip Comb” e placas de poço fundo de 2,2mL;
- VI. Ponteiras com filtro p200 e p1000
- VII. Canaleta para pipeta multicanal

EPIs:

- I. Avental descartável de gramatura 50 com manga longa, punho de malha e comprimento até o joelho.
- II. Touca
- III. Máscara N95
- IV. Luvas de procedimentos sem talco
- V. Face Shield (Viseira)
- VI. Sapatos fechados

Manuseio:

- Separar 4 placas de poço fundo e identificar como “PP2 Lise”, “PP3 Wash 1”, “PP4 Wash 2” e “PP8 Elution”;
- Nomear as canaletas com os respectivos reagentes utilizados na extração;
- Em seguida, preencher todos os poços de cada placa com os seguintes reagentes volumes:

Aprovação: Gestão de Qualidade – LBA/HCFMB	Aprovação: Responsável Técnico – LBA/HCFMB
--	--

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n - Unesp - Campus de Botucatu CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6154 RAMAL 210		Pág.: 13
	NOVO PROTOCOLO DIAGNÓSTICO PARA SARS-COV-2 USANDO A SALIVA COMO MATERIAL BIOLÓGICO		Emissão:
			Revisão nº:
			Última Revisão:
5. EXTRAÇÃO DE RNA EXTRACTA 96			

Tabela 1: Volume de reagente utilizados para extração de RNA

Nome da Placa	Reagente	Volume
PP2 Lise	Lise	100 µL
	Tampão de lise e Beads magnéticas (LB)	250 µL
	Beads	260 µL
PP3 Wash 1	Etanol 80%	500 µL
	Tampão de lavagem 1 (WB1)	250 µL
PP4 Wash 2	Etanol 80%	500 µL
	Tampão de lavagem 2(WB2)	175 µL
PP8 Elution	Água ultrapura	100 µL
	Solução de Eluição (EB)	50 µL

SPRI RNA Extraction MVXA-P096 Fast

- Adicionar em cada poço da placa PP2 Lise o volume de 200 µL de amostra para extração pelo kit SPRI RNA extraction e 100 µL para extração pelo kit MVXA-P096 Fast;
- Ligar o Robô Extracta96 (Loccus), verificar se a placa de apoio está presente na posição 1 do robô, em seguida colocar o 96 TipComp;
- Posicionar as demais placas em seus respectivos locais, conforme identificado no equipamento/robô e verificar se a posição A1 está posicionada corretamente;
- Para iniciar a extração, utilizar o programa SPRI para o kit “SPRI RNA Extraction” ou o “MVXA fast” para o kit MVXA-P096 Fast;
- Finalizada a extração, remover primeiramente a placa PP8 Elution que contém o RNA extraído e encaminhá-la para a RT-PCR ou congelar a -20° C por no máximo 48h ou a -80° C por prazo indeterminado;
- Em seguida, remover e descartar as demais placas;
- No final do dia, antes de desligar o equipamento, iniciar o programa de descontaminação por UV por 30 minutos.

Aprovação: Gestão de Qualidade – LBA/HCFMB	Aprovação: Responsável Técnico – LBA/HCFMB
--	--

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n - Unesp - Campus de Botucatu CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6154 RAMAL 210	Pág.: 14
		Emissão:
	NOVO PROTOCOLO DIAGNÓSTICO PARA SARS-COV-2 USANDO A SALIVA COMO MATERIAL BIOLÓGICO	Revisão nº:
		Última Revisão:
5. EXTRAÇÃO DE RNA EXTRACTA 96		

Referência:

(LOCCUS, n.d.)

Aprovação: Gestão de Qualidade – LBA/HCFMB	Aprovação: Responsável Técnico – LBA/HCFMB
--	--

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n - Unesp - Campus de Botucatu CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6154 RAMAL 210	Pág.: 15
		Emissão:
	NOVO PROTOCOLO DIAGNÓSTICO PARA SARS-COV-2 USANDO A SALIVA COMO MATERIAL BIOLÓGICO	Revisão nº:
		Última Revisão:
6. EXTRAÇÃO DE RNA UNIXTRACTOR 32		

❖ EXTRAÇÃO DE RNA UNIXTRACTOR 32

Esta etapa também se trata de uma extração de RNA viral, porém, para menor quantidade de amostras.

EPIs:

- I. Avental descartável de gramatura 50 com manga longa, punho de malha e comprimento até o Joelho.
- II. Touca
- III. Máscara N95
- IV. Luvas de procedimentos sem talco
- V. Face Shield (Viseira)
- VI. Sapatos fechados

Materiais:

- I. Tubo tipo eppendorf 2mL free de RNase e DNase contendo a amostra de saliva
- II. Pipeta Multicanal de 300µL e 1200 µL
- III. Placa de 96 poços
- IV. Equipamento UniXtractor uni-E191
- V. Kit de extração “SPRI RNA Extraction” ou “MVXA-P096 Fast”, proteção plástica “96 Tip Comb” e placas de poço fundo de 2,2mL;
- VI. Ponteiros com filtro p200 e p1000
- VII. Canaleta para pipeta multicanal

Manuseio:

Utilizar as seguintes quantidades conforme o número de amostras:

- Para 8 amostras: Uma placa de poço fundo e um pente de amostra (Tip 8 well).
- Para 16 amostras: Uma placa de poço fundo e dois pentes de amostra (Tip 8 well).
- Para 24 amostras: Duas placas de poço fundo e três pentes de amostra (Tip 8 well).
- Para 32 amostras: Duas placas de poço fundo e quatro pentes de amostra (Tip 8 well)

Aprovação: Gestão de Qualidade – LBA/HCFMB	Aprovação: Responsável Técnico – LBA/HCFMB
--	--

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n - Unesp - Campus de Botucatu CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6154 RAMAL 210	Pág.: 16
		Emissão:
	NOVO PROTOCOLO DIAGNÓSTICO PARA SARS-COV-2 USANDO A SALIVA COMO MATERIAL BIOLÓGICO	Revisão nº:
		Última Revisão:
6. EXTRAÇÃO DE RNA UNIXTRACTOR 32		

➤ Preencher cada placa da seguinte forma:

Tabela 2: Modelo para disposição dos reagentes da placa de extração Unixtractor 32

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LISE + BEADS SPRI	WASH 1 (ETANOL 80%)	WASH 2 (ETANOL 80%)	VAZIO	VAZIO	ELUTION (ÁGUA)	LISE + BEADS SPRI	WASH 1 (ETANOL 80%)	WASH 2 (ETANOL 80%)	VAZIO	VAZIO	ELUTION (ÁGUA)
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												



- Colocar em cada poço de cada coluna com micropipeta multicanal (8 canais):
- Coluna 1 e/ou 7: colocar Lise (vide tabela de proporções abaixo);
- Coluna 2 e/ou 8: 500µL de Wash 1.
- Coluna 3 e/ou 9: 500µL de Wash 2.
- Coluna 6 e/ou 12: 100µL de Elution.

Aprovação: Gestão de Qualidade – LBA/HCFMB	Aprovação: Responsável Técnico – LBA/HCFMB
--	--

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n - Unesp - Campus de Botucatu CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6154 RAMAL 210	Pág.: 17
	NOVO PROTOCOLO DIAGNÓSTICO PARA SARS-COV-2 USANDO A SALIVA COMO MATERIAL BIOLÓGICO	Emissão:
		Revisão nº:
		Última Revisão:
6. EXTRAÇÃO DE RNA UNIXTRACTOR 32		

Tabela 3: Volume de reagente utilizados para extração de RNA Unixtractor 32

Nome da Placa	Reagente	Volume
PP2 Lise	Lise	100 µL
	Tampão de lise e Beads magnéticas (LB)	250 µL
	Beads	260 µL
PP3 Wash 1	Etanol 80%	500 µL
	Tampão de lavagem 1 (WB1)	250 µL
PP4 Wash 2	Etanol 80%	500 µL
	Tampão de lavagem 2(WB2)	175 µL
PP8 Elution	Água ultrapura	100 µL
	Solução de Eluição (EB)	50 µL

SPRI RNA Extraction MVXA-P096 Fast

Referência:

(UNISCIENCE, n.d.)

Aprovação: Gestão de Qualidade – LBA/HCFMB	Aprovação: Responsável Técnico – LBA/HCFMB
--	--

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n - Unesp - Campus de Botucatu CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6154 RAMAL 210	Pág.: 18
		Emissão:
	NOVO PROTOCOLO DIAGNÓSTICO PARA SARS-COV-2 USANDO A SALIVA COMO MATERIAL BIOLÓGICO	Revisão nº:
		Última Revisão:
7. PREPARO DA REAÇÃO DE RT-qPCR e DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS		

❖ PREPARO DA REAÇÃO DE RT-qPCR e DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS

Nesta etapa, serão preparados os reagentes para a realização da Reação em Cadeia da Polimerase método Quantitativo (RT-qPCR).

Materiais:

- Centrífuga;
- Micropipetas de 10, 100, 200 e 1000ul;
- Ponteiras com barreira de 10, 100, 200, e 1000ul;
- Rack de tubos de 1,5ml;
- Placa de qpcr de 96 poços;
- Selo de placa para qpcr;
- Agitador vortex;
- Gazes para limpeza;
- Pisseta com álcool 70%;
- Tubos cônicos tipo eppendorf de 1,5ml;
- Kit genefinder covid-19 fast realamp.

EPIs:

- Avental descartável de gramatura 50 com manga longa, punho de malha e comprimento até o joelho.
- Touca
- Máscara tripla
- Luvas de procedimentos sem talco
- Sapatos fechados

Aprovação: Gestão de Qualidade – LBA/HCFMB	Aprovação: Responsável Técnico – LBA/HCFMB
--	--

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n - Unesp - Campus de Botucatu CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6154 RAMAL 210	Pág.: 19
	NOVO PROTOCOLO DIAGNÓSTICO PARA SARS-COV-2 USANDO A SALIVA COMO MATERIAL BIOLÓGICO	Emissão:
		Revisão nº:
		Última Revisão:
7. PREPARO DA REAÇÃO DE RT-qPCR e DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS		

Tabela 04: Preparo do Mix da reação multiplex kit Allplex™

Allplex™ SARS-CoV-2 Assay			
Símbolo	Conteúdos	Volume	Descrição
PRIMER	SARS2 MOM	250 µL	Oligo Mix - Reagente de amplificação e detecção
PREMIX	EM8	250 µL	- RTase - DNA polimerase - Uracil-DNA glicosilase (UDG) - Tampão contendo dNTPs
CONTROL +	SARS2 PC	25 µL	Controlo Positivo (PC): - Mistura de clones de patógenos e IC
CONTROL IC	RP-V IC 2	500 µL	Controlo Interno Exógeno (IC)
WATER	RNase-free Water	1.000 µL	Qualidade ultrapura, grau de PCR
	Manual do usuário		

- Ligar o fluxo de ar do fluxo laminar, abrir e passar álcool 70% com auxílio de gases sobre a superfície interna, fechar a porta e ligar a luz UV por 15 minutos.
- Retirar os reagentes do Kit kit Allplex™ COVID-19 freezer e colocar no fluxo e descongelar e preparar o mix de reação conforme tabela 4 acima.
- Distribuir 15µL do mix em cada poço da placa de PCR no fluxo laminar (conforme tabela 5 abaixo).
- Remover a placa do fluxo e acrescentar 5µl de amostra, controle positivo ou negativo nos poços correspondentes.
- Selar a placa e correr nas seguintes condições de termociclagem, descritas abaixo na tabela 6.

Aprovação: Gestão de Qualidade – LBA/HCFMB	Aprovação: Responsável Técnico – LBA/HCFMB
--	--

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n - Unesp - Campus de Botucatu CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6154 RAMAL 210	Pág.: 20
	NOVO PROTOCOLO DIAGNÓSTICO PARA SARS-COV-2 USANDO A SALIVA COMO MATERIAL BIOLÓGICO	Emissão:
		Revisão nº:
		Última Revisão:
7. PREPARO DA REAÇÃO DE RT-qPCR e DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS		

Tabela 5: Ensaio RT-qPCR para uma amostra

Reagente	Quantidade
SARS2 MOM	5µl
EM8	5µl
RNase-free Water	4µl
RP-V IC 2	1µl
Volume total kit por poço	15µl
Amostra	5µl
Volume total do ensaio por poço	20µl

- Posteriormente a montagem da placa de RT-qPCR é necessário programar o equipamento quanto a sua termociclagem e aos nomes dos alvos da PCR (genes).

Tabela 6: Perfil térmico

Etapa	N.º de ciclos	Temperatura	Duração
1	1	50°C	20 min
2		95°C	15 min
3	45	95°C	10 seg
4*		60°C	30 seg
5		72°C	10 seg

Referência

Manual Allplex™ SARS-CoV-2 Assay.

Aprovação: Gestão de Qualidade – LBA/HCFMB	Aprovação: Responsável Técnico – LBA/HCFMB
--	--

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n - Unesp - Campus de Botucatu CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6154 RAMAL 210	Pág.: 21
		Emissão:
		Revisão nº:
		Última Revisão:
NOVO PROTOCOLO DIAGNÓSTICO PARA SARS-COV-2 USANDO A SALIVA COMO MATERIAL BIOLÓGICO		
8. ANÁLISE DOS RESULTADOS (IN HOUSE)		

❖ ANÁLISE DOS RESULTADOS (IN HOUSE)

Análise do resultado para: presença ou ausência de SARS-CoV-2.

Método:

São considerados resultados válidos aqueles que obedecerem aos seguintes critérios:

- As amostras e o controle positivo deveriam apresentar Ct menor ou igual a 35 e o controle negativo valor de Ct não determinado para o gene do controle interno (IC);
- As amostras que não obedecerem ao critério de amplificação para o gene do controle interno (IC) serão extraídas novamente e caso falhe novamente, poderia ser solicitado nova amostra.
- Se o controle negativo da RT-qPCR amplificar o gene IC, todas as amostras na mesma placa deveriam ser amplificadas novamente.
- Caso o gene E não amplifique no controle positivo todas as amostras que não amplificaram o gene E devem ser repetidas.
- O Sars-CoV-2 será considerado detectado se: o Ct para o Gene E, Gene N e Gene RdRp for menor ou igual a 40,0 (pelo menos 2 genes com CT ≤40 simultaneamente). Amostras com Ct igual ou maior que 40,1 serão consideradas não detectadas para Sars-CoV-2.

Referência

(Laboratório de Biologia Molecular, 2022)

Aprovação: Gestão de Qualidade – LBA/HCFMB	Aprovação: Responsável Técnico – LBA/HCFMB
--	--

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n - Unesp - Campus de Botucatu CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6154 RAMAL 210	Pág.: 22
		Emissão:
		Revisão nº:
		Última Revisão:
NOVO PROTOCOLO DIAGNÓSTICO PARA SARS-COV-2 USANDO A SALIVA COMO MATERIAL BIOLÓGICO		
REFERÊNCIAS		

Referências

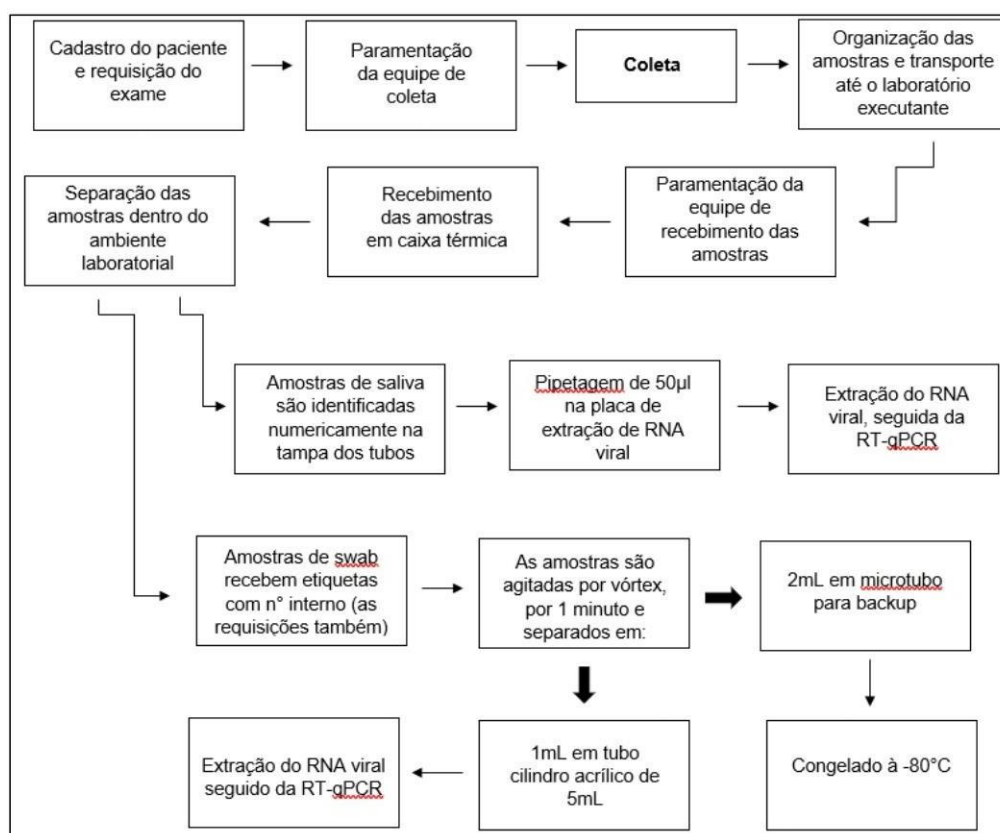
- Laboratório de Biologia Molecular. (2021). *INSTRUÇÕES PARA COLETA DA AMOSTRA RASTREAMENTO COVID-19 (POOL)*.
- LOCCUS. (n.d.). *Manual de Instruções - EXTRACTA 96 Extrator/purificador automatizado de DNA e RNA*.
- Segurança e saúde no trabalho em serviços de saúde. (2022). *Norma regulamentadora nº32*.
- UNISCIENCE. (n.d.). *Manual de Instruções - Sistema de purificação automática de Ácidos Nucleicos - Unixtractor uni-E191*.
- Manual Allplex™ SARS-CoV-2 Assay.
- SEEGENE.(n.d). Allplex™ SARS-CoV-2 Assay (Cat. Nº RV10247Y).

Aprovação: Gestão de Qualidade – LBA/HCFMB	Aprovação: Responsável Técnico – LBA/HCFMB
--	--

	HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – UNESP LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA - LBA Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro s/n - Unesp - Campus de Botucatu CEP. 18618-687 – BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL TEL. (14) 3811-6154 RAMAL 210	Pág.: 23
		Emissão:
		Revisão nº:
		Última Revisão:
NOVO PROTOCOLO DIAGNÓSTICO PARA SARS-COV-2 USANDO A SALIVA COMO MATERIAL BIOLÓGICO		
ANEXOS		

ANEXOS

Anexo A – Fluxograma da rotina diagnóstica do LBA na COVID-19.



Aprovação: Gestão de Qualidade – LBA/HCFMB

Aprovação: Responsável Técnico – LBA/HCFMB