

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
BACHARELADO EM BIOMEDICINA**

VYTOR LUCAS CAVALCANTI BELARMINO

**ESTABILIDADE DO RNA DO SARS-CoV-2 OBTIDO DE AMOSTRAS DE SALIVA AO
ARMAZENAMENTO POR LONGO PERÍODO**

JOÃO PESSOA

2023

VYTOR LUCAS CAVALCANTI BELARMINO

**ESTABILIDADE DO RNA DO SARS-CoV-2 OBTIDO DE AMOSTRAS DE SALIVA AO
ARMAZENAMENTO POR LONGO PERÍODO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal
da Paraíba (UFPB) como requisito
para obtenção do título de Bacharel
em Biomedicina.

Orientadora: Naiara Naiana Dejana

JOÃO PESSOA

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

B426e Belarmino, Vytor Lucas Cavalcanti.

Estabilidade do RNA do SARS-CoV-2 obtido de amostras de saliva ao armazenamento por longo período / Vytor Lucas Cavalcanti Belarmino. - João Pessoa, 2023.
28 f. : il.

Orientadora : Naiara Naiana Dejani.
TCC (Graduação) - UFPB/CCS.

1. SARS-CoV-2. 2. Estabilidade de RNA. 3. Saliva. I. Dejani, Naiara Naiana. II. Título.

UFPB/CCS

CDU 616.2

FOLHA DE APROVAÇÃO

VYTOR LUCAS CAVALCANTI BELARMINO

**ESTABILIDADE DO RNA DO SARS-CoV-2 OBTIDO DE AMOSTRAS DE SALIVA AO
ARMAZENAMENTO POR LONGO PERÍODO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal
da Paraíba (UFPB) como requisito
para obtenção do título de Bacharel
em Biomedicina.

DATA DE APROVAÇÃO 19/10/2023

BANCA EXAMINADORA

NAIARA NAIANA DEJANI

Naiara N. Dejani

ASSINATURA

DOUTORA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

FABRINE FELIPE HILÁRIO

Fabrine Felipe Hilário

ASSINATURA

MESTRE

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

FRANCISCO ALLYSSON ASSIS FERREIRA GADELHA

Francisco Allysson Assis Ferreira Gadelha

ASSINATURA

MESTRE

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

AGRADECIMENTOS

O seguinte trabalho contou com a ajuda direta e indireta de diversas pessoas, que gostaria de prestar minha mais profunda gratidão.

Primeiramente agradeço a Deus por ter permitido e abençoado o meu caminho até agora durante meu curso e possibilitar minha chegada até aqui.

A Marlineide de Andrade Cavalcanti Belarmino e Walber Alves Belarmino, meus pais e primeiros educadores, que fizeram o possível para que todo o estudo e conforto estivessem disponíveis para mim, sempre me colocando em primeiro lugar.

A Kamana Beatriz Ramos Basílio de Sousa, hoje minha namorada, futura esposa e companheira de vida, que esteve e está ao meu lado durante toda esta caminhada, que comemorou minhas vitórias e trouxe auxílio nos momentos difíceis, muitas conquistas minhas são compartilhadas com ela.

A Letícia Cavalcanti Belarmino e Miguel Cavalcanti Belarmino, meus irmãos menores que mesmo sem saber são uma parcela importante da minha felicidade e graças a eles pude lutar todos os dias para me tornar um exemplo de sucesso e gratidão na vida.

A Manoel Guedes Cavalcante e Valdete de Andrade Cavalcante, meus avós e por toda minha vida meus segundos pais, que em sua individualidade, carisma, paixão pela vida e cumplicidade puderam me mostrar ao que ser grato durante minha caminhada.

As minhas tias e tios pela contribuição a cada momento da minha vida e fazer parte de quem sou.

A professora Dra. Naiara Naiana Dejani, que além de orientadora se tornou um exemplo de profissional e ser humano para mim, que me guiou durante três anos com maestria, me ensinando ao longo desse tempo tudo o que pôde.

Ao Laboratório de Biologia Molecular da UFPB e toda sua equipe técnica, por abrir as portas e agregar ao meu conhecimento.

Ao Laboratório de Imunofarmacologia e todos os participantes, por compartilharem tantos conhecimentos.

A Universidade Federal da Paraíba, por disponibilizar os recursos para a finalização do meu curso.

RESUMO

Os vírus são microrganismos intracelulares obrigatórios, dentre eles está o SARS-CoV-2 causador da pandemia de Covid-19. Durante esse período o diagnóstico precoce se tornou essencial, para iniciar as medidas de tratamento de forma rápida. Foi estabelecida a reação em cadeia da polimerase de transcriptase reversa em tempo real como o padrão-ouro dos testes para esse vírus. As principais amostras são swab nasofaríngeo e/ou orofaríngeo, porém também foi utilizado a saliva como uma amostra para detectar o vírus. Muito ainda se discute sobre o SARS-CoV-2, uma delas é a estabilidade do RNA viral. O seguinte trabalho tem como propósito analisar a literatura sobre a estabilidade do RNA do SARS-CoV-2 extraído de amostras de saliva e armazenado por longo período. Após as pesquisas nas bases de dados e utilizando os descritores predefinidos, chegamos a um total de 239 artigos, que após serem filtrados com os critérios de inclusão e exclusão restaram 6. Foi visto que o RNA viral tem capacidade de permanecer estável entre três à noventa e dois dias dependendo das condições de armazenamento das amostras, no entanto, a literatura não apresentou pesquisas com períodos mais longos como meses ou anos de análise da sua estabilidade.

Palavras-Chave: SARS-CoV-2; estabilidade de RNA; saliva.

ABSTRACT

Viruses are obligate intracellular microorganisms, among which the SARS-CoV-2 virus, responsible for the Covid-19 pandemic, is included. During this period, early diagnosis has become imperative to initiate treatment measures promptly. Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction has been established as the gold standard for testing this virus. The primary specimens used are nasopharyngeal and/or oropharyngeal swabs, but saliva has also been employed as a sample for viral detection. Considerable discourse persists concerning SARS-CoV-2, including discussions on the stability of viral RNA. This study aims to scrutinize the literature on the stability of SARS-CoV-2 RNA extracted from saliva samples and stored for extended periods. Following an extensive search across databases and the application of predefined descriptors, we initially identified 239 articles. After filtering them through inclusion and exclusion criteria, only six remained. Our findings indicate that viral RNA can maintain stability for a range of three to ninety-two days, contingent upon the storage conditions of the samples. However, it is noteworthy that the literature lacks investigations into longer periods, such as months or years, regarding the analysis of its stability

Keywords: SARS-CoV-2; RNA stability; saliva

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do SARS-CoV-2	13
Figura 2 – Fluxograma relacionado aos resultados das bases de dados	19
Figura 3 – Estabilidade do RNA do SARS-CoV-2 após extração da saliva	20
Figura 4 – Estabilidade do RNA do SARS-CoV-2 na saliva	22
Figura 5 – Estabilidade do RNA do SARS-CoV-2 com meios de estabilização na saliva .	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA	DNA complementar
COVID-19	Coronavírus 2019
Ct	<i>Cycle threshold</i>
E	Envelope
ECA-2	Enzima conversora de angiotensina 2
ESPII	Emergência de saúde pública de importância nacional
H7N9	<i>Influenza A</i>
Kb	Quilobases
M	Membrana
MERS-CoV	Coronavírus da síndrome respiratória aguda do Oriente Médio
N	Nucleocapsídeo
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase de transcriptase reversa em tempo real
S	<i>Spike</i>
SARS-CoV	Coronavírus da síndrome respiratória aguda
SARS-CoV-2	Coronavírus da síndrome respiratória aguda 2

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 Coronavírus	12
2.2 SARS-CoV-2	12
2.3 Métodos diagnósticos do SARS-CoV-2	14
2.4 Utilização da saliva como amostra útil ao diagnóstico da COVID-19	15
2.5 Coleta e armazenamento de amostras de saliva	16
3 OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo geral	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
5.1 Estabilidade do RNA do Sars-CoV-2.....	20
5.2 Estabilidade com meios de estabilização.....	22
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	24
REFERÊNCIAS	25

1 INTRODUÇÃO

Os vírus são microrganismos de estrutura simples que não possuem maquinaria para a produção de proteínas. Assim necessitam de funções e do metabolismo celular do hospedeiro para se multiplicar, logo, só conseguem ter atividade biológica no interior de uma célula viva, dessa forma são parasitas intracelulares obrigatórios. A partícula viral é constituída basicamente por um material genético (DNA ou RNA) protegido pelo capsídeo, em alguns vírus mais complexos também haverá a presença de um revestimento externo, denominado de envelope, e ambos possuem função de proteger o genoma de possíveis danos (Flores, 2007).

Os vírus são nomeados e classificados conforme hierarquia taxonômica (ordem, família, subfamília, gênero, espécie), dentre esses está a família *Coronaviridae*, que causa uma variedade de doenças tanto em humanos, quanto em animais. Os vírus dessa família são envelopados, possuem projeções com formato de espícula formadas pela proteína *spike* (S) e seu material genético, é um RNA de fita simples com sentido positivo. Com espécies dessa família já conhecidos, como o SARS-CoV e o MERS-CoV por causarem doenças graves em humanos. Em 2019 surgiu o primeiro caso oficial de Covid-19 em Wuhan, na China, causada pelo SARS-Cov-2, também capaz de causar doença grave (Gruber, 2020).

O vírus SARS-CoV-2 foi o causador da pandemia do ano de 2020, em que o teste de diagnóstico específico para identificação de forma precoce se tornou essencial, com finalidade de confirmar casos suspeitos. Para atingir esse objetivo, a reação em cadeia da polimerase de transcriptase reversa em tempo real (RT-qPCR) mostrou-se eficaz para detectar o RNA extraído de amostras da nasofaringe (Corman; et al., 2020). Porém, por ser um método invasivo para o paciente e perigoso para o profissional de saúde se fez necessário método menos invasivo e seguro, para isso foi sugerido o diagnóstico salivar, que pode ser obtido com mínimo desconforto e de forma segura (Fernandes; et al., 2020).

A pandemia gerada pelo SARS-CoV-2 em 2020 causou incontáveis danos, e por ser relativamente novo ainda há características não totalmente abordadas e que necessitam ser estudadas. Durante esse período foi essencial encontrar formas rápidas e eficazes para detecção viral, dentre elas a detecção de RNA viral em saliva de pacientes, que se mostrou de alta sensibilidade. Logo, investigar a estabilidade do RNA do SARS-CoV-2 em amostras de saliva terá importância para futuramente direcionar avaliações retrospectivas, como vigilância genômica,

sobre a circulação de diferentes variantes desse vírus.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Coronavírus

Dentro da ordem *Nidovirales* e da subordem *Coronavirineae* existe a família *Coronaviridae* que é especificado na subfamília *Orthocoronaviridae* que é composta por quatro gêneros *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus*, os dois primeiros infectam de forma exclusiva espécies de mamíferos, e os dois últimos possuem amplo espectro de hospedeiros. Quando acometem seres humanos ou animais o principal resultado são doenças respiratórias e entéricas (V'kovski, 2021).

Os coronavírus responsáveis por infecção em humanos, como HCoV-229E e HCoV-HKU1 já são conhecidos e causam infecções no trato respiratório sazonais e leves (V'KOVSKI, 2021). Não eram considerados altamente patogênicos para humanos, até o ano de 2002, quando aconteceu a síndrome respiratória aguda, causada pelo SARS-CoV, após isso no ano de 2012 com o coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), capazes de infectar células epiteliais brônquicas, pneumócitos e células do trato respiratório superior em humanos (Cui; Li; Shi, 2018).

No entanto, de acordo com a Organização Mundial da Saúde em 11 de março de 2020 foi caracterizada uma pandemia causada por um novo vírus da família *Coronaviridae*, o coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2), que apenas no dia 5 de maio de 2023 que a OMS declarou o fim da Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII) referente à COVID-19.

2.2 SARS-CoV-2

No final do ano de 2019, surgem os primeiros casos de coronavírus 2019 (COVID-19), apresentando manifestações clínicas como febre, dispneia, tosse, mialgia, fadiga e entre outros, podendo evoluir para patologias respiratórias graves com lesões pulmonares. O vírus responsável por essa condição é o coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (Fig. 1), que possui o ácido ribonucleico (RNA) de fita simples e sentido positivo (5'-3'). Este faz parte do gênero

Betacoronavirus, é envelopado e está relacionado filogeneticamente tanto ao SARS-CoV, quanto ao MERS-CoV (Reis; Santos, 2020).

Figura 1 – Estrutura do SARS-CoV-2

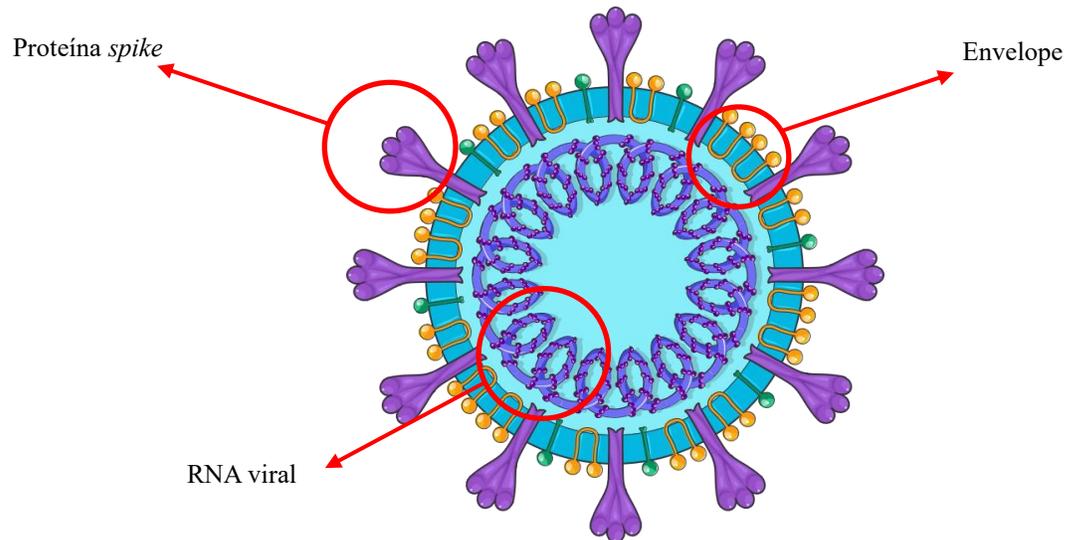


Fig. 1 – Estrutura da partícula viral do SARS-CoV-2.

Fonte: Produzido pelo autor (2023).

O genoma viral é responsável por codificar duas classes principais de proteínas, que são as estruturais e as não-estruturais. As proteínas não-estruturais geralmente possuem atividade enzimática ou regulatória e participam do ciclo replicativo viral, já as estruturais são aquelas que participam da arquitetura em si da partícula vírica (Flores, 2007). Dentre as proteínas estruturais do SARS-CoV-2 a proteína *spike* (S) é de extrema importância para a função viral, sendo responsável por reconhecer o alvo, entrar na célula e realizar o escape endossomal, e responsável pela aptidão aprimorada em muitas variantes da SARS-CoV-2 (Magazine, 2022).

Um RNA de cadeia grande, com comprimento de aproximadamente 30Kb (quilobases), sentido positivo (5'-3') e não fragmentado é o genoma do SARS-CoV-2, que será responsável por codificar 29 proteínas, dentre elas 25 não-estruturais e acessórias e 4 estruturais. Os dois terços proximais 5' do genoma codifica ORF1a e ORF1b, o outro terço 3' codifica várias ORFs que entre esses quatro que codificam as proteínas estruturais: *spike* (S), membrana (M), envelope (E) e nucleocapsídeo (N). A proteína N participando na ligação e empacotamento do RNA (Wu; *et al.*, 2022).

No estágio inicial da infecção o SARS-CoV-2 tem como alvo as células epiteliais nasais, brônquicas e pneumócitos, que através da sua proteína S se liga à enzima conversora de angiotensina 2 (ECA-2), que inicia a fusão de membranas e permite a entrada do vírus na célula-alvo. A média do período de incubação viral é de 5 dias, em que serão apresentadas diversas manifestações clínicas como febre, tosse seca, falta de ar, fadiga, náusea/vômito, diarreia e mialgia. Além desses podem apresentar sintomas não tão clássicos, como disfunções olfativas e/ou gustativas. Podendo levar a complicações como função prejudicada dos pulmões, cérebro, rins e sistema de coagulação (Wiersinga; *et al.*, 2020).

Em estudo realizado por Huang e colaboradores, foi avaliado e confirmado o tropismo tecidual do SARS-CoV-2 para glândulas salivares menores e parótidas, que possuem células permissivas, em que o RNA mensageiro (RNAm) viral foi encontrado diversas vezes em ductos e ácinos que expressam a ECA-2, além disso foi possível comprovar que além de ser possível a infecção do vírus nessa região ela também suporta a sua replicação. Dessa maneira explicando a presença do SARS-CoV-2 na saliva de pacientes infectados.

2.3 Métodos diagnósticos do SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 se espalhou por quase todos os países do globo e foi identificado como o causador da doença COVID-19, o primeiro passo para o seu gerenciamento foi a detecção rápida e precisa desse vírus nos indivíduos. São diversos os meios de detecção, como teste sorológico SARS-CoV-2 que possuem anticorpos específicos para o vírus, os testes radiográficos (radiografia de tórax, tomografia computadorizada de raios-X, ultra-som pulmonar) que sozinhos ou em conjunto podem classificar a fase da infecção por SARS-CoV-2. Como padrão-ouro se estabeleceu a reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa em tempo real (RT-qPCR) que detecta o material genético viral de forma sensível, precisa e específica através de coleta com *swab* orofaríngeo ou nasogaríngeo e os testes de saliva, onde também pode ser realizada a RT-qPCR (Kevadiya; *et al.*, 2021).

A pandemia causada pelo SARS-CoV-2 representou um grande problema de saúde pública e um desafio para os laboratórios, enquanto não havia um método de prevenção ou tratamento um

dos principais objetivos era o diagnóstico laboratorial confiável e precoce. A RT-qPCR é rotineiramente utilizado para detecção de vírus nas infecções respiratórias agudas, que causem secreções respiratórias (Corman; *et al.*, 2020).

De acordo com Corman e colaboradores (2013) para identificação de forma mais rápida e emergencial de vírus causador de processos patológicos pode ser utilizada a reação em cadeia da polimerase de transcriptase reversa em tempo real (RT-qPCR), que foi possível identificar genes-alvo da cepa *influenza A* (H7N9) em caso de suspeita de infecção humana. Tendo isso em vista, Corman *et al.* (2020) descreveram o estabelecimento de um fluxo de trabalho para diagnóstico do SARS-CoV-2, em que o RT-qPCR foi altamente sensível para os ensaios do gene E, do gene RdRp e do gene N, sendo possível identificar o vírus através desse método.

A RT-qPCR é o ensaio globalmente utilizado para detectar o RNA do SARS-CoV-2, sendo capaz de detectar e medir quantidades de ácidos nucleicos em diferentes tipos de amostras. Ao realizar essa técnica o indicador de amplificação do RNA viral é conhecido como ciclo de quantificação ou *cycle threshold* (Ct), que representa o ciclo de amplificação que irá cruzar a linha limite programada dependendo da marca específica do termociclador em tempo real (Sule; Oluwayelu; *et al.*, 2020).

O procedimento da RT-qPCR ocorre após coleta de amostra biológica do paciente, o RNA será extraído do fluido que contém as partículas virais e células infectadas, o RNA será transcrito reversamente para DNA complementar (cDNA) e amplificado (para detectar os ácidos nucleicos), as regiões conservadas dos genes-alvo são amplificadas com uma sonda fluorogênica, em casos positivos irá ultrapassar o limiar de detecção (quantificado o Ct) (Kevadiya; *et al.*, 2021).

2.4 Utilização da saliva como amostra útil ao diagnóstico da COVID-19

Para detecção rápida e precisa é usado *swab* orofaríngeo ou nasofaríngeo, para coletar amostra do trato respiratório superior, porém é uma técnica que causa desconforto no paciente, podendo causar dor, espirros e até mesmo sangramento, além disso requer proximidade entre profissional de saúde e paciente. Em contraponto as amostras de saliva podem ser feitas a partir da auto coleta, sem necessidade de desconforto e minimizando a exposição dos profissionais e

podem ser coletadas apenas em frasco estéril, diferente da coleta com o *swab* que requer uma quantidade maior de materiais, como o tubo *falcon* e o *swab* propriamente dito (To *et al.*, 2020).

Em estudo realizado por To e colaboradores (2017) foi comprovado que amostras de saliva possuem concordância superior a 90% com os resultados de amostras na detecção de vírus respiratórios, dentre eles estava o coronavírus. Outro estudo realizado por Wyllie e colaboradores (2020), foram utilizadas amostras de saliva de pacientes internados com COVID-19 e utilizada a metodologia da RT-qPCR e de 1-5 dias 81% das amostras foram positivas, semelhante a sensibilidade da amostra nasofaríngea (95%).

A saliva é um fluido biológico e foi descoberto que o tempo de eliminação do vírus varia de acordo com a amostra corporal, logo o RNA viral pode ser detectável em períodos diferentes nas amostras (Fernandes *et al.*; 2020). Pode ser utilizada também como amostra alternativa para testagem de antígenos e anticorpos que é uma fonte com sensibilidade para a detecção de SARS-CoV-2. Porém, quando a somente saliva não é coletada e contém secreção pulmonar, pode se tornar uma amostra de difícil manuseio. Ainda há poucos estudos sobre a estabilidade do RNA da COVID-19 na saliva, por isso são utilizados tampões para estabilização do ácido nucleico (Ott; 2021).

2.5 Coleta e armazenamento de amostras de saliva

Em estudo realizado por Williams e colaboradores (2020) foram utilizadas amostras de saliva tanto pura, quanto com diferentes meios de transporte e mantidas armazenadas por um período de 7 dias e sob duas diferentes temperaturas, à 4°C e temperatura ambiente. Através da pesquisa gênica por meio da RT-qPCR foi possível a detecção dos genes do SARS-CoV-2 nos dois casos de armazenamento.

Em outro ensaio feito por Alfaro-Nuñez e colaboradores (2021) foram testados *swabs* secos e *swabs* com saliva sem acréscimo de meio de transporte ou de estabilização em três temperaturas diferentes: -20°C, 4°C e 20°C por 1, 3, 5, 8, 9, 15 e 26 dias e analisados por RT-qPCR. Foi observado que essas amostras podem ser armazenadas por pelo menos 9 dias, se armazenadas a 20°C, e por até 26 dias a -20°C e a 4°C, sem afetar significativamente os resultados da RT-qPCR. Vale salientar também que a coleta adequada e o armazenamento das amostras de saliva irão influenciar na estabilidade do RNA viral.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar a descrição da estabilidade do RNA do SARS-CoV-2 extraído de amostras de saliva e armazenados por dias, meses e anos.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar pesquisas em bases de dados pré-definidas, entre os meses de outubro de 2022 a setembro de 2023;
- Descrever os principais achados da estabilidade do RNA do SARS-CoV-2 extraídos de amostras de saliva armazenado por longo período;
- Analisar os dados de estudos que trabalham com curto (dias), médio (meses) e longo prazo (anos) a partir do ano de 2020 até setembro de 2023 sobre a estabilidade do RNA do SARS-CoV-2 obtido de amostras de saliva.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

As buscas bibliográficas foram realizadas em cinco bases de dados: PubMed, CAPES, SciELO, EMBASE e LILACS. Como critérios de inclusão, foram usados os artigos originais e indexados publicados a partir de 2020 até setembro de 2023, que estejam disponíveis de forma íntegra e gratuita e nas línguas Português, Inglês e Espanhol. No entanto, artigos científicos publicados anteriormente ao período proposto e que adicionaram importantes informações para a revisão foram considerados, após análise criteriosa. Como critérios de exclusão foram retiradas as referências duplicadas, artigos que não estivessem nas línguas supracitadas, artigos pagos e artigos que após leitura do título e resumo não se encaixassem no tema sugerido.

Para a realização das buscas nas bases de dados, foram usados os seguintes descritores: *Stability and SARS-CoV-2 and Saliva*, sendo utilizado o operador booleano *AND* entre cada descritor, com finalidade de refinar as buscas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao fim das pesquisas, foi possível encontrar um total de 239 artigos quando somada a quantidade de cada resultado nas bases de dados. Após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão restaram um total de 6 artigos que se encaixam ao tema proposto, mostrado na Figura 2.

Figura 2 – Fluxograma relacionado aos resultados das bases de dados

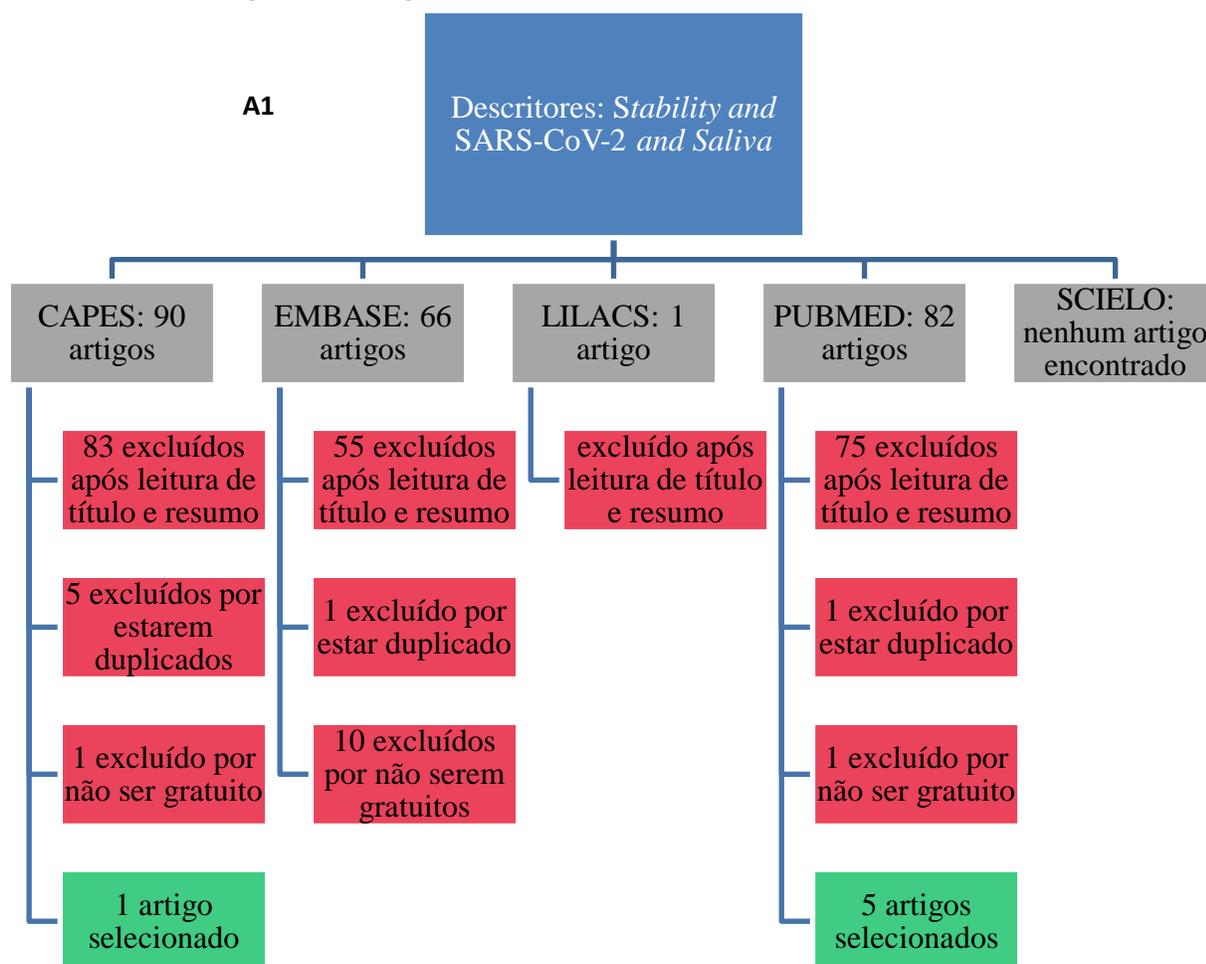


Fig. 2 - Fluxograma responsável por identificar a quantidade de artigos que foram incluídos ou excluídos de cada base de dado pesquisada a partir dos seguintes descritores: *Stability and SARS-CoV-2 and Saliva*. Fonte: Produzido pelo autor (2023).

5.1 Estabilidade do RNA do Sars-CoV-2

Em pesquisa realizada por Ott e colaboradores (2021), com finalidade de estudar a estabilidade do SARS-CoV-2 em saliva sem adição de suplementos com o decorrer do tempo, a detecção do RNA (gene N1) não mudou após um ciclo de congelamento e descongelamento em -80°C , 3 dias a 30°C ou 5 dias a temperatura ambiente (19°C) quando comparados a amostra fresca. Após isso, o RNA foi extraído e quantificado pelo método RT-qPCR, que permaneceu estável por até 21 dias quando armazenados a 4°C , 25 dias em temperatura ambiente, no máximo 16 dias a 30°C e 92 dias quando congelado a -80°C , valores representados na Figura 3.

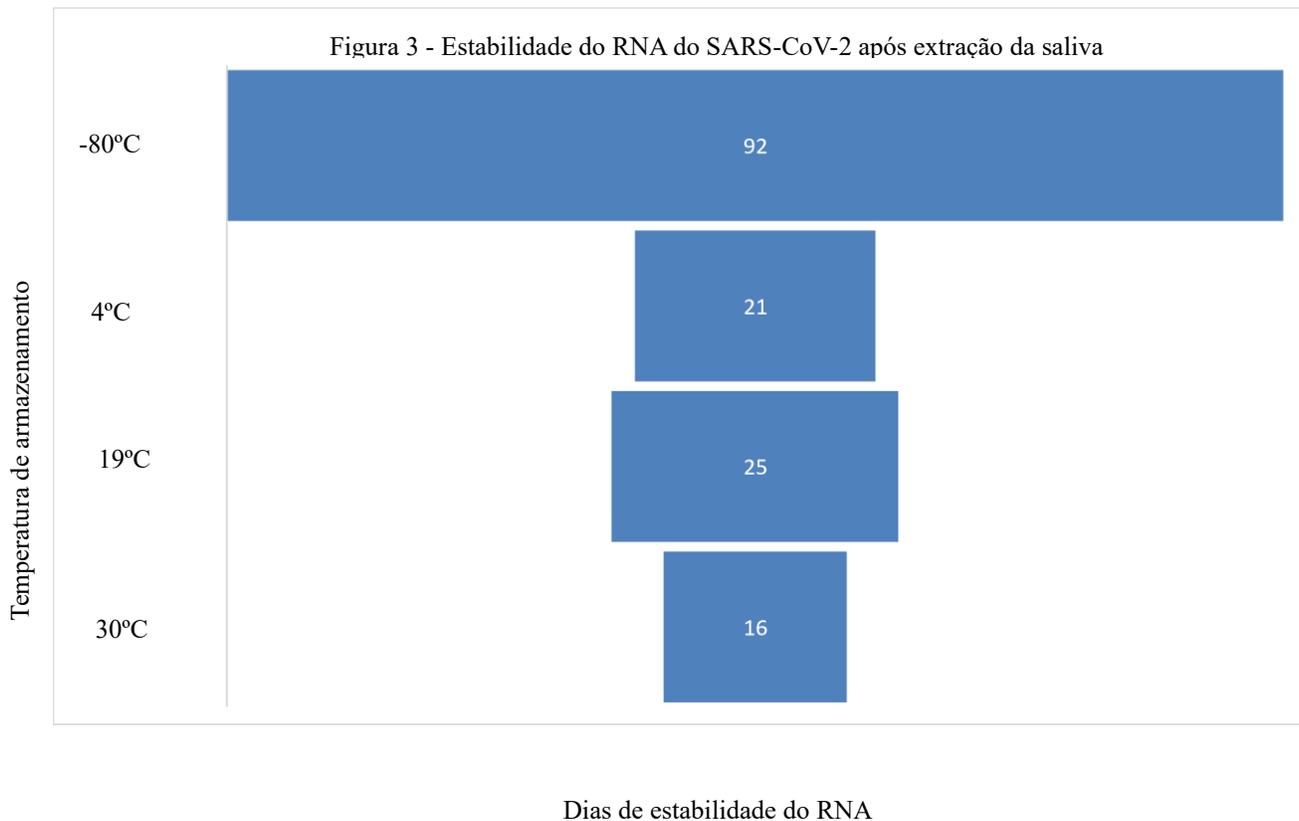


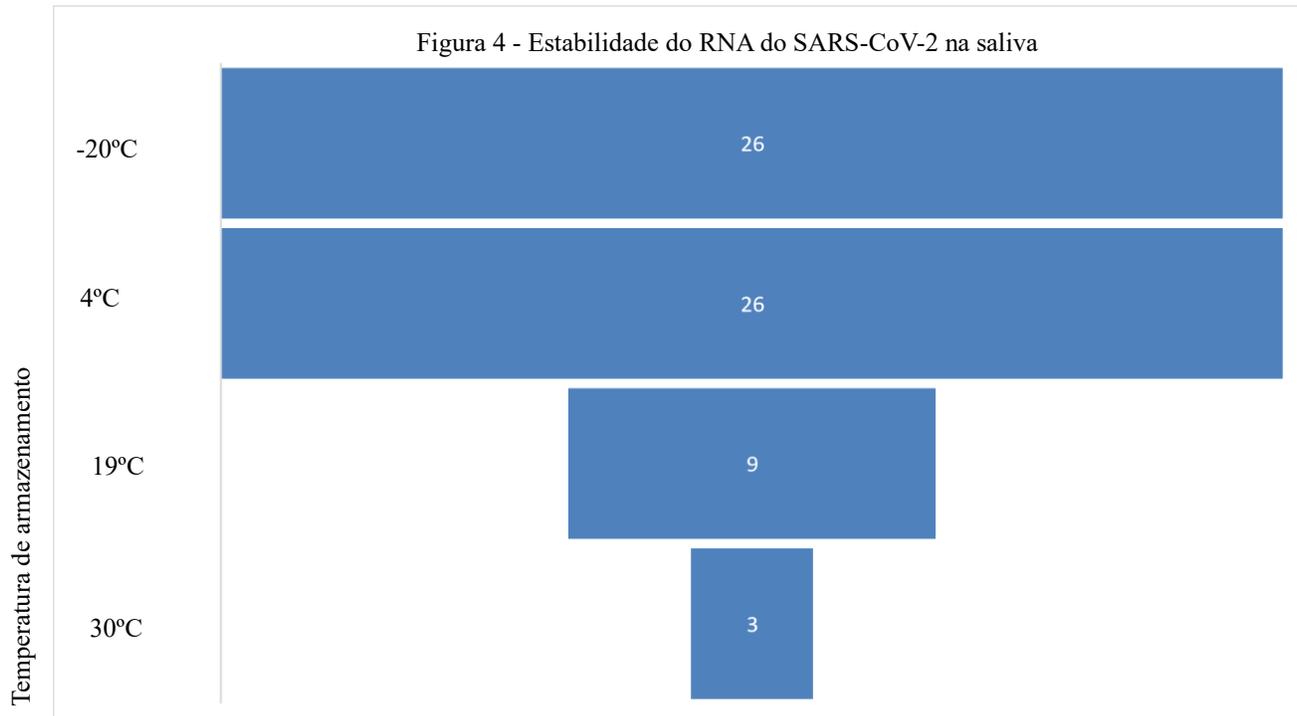
Fig. 3 – Quantidade de dias que o RNA permaneceu estável após extraídos da saliva, sem acréscimo de meios de transporte para estabilização do material genético, em diferentes temperaturas. Fonte: Produzido pelo autor (2023).

Já em outro estudo foi avaliada a estabilidade do RNA do SARS-CoV-2 em *swabs* com saliva e infectados com o vírus, em que nenhum meio de transporte ou estabilização foi adicionado. Foram submetidos a diferentes temperaturas (-20°C, 4°C e 20°C) durante 1, 3, 5, 8, 9, 15 e 26 dias e analisados por RT-qPCR. Dessa forma, nenhuma variação significativa de Ct ocorreu, exceto na temperatura de 20°C após o dia 9, que aumentou seu Ct (diminuição na concentração de cópias virais), com isso foi possível observar uma correlação da estabilidade viral com temperaturas mais baixas, que com o passar do tempo os valores de Ct da saliva permaneceram baixos, qualificando um ambiente mais duradouro para sobrevivência do RNA viral, durante os 9 primeiros dias (Alfaro-Núñez *et al.*, 2022).

Outra análise foi responsável por expor alíquotas de amostras de saliva as seguintes temperaturas: 4°C, 20°C e 30°C durante 2, 3 e 7 dias e -80°C para armazenamento. Por meio da RT-qPCR foi possível demonstrar que o vírus SARS-CoV-2 permaneceu estável durante período de transporte de até 7 dias de 20 até 30°C ou por 3 dias até 30°C na saliva tanto de adultos quanto de crianças (Veguilla *et al.*, 2022).

Em um estudo de caso-controle utilizou-se a auto-coleta e foi realizada a metodologia de RT-qPCR em amostras de saliva de pacientes que portavam o SARS-CoV-2. Foram avaliadas sob temperatura ambiente (20°C) e em condição de refrigeração (4°C), após isso foram guardadas por 5 dias na mesma temperatura ambiente e por 9 dias a 4°C. Por fim, foi possível identificar que não houve alteração no Ct das amostras positivas para o SARS-CoV-2, indicando que se armazenado a temperatura certa e analisado dentro do tempo apropriado não ocorre alteração na interpretação do teste (Choi *et al.*, 2022).

O máximo de dias em que o RNA do SARS-CoV-2 permaneceu estável na saliva nas diferentes temperaturas testadas pelos estudos está representado na Figura 4.



Dias de estabilidade do RNA

Fig. 4 – Quantidade de dias que o RNA permaneceu estável na saliva dos pacientes, sem acréscimo de meios de transporte para estabilização do material genético, em diferentes temperaturas. Fonte: Produzido pelo autor (2023).

5.2 Estabilidade com meios de estabilização

Griesemer e colaboradores (2021) utilizaram saliva infectada com o vírus SARS-CoV-2, com o intuito de avaliar a estabilidade deste e se há necessidade de soluções estabilizadoras para preservação do vírus na saliva. Foi testada apenas a saliva, saliva junto com um tampão de estabilização em diferentes temperaturas (4°C, 20°C e -80°C) durante 0, 1, 3, 5 e 7 dias e testados por RT-qPCR. Nenhum benefício foi comprovado quando adicionados estabilizadores à saliva, o Ct permaneceu inalterado por apenas 7 dias à temperatura ambiente. A adição de soluções teve efeitos adversos, perdendo também a estabilidade no sétimo dia, no entanto, vale salientar que são destinadas a estabilização de DNA e não RNA.

Além disso, outra pesquisa coletou diferentes amostras de um mesmo caso positivo

para SARS-CoV-2 em que metade foi armazenada a 4°C e a outra em temperatura ambiente. Após 8 horas os dois grupos foram divididos em três cada um e misturados 1:1 com o tampão 1, com o tampão 2 e outra foi mantida como saliva pura. Foi pesquisado o vírus através da RT-qPCR nos 2 primeiros dias, uma vez por dia nos 3 dias subsequentes e uma última vez no dia 9. A estabilidade do RNA foi diferente de acordo com o tampão utilizado, em que o tampão 1 após 3 dias a temperatura ambiente não foi possível detectar nenhum gene específico do vírus e a 4°C a partir do dia 2 os genes já não eram mais detectáveis. O tampão 2 garantiu a alta estabilidade do RNA durante os 9 dias em ambas as temperaturas testadas e a saliva pura apresentou alta estabilidade independente da temperatura (Clemmensen *et al.*, 2022).

O máximo de dias em que o RNA do SARS-CoV-2 permaneceu estável na saliva nas diferentes temperaturas e com os tampões testados pelos estudos está representado na Figura 5.

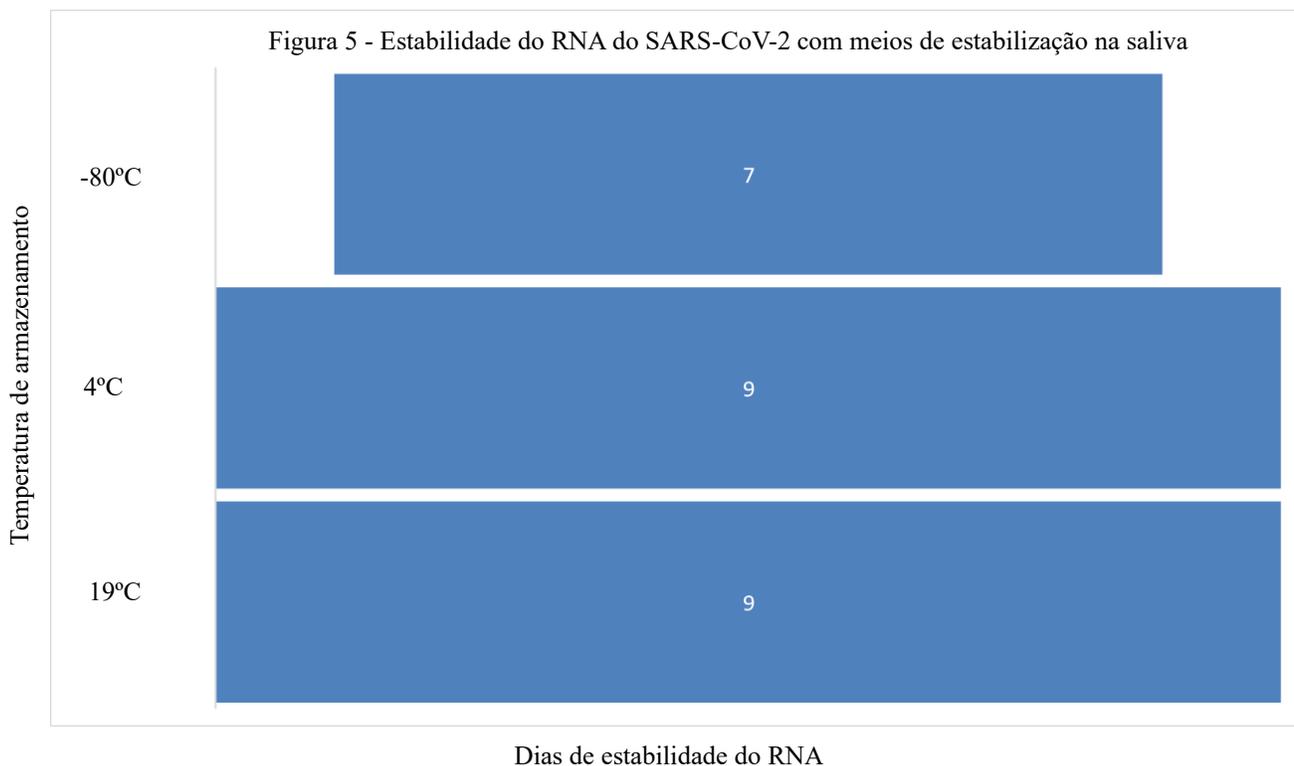


Fig. 5 – Quantidade de dias que o RNA permaneceu estável na saliva dos pacientes, com acréscimo de meios de estabilização do material genético, em diferentes temperaturas. Fonte: Produzido pelo autor (2023).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O SARS-CoV-2 foi o responsável por causar a pandemia que teve início no ano de 2020, tendo o “ponto de partida” a China e em pouco tempo conseguiu chegar em quase todo o globo. Por isso se tornou o principal problema de saúde daquele ano. Motivada por isso, a comunidade científica iniciou uma corrida contra o tempo tendo a intenção de amenizar os danos causados e controlar o vírus. Para isso, a medida inicial foi como diagnosticá-lo, e a metodologia da RT-qPCR de *swab* nasofaríngeo ou orofaríngeo se estabeleceu como padrão-ouro na sua identificação.

Com o passar do tempo, a saliva também foi cogitada como uma amostra eficaz na pesquisa viral, dessa forma amenizando o desconforto, os possíveis danos da coleta com o *swab* e a proximidade entre paciente e profissional da saúde. A partir disso a saliva se tornou alvo de diferentes estudos, com intuito de confirmar ser uma amostra viável para o diagnóstico da Covid-19. Essa se tornou uma amostra importante durante o tempo da pandemia, por isso se faz necessário entender as características quanto a estabilidade do vírus do SARS-CoV-2 neste tipo de amostra.

Com isso, o atual estudo se propôs a identificar na literatura do ano de início da pandemia até os dias atuais se há estabilidade do RNA do vírus SARS-CoV-2 presente na saliva com o passar do tempo. Durante a pesquisa, foi possível identificar que o RNA desse vírus pode se manter estável por curtos períodos, de 5 a 7 dias em temperatura ambiente (25°C) e até 9 dias caso refrigerado de maneira correta (4°C) e a literatura mostra que por ainda mais tempo quando congelado (-80°C), já que o maior tempo de estabilidade descrito foram 92 dias nessa temperatura, logo, para obter maior tempo e a melhor condição para manter o RNA do SARS-CoV-2 estável quando extraído da saliva é congelado à -80°C sem acréscimo de meio de estabilização.

No entanto não foi encontrado estudos sobre períodos mais longos, como meses ou até mesmo anos, informações importantes para possíveis pesquisas retroativas no futuro, como a vigilância genômica. Somado a isso, também foi visto que quando extraído o RNA do SARS-CoV-2, ele pode se manter por ainda mais tempo estável, com um máximo de 92 dias a temperatura -80°C. Além disso, também foi vista a tentativa de utilizar meios de estabilização junto com a saliva, que tiveram diferentes atividades quanto ao material genético do vírus SARS-CoV-2, mas não houve aumento significativo da estabilidade do RNA, visto que esses estabilizadores são mais utilizados para DNA.

REFERÊNCIAS

ALFARO-NÚÑEZ, A. *et al.* SARS-CoV-2 RNA stability in dry swabs for longer storage and transport at different temperatures. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 69, n. 2, p. 189–194, 1 mar. 2022.

ALVES, B. / O. / O.-M. Novo coronavírus infecta e se replica em células das glândulas salivares **Biblioteca Virtual em Saúde MS**. Disponível em: <<https://bvsmms.saude.gov.br/novo-coronavirus-infecta-e-se-replica-em-celulas-das-glandulas-salivares/>>. Acesso em: 25 abr. 2023.

BRITO, S. B. P. *et al.* **Immunopathological mechanisms involved in SARS-CoV-2 infection. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, , 2020.

CHOI, S. J. *et al.* Diagnostic Performance, Stability, and Usability of Self-Collected Combo Swabs and Saliva for Coronavirus Disease 2019 Diagnosis: A Case-Control Study. **Infection and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 517–528, 1 set. 2022.

CLEMMENSEN, M. DE L. *et al.* Comparison of SARS-CoV-2 Detection from Saliva Sampling and Oropharyngeal Swab. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 5, 26 out. 2022.

CORMAN, V. M. *et al.* Specific detection by real-time reverse-transcription PCR assays of a novel avian influenza A(H7N9) strain associated with human spillover infections in China. **Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin**, v. 18, n. 16, p. 20461, 18 abr. 2013.

CORMAN, V. M. *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. **Eurosurveillance**, v. 25, n. 3, 23 jan. 2020.

CUI, J.; LI, F.; SHI, Z. L. **Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. Nature Reviews Microbiology**Nature Publishing Group, , 1 mar. 2019.

FERNANDES, L. L. *et al.* **Saliva in the Diagnosis of COVID-19: A Review and New Research Directions.** *Journal of Dental Research* SAGE Publications Inc., , 1 dez. 2020.

FERNÁNDEZ-PÉREZ, G. C. *et al.* SARS-CoV-2: what it is, how it acts, and how it manifests in imaging studies. *Radiologia*, v. 63, n. 2, p. 115–126, 1 mar. 2021.

GRIESEMER, S. B., *et al.*, *Evaluation of Specimen Types and Saliva Stabilization Solutions for SARS-CoV-2 Testing.* <https://journals.asm.org/journal/jcm>. 2021.

GRUBER, Arthur. *Jornal da USP. In: Covid-19: O que se sabe sobre a origem da doença.* São Paulo, 14 abr. 2020. Disponível em: <https://jornal.usp.br/artigos/covid2-o-que-se-sabe-sobre-a-origem-da-doenca/>. Acesso em: 25 abr. 2023.

HU, B. *et al.* **Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19.** *Nature Reviews Microbiology* Nature Research, , 1 mar. 2021.

HUANG, N. *et al.* SARS-CoV-2 infection of the oral cavity and saliva. *Nature Medicine*, v. 27, n. 5, p. 892–903, 1 maio 2021.

KEVADIYA, B. D. *et al.* **Diagnostics for SARS-CoV-2 infections.** *Nature Materials.* Nature Research, , 1 maio 2021.

KOJIMA, N. *et al.* Self-Collected Oral Fluid and Nasal Swabs Demonstrate Comparable Sensitivity to Clinician Collected Nasopharyngeal Swabs for Coronavirus Disease 2019 Detection. *Clinical Infectious Diseases*, v. 73, n. 9, p. E3106–E3109, 1 nov. 2021.

MAGAZINE, N. *et al.* **Mutations and Evolution of the SARS-CoV-2 Spike Protein.** *Viruses* MDPI, 1 mar. 2022.

MINISTÉRIO da Saúde. *In: Diagnóstico: Saiba como é feito o diagnóstico dos casos de Covid-19*

no Brasil. [S. l.], 8 abr. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/diagnostico>. Acesso em: 25 abr. 2023.

NYARUABA, R. *et al.* Long-Term Preservation of SARS-CoV-2 RNA in Silk for Downstream RT-PCR Tests. **Analytical Chemistry**, v. 94, n. 10, p. 4522–4530, 15 mar. 2022.

OTT, I. M. *et al.* Stability of SARS-CoV-2 RNA in Nonsupplemented Saliva. **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 4, p. 1146–1150, 2021.

Saliva é promissora para a detecção de SARS-CoV-2 durante os estágios iniciais da infecção. – microbiologando. Disponível em: <<https://www.ufrgs.br/microbiologando/2020/10/21/saliva-e-promissora-para-a-deteccao-de-sars-cov-2-durante-os-estagios-iniciais-da-infeccao/>>. Acesso em: 11 jun. 2023.

SILVA REIS, A. A.; SANTOS, R. DA S. O padrão ouro no diagnóstico molecular na COVID19: O que sabemos sobre a soberania deste método? **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 3, p. 5986–5992, 2020.

SULE, W. F.; OLUWAYELU, D. O. **Real-time RT-PCR for COVID-19 diagnosis: challenges and prospects. The Pan African medical journal**NLM (Medline), , 2020.

TO, K. K. *et al.* Additional molecular testing of saliva specimens improves the detection of respiratory viruses. **Emerging Microbes and Infections**, v. 6, n. 6, 7 jun. 2017a.

TO, K. K. W. *et al.* Consistent detection of 2019 novel coronavirus in saliva. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 15, p. 841–843, 1 ago. 2020.

VEGUILLA, V. *et al.* Detection and Stability of SARS-CoV-2 in Three Self-Collected Specimen Types: Flocked Midturbinate Swab (MTS) in Viral Transport Media, Foam MTS, and Saliva. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 3, 29 jun. 2022.

V'KOVSKI, P. *et al.* **Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2.** **Nature Reviews Microbiology** Nature Research, , 1 mar. 2021.

WEISS, S. R.; NAVAS-MARTIN, S. Coronavirus Pathogenesis and the Emerging Pathogen Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 4, p. 635–664, dez. 2005.

WILLIAMS, E. *et al.* Detection of SARS-CoV-2 in saliva: Implications for specimen transport and storage. **Journal of Medical Microbiology**, v. 70, n. 2, 3 dez. 2020.

WU, C. RONG *et al.* **Structure genomics of SARS-CoV-2 and its Omicron variant: drug design templates for COVID-19.** **Acta Pharmacologica Sinica** Springer Nature, , 1 dez. 2022.

WU, F. *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 265–269, 12 mar. 2020.

ZHOU, P. *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 270–273, 12 mar. 2020.