

**Data do envio: 14/03/2022**

**Data de aceite: 10/04/2022**

**Artigo Original**

## **SWAB NASOFARÍNGEO VERSUS SALIVA: QUAL O MELHOR ESPÉCIME PARA O DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE SARS-COV-2?**

*NASOPHARYNGEAL SWAB VERSUS SALIVA: WHICH IS THE BEST SPECIMEN FOR MOLECULAR DIAGNOSIS OF SARS-COV-2?*

Jessica Sacardi Azevedo, Simone de Oliveira Scheres, Huander Felipe Andreolla  
Universidade Franciscana - Brasil

### **RESUMO:**

**Justificativa e objetivo:** A metodologia padrão-ouro para confirmação da infecção de SARS-CoV-2 é a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR) em amostras do trato respiratório. Embora seja muito comum a coleta de swab para a pesquisa do agente etiológico supracitado, outras amostras com menor custo de coleta, desconforto e risco biológico têm sido consideradas. Desse modo, esse estudo objetivou analisar qualitativamente e quantitativamente a extração de RNA de amostra de swab e saliva, bem como estudar o custo geral e a efetividade de cada amostra. **Métodos:** Estudo realizado em uma unidade de Pronto Atendimento do sul do Brasil. Foram coletadas amostras pareadas de saliva e de swab nasofaríngeo de pacientes com suspeita de COVID-19. Após a extração e quantificação, as amostras foram analisadas por RT-qPCR de acordo com o Protocolo Charité. **Resultados** Foram incluídas 20 amostras pareadas de swab nasofaríngeo e de saliva. A detecção do gene E ocorreu em apenas 5% (1/20) das amostras tanto em saliva quanto em swab. Os controles endógenos foram significativamente mais abundantes em amostras de saliva ( $p=0,00017$ ). O espécime clínico que demonstrou menor custo para obtenção foi a saliva. **Discussão:** O estudo evidenciou uma concordância em 100% dos resultados positivos e negativos. E análise de custo efetividade demonstrou que a técnica da saliva é mais barata. Embora a quantidade de ácido nucleico seja muito superior na saliva, um maior número amostral é necessário a fim de avaliar a equivalência de ambas as amostras sem prejuízo ao diagnóstico.

**Palavras-chave:** COVID19; 2019-nCoV; Pandemia; *Betacoronavirus*; Síndrome respiratória aguda grave.

## ABSTRACT:

**Background and objective:** The gold standard methodology for SARS-CoV-2 infection is a real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) in before the respiratory tract. Although swab collection is very common to investigate the aforementioned etiological agent, others with lower collection cost, discomfort and biological risk have been considered. Thus, this study aimed to qualitatively and quantitatively analyze the extraction of RNA from swab and saliva samples, as well as to study the general and effectiveness of each sample. **Methods:** Study carried out in an Emergency Care unit in southern Brazil. Saliva and nasopharyngeal swab collections were collected from patients suspected of having COVID-19. After extraction and quantification, how were analyzed by RT-qPCR according to the Charité Protocol. **Results** Twenty paired tusks of nasopharyngeal and saliva swabs were included. The detection of gene E occurred in only 5% (1/20) of both in saliva and in swab. Endogenous controls were analyzed more abundant in saliva ( $p = 0.00017$ ). The clinical specimen that instructs the lowest cost to obtain saliva. **Discussion:** The study showed an agreement in 100% of the positives and negative results. And the cost-effectiveness analysis that the saliva technique is cheaper. Although the amount of nucleic acid is much higher in saliva, a larger sample size is needed in order to assess the equivalence of both foundations without prejudice to diagnosis.

**Keywords:** COVID19; 2019-nCoV; Pandemic; *Betacoronavirus*; Severe Acute Respiratory Syndrome

## RESUMEN:

**Antecedentes y objetivo:** La metodología estándar de oro para confirmar la infección por SARS-CoV-2 es la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-qPCR) en muestras del tracto respiratorio. Si bien la recolección de hisopos es muy común para investigar el agente etiológico antes mencionado, se han considerado otras muestras con menor costo de recolección, malestar y riesgo biológico. Así, este estudio tuvo como objetivo analizar cualitativa y cuantitativamente la extracción de ARN de muestras de hisopos y saliva, así como estudiar el costo general y la efectividad de cada muestra. **Métodos:** estudio realizado en una unidad de urgencias del sur de Brasil. Se recolectaron muestras pareadas de saliva y hisopos nasofaríngeos de pacientes sospechosos de tener COVID-19. Después de la extracción y cuantificación, las muestras se analizaron mediante RT-qPCR de acuerdo con el Protocolo de Charité. **Resultados** Se incluyeron veinte muestras pareadas de hisopado nasofaríngeo y saliva. La detección del gen E ocurrió en solo el 5% (1/20) de las muestras tanto en saliva como en hisopo. Los controles endógenos fueron significativamente más abundantes en las muestras de saliva ( $p = 0,00017$ ). La muestra clínica que presentó el menor costo de obtención fue la saliva. **Discusión:** El estudio mostró concordancia en el 100% de los resultados positivos y negativos. Y el análisis de rentabilidad demostró que la técnica de la saliva es más barata. Aunque la cantidad de ácido nucleico es mucho mayor en la saliva, es necesario un tamaño de muestra mayor para poder evaluar la equivalencia de ambas muestras sin perjuicio del diagnóstico.

**Palabras clave:** COVID19; 2019-nCoV; Epidemia: *Betacoronavirus*; Síndrome respiratorio agudo severo

## 1. INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019 observou-se o surgimento de casos de pneumonia atípica na China, sendo identificado pela primeira vez o vírus SARS-CoV-2. <sup>1</sup>A transmissão desse patógeno, embora naquela época ainda houvesse pouca informação a respeito, parecia ocorrer majoritariamente através do contato direto entre pessoas. A rápida dispersão viral rapidamente chamou à atenção do mundo e atingiu em cerca de quatro meses um comportamento tal que levou a incipiente síndrome denominada COVID-19 a ser qualificada como pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS). <sup>2</sup> O vírus causador da COVID-19 vem sendo o responsável por impactos sociais, econômicos e humanos, sendo de extrema importância obter-se um diagnóstico preciso e rápido para o isolamento do paciente e assim evitar a disseminação, além de direcionar decisões governamentais de prevenção. <sup>3</sup>

A biologia molecular, através da reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR), vem sendo usada como uma ferramenta no diagnóstico do agente causador da COVID-19 por possuir uma alta sensibilidade e especificidade. <sup>4</sup> Alguns fatores podem contribuir para o sucesso da detecção de RNA viral do SARS-CoV-2 em amostras suspeitas. Dentre tais fatores, seguramente, o tempo transcorrido dos sintomas e a data de coleta dos espécimes parece ser uma variável importante, aliado, obviamente ao tipo de material biológico elencado para a pesquisa molecular. <sup>4,5</sup>

O swab da nasofaringe é a amostra preferencial para o diagnóstico do SARS-CoV-2 bem como para outros vírus respiratórios, sobretudo no período sintomático de doença. Apesar de não ser invasivo, a obtenção desse tipo de espécime clínico parece gerar desconforto ao paciente, além de difícil manejo em determinados grupos como crianças. Cabe igualmente a ressalva de que a coleta desse tipo de material pode colocar em risco profissionais da saúde, devido a formação de aerossóis durante a coleta, produzidos em decorrência dos sintomas gripais presentes no momento da coleta e através das próprias secreções de fala dos pacientes. <sup>4,6</sup>

Uma alternativa aparentemente viável para a detecção do agente etiológico da COVID-19 parece ser o uso de saliva como material biológico para a realização da pesquisa molecular viral. Estudos já observaram a performance do uso desse espécime clínico versus o swab de nasofaringe para o diagnóstico de SARS-CoV-2 tendo demonstrado que o primeiro parece ter algumas vantagens sobre o segundo no que se refere à potencial sensibilidade analítica além de ser mais facilmente obtido, ter um menor custo operacional e produzir menor exposição de profissionais de saúde às fontes de infecção. <sup>3,6-10</sup>

Baseados nisto esse estudo buscou-se analisar a custo-efetividade de amostras pareadas de saliva e swab nasofaringe em pacientes sob suspeita clínica de COVID-19 para o diagnóstico molecular através da RT-qPCR, além de analisar qualitativamente e quantitativamente a extração de RNA das amostras através de método semiautomatizado.

## 2. MÉTODOS

### 2.1. POPULAÇÃO ESTUDADA

Foram incluídos neste estudo, indivíduos sintomáticos até o sétimo dia, com suspeita de síndrome gripal e idade igual ou superior a 18 anos que buscaram o serviço da Unidade de Pronto Atendimento (UPA 24hs) no município de Santa Maria, RS. Indivíduos que fizeram uso de antibiótico, antimalárico e antiparasitário, contactantes de casos positivos para COVID-19, apresentaram dificuldade para realizar a coleta, ou apresentaram sintomas a mais de sete dias não foram incluídos no estudo.

### 2.2. COLETA E TRANSPORTE

As amostras de saliva foram coletadas primeiro, sendo diluídas em uma solução salina tamponada para um volume final de, aproximadamente, dois mililitros. Após a obtenção da saliva, procedeu-se a coleta do swab coletado da nasofaringe, conforme orientações Ministério de Saúde. A suspensão de saliva passou por uma centrifugação a 14.000  $\times g$  por 5 min e o sobrenadante foi utilizado para a realização da extração dos ácidos nucleicos e detecção molecular dos alvos.

### 2.3. EXTRAÇÃO E ARMAZENAMENTO

O processo de extração do material genético de ambas as amostras, ocorreu através do Indimag® *Pathogen Kit w/o Plastics*, que utiliza *beads* magnéticas seguindo as orientações dos fabricantes. Após a extração, os RNAs foram quantificados no NanoDrop lite (Thermo Scientific, Waltham, MA) e o armazenamento ocorreu em freezer -80°C.

### 2.4. ANÁLISE LABORATORIAL

Para avaliar as amostras clínicas, tanto de saliva quanto de swab de nasofaringe foram analisadas de modo pareado por RT-qPCR através do Protocolo *Charité*, o qual foi validado previamente para realização dos testes em plataforma StepOne (Applied Biosystems®). Os testes realizados no Laboratório de Diagnóstico Molecular da Universidade Franciscana através do kit *AgPath-ID™ One-Step RT-PCR reagent*, o qual emprega os *primers* para o SARS-CoV-2 o gene “E” e a “RNase P” como controle endógeno, além de sondas *TaqMan*. Os primers forward e reverse para a pesquisa do gene E do subgênero viral *Sabercovirus* e sonda de hidrólise foram, respectivamente: 5'-ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT-3', 5' - ATATTGCAGCAGTACGCACACA-3' e FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-QSY. Como gene de controle endógeno utilizou-se como marcador da RNase P humana, cujas sequências de primers forward, reverse e sonda de hidrólise apresentavam as seguintes sequências: 5'-AGATTTGGACCTGCGAGCG-3', 5'-GAGCGGCTGTCTCCACAAGT3' e FAM-TTCTGACTTGAAGGCTCTGCGCG-QSY. Todos os procedimentos relacionados ao preparo de mix e termociclagem ocorreram em conformidade com as instruções do fabricante.

Para a interpretação dos resultados da reação foram empregados os seguintes parâmetros: o resultado detetável obteve uma amplificação até o ciclo de *threshold* (Ct) de 37 no alvo “E”. Resultados com Ct acima de 37.1 foram considerados inconclusivos e a não amplificação do gene viral concomitante à amplificação do gene endógeno foram critérios adotados para conferir a validade dos resultados negativos.

### 2.5. ANÁLISE DE CUSTO

Para chegar aos custos por pessoa amostrada, foram considerados os custos associados ao material e o profissional da saúde para coletar as amostras, conforme valor de mercado. Ressaltando que, para o transporte e extração, em decorrência destes estes procedimentos serem realizados seguindo protocolos similares, foram considerados os mesmos custos em ambas as coletas.

### 2.6. ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo obteve a aprovação da Comissão científica dos hospitais Casa de Saúde e São Francisco de Assis e UPA 24H/SM (COMIC) e Comitê de ética da Universidade Franciscana sob número 5.047.185, atendendo os preceitos éticos estabelecidos na Resolução Nº 466/2012 do Ministério da Saúde. Após a verificação dos critérios de elegibilidade e antes de qualquer procedimento previsto nesse estudo os participantes da pesquisa foram convidados a fornecer o consentimento livre e esclarecido.

## 2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos na análise das amostras são descritos em uma planilha Excel<sup>®</sup>, constituindo um banco de dados, os quais, posteriormente foram analisados pelo *software GraphPad Prism*<sup>®</sup>, comparando a sensibilidade de detecção entre saliva e swab nasofaringe através dos parâmetros estatísticos do teste de Wilcoxon. Testes estatísticos com  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 3. RESULTADOS

No total 20 pacientes concordaram em participar sendo 10 do sexo feminino e 10 do sexo masculino entre as idades 19 e 58 com uma média de 34 anos e desvio-padrão de  $\pm 9,9$  anos. Todas as amostras foram coletadas entre o terceiro e sétimo dia de sintomas. Portanto, foram analisadas um total de 40 amostras sendo 20 swabs da nasofaringe e 20 amostras de saliva. Conforme a tabela 1, dentre os resultados obtidos, observaram-se 17 amostras não detectáveis para o gene viral e uma detectável, o que ocorreu de modo pareado e em ambos os espécimes clínicos.

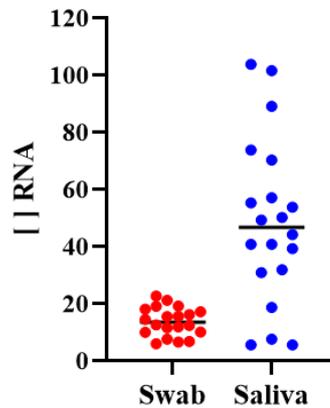
**Tabela 1:** Número de amostras detectáveis e não detectáveis

		Teste na amostra de swab nasofaringe (n=20)		
		Detectável	Não detectável	Inconclusivo
Teste na amostra saliva (n=20)	Detectável	1	0	0
	Não detectável	0	17	1
	Inconclusivo	0	1	0

Observaram-se dois resultados inconclusivos, sendo um para cada tipo de espécime clínico, no quais foram evidenciados valores de Ct de 38,98 e 39,11 na amostra de swab de nasofaringe e de saliva, respectivamente. Visto que, somente uma amostra positivou, foi observado uma sensibilidade de 100% e especificidade de 94,4%, podendo ser verificado na Tabela 1. Vale salientar que, todos os pacientes tomaram ao menos uma dose da vacina contra o SARS-CoV-2, sendo as principais: Pfizer-BioNTech, Oxford-AstraZeneca, CoronaVac e Johnson & Johnson.

Após a extração de ácidos nucleicos, os mesmos foram quantificados por nanoespectrofotometria (Gráfico 1) e foi uma concentração superior de RNA na saliva ( $48,4 \pm 21,93$  ng/ $\mu$ l) quando comparada à concentração do swab nasofaríngeo ( $13,6 \pm 4,19$  ng/ $\mu$ l). A análise qualitativa do material genético extraído evidenciou um índice de pureza em mais de 70% das amostras de saliva *versus* 5% do swab da nasofaringe.

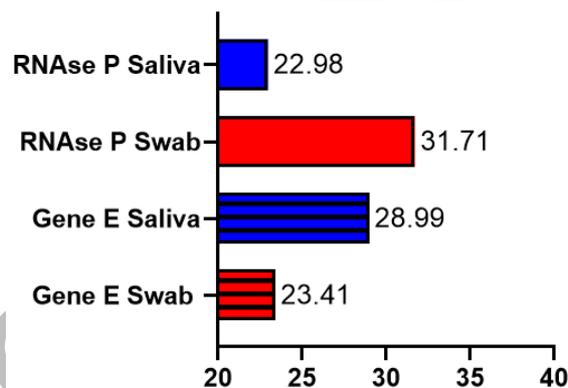
**Gráfico 1:** Quantificação de RNA total por nano espectrometria em amostras de saliva e swab conforme (n=40).



Quantificação da saliva e swab após a extração com um desvio padrão de  $\pm 21,93$  na saliva e  $\pm 4,19$  no swab.

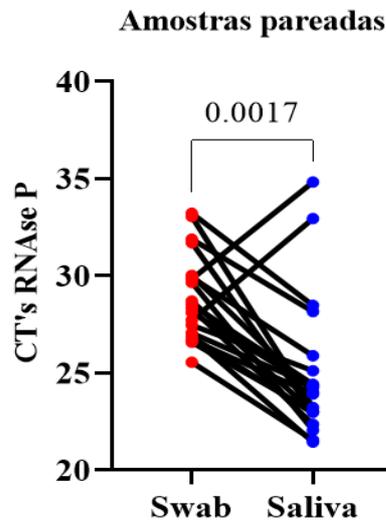
Ao analisarmos os Ct para gene “E” da amostra positiva pode-se observar que o swab obteve 23,41 e a saliva 28,99 uma variação de 5,58 Ct , todavia, na pesquisa da RNase P o swab apresentou um Ct de 31,71 e a saliva Ct de 22,98, conforme gráfico 2.

**Gráfico 2:** Comparação entre os ciclos de Threshold para o gene viral e gene endógeno em amostras de paciente com COVID-19.



Comparação entre os Ciclos de *Threshold* da amostra positiva, onde pode-se observar que o swab apresentou menor Ct (23,41) comparado a saliva (28,99) na pesquisa do gene viral (Gene “E”), já para o controle endógeno (“RNase P”) o swab apresentou um Ct maior (31,71) ao compararmos com a saliva (22,98)

Ao comparar-se a performance do gene endógeno (RNase P) para cada um dos vinte pacientes com amostras de saliva e swab nasofaríngeos pareados, foi observada um desempenho superior das amostras de saliva quando comparadas às amostras de swab nasofaríngeo ( $p=0,00017$ ). O Gráfico 3 demonstra a variação entre ambos materiais biológicos no que se refere à maior quantidade de material genético, o que pode ser observado pelo menor número de Ct para esse material.

**Gráfico 3:** Análise de amostras paralelas na pesquisa do controle endógeno (RNase P).

Comparação entre os CT's para o controle endógeno de todas as amostras analisadas, pode-se observar que a diferença entre as amostras foi significativa, onde a saliva apresentou CT's menores, consequentemente apresentando uma quantidade de material genético maior.

Em se tratando da análise de custos operacionais para realização das coletas, foi realizada uma média entre cinco orçamentos para cada material, sendo eles: kit completo para coleta de vírus respiratórios, pote estéril de boca larga e salina, bem como o valor médio do profissional para realizar cada coleta (média aproximada do salário do técnico de enfermagem), levando em consideração que a coleta de swab leva aproximadamente dez minutos e a da saliva de três minutos. Conforme a Tabela 2, obteve-se uma redução de aproximadamente 84% do custo operacional ao se utilizar como material biológico a saliva.

**Tabela 2:** Estimativa de recursos materiais e humanos para a colheita de swab de nasofaringe *versus* saliva.

Material	Média do valor no mercado
<b>Colheita de swab da nasofaringe</b>	
Kit completo	R\$ 5,75
Profissional da saúde*	R\$ 2,60
<b>Total</b>	<b>R\$ 8,37</b>
<b>Colheita de saliva</b>	
Pote boca larga	R\$ 0,53
Salina	R\$ 0,04
Profissional da saúde*	R\$ 0,78
<b>Total</b>	<b>R\$ 1,34</b>

\*valor de acordo com pesquisa do Salario.com.br junto a dados oficiais do Novo CAGED, eSocial e Empregador Web.

#### 4. DISCUSSÃO

Com o advento da COVID-19 e a necessidade de testagem massiva da população para a investigação de SARS-CoV-2 em amostras respiratórias, se fez necessário, além de

desenvolver testes em tempo recorde, conhecer melhor a performance de diferentes espécimes biológicos a fim de se orientar a melhor opção possível ao diagnóstico molecular.<sup>11</sup> O uso de saliva tem sido orientada como alternativa a métodos de coleta já bem estabelecidos para a coleta de espécimes do trato respiratório superior devido à sua fácil obtenção e redução dos riscos ao profissional que acompanhará a coleta e os custos com materiais, tornando o exame mais acessível.<sup>12</sup> Estudos mostraram que a saliva é uma opção que pode ser usada além do diagnóstico direto, mas como uma forma de rastreamento em ambientes com grande circulação de pessoas, isolando rapidamente, assim, evitando surtos.<sup>13</sup> Portanto, esse estudo dispunha de verificar a sensibilidade, especificidade, além de analisar qualitativamente e quantitativamente e a custo-efetividade das amostras.

Nosso estudo identificou que tanto o swab da nasofaringe e a saliva se demonstraram como satisfatórias para o diagnóstico da COVID-19 tendo uma concordância de 100% entre os resultados positivos e negativos, desse modo, houve divergência em relação ao estudo de Pasomsub et al., McCormick-Baw et al., que apontaram uma diferença, porém pouco significativa entre o swab da nasofaringe e a saliva, discordando de Jamal et al. que demonstrou uma dissemelhança considerável após a primeira semana de sintomas.<sup>14-16</sup> No que diz respeito ao Ct das amostras nossos achados concordam com Williams et al. e Landry et al., cujo swab apresentou Ct menor que a saliva.<sup>17,18</sup> Vale ressaltar que tivemos duas amostras inconclusivas, tanto uma saliva quanto um swab, necessitando de uma segunda coleta para obter-se o diagnóstico.

O número baixo de casos de infecção pelo SARS-CoV-2 é provável ser em decorrência do avanço da vacinação no município de Santa Maria-RS, com aproximadamente 77% da população com ao menos uma dose da vacina e por volta de 65% com o calendário vacinal completo, no período em que foi realizado a pesquisa, segundo o site da Prefeitura Municipal. Cabe igualmente ressaltar que todos os participantes, no momento da coleta, informaram que ter recebido ao menos a primeira dose de alguma das vacinas aprovadas pela ANVISA, as quais apresentam eficácia entre 50,7% e 94,6%.<sup>19-21</sup>

Para a validação da amostra foi utilizado a pesquisa da RNase P, um controle interno, o qual, na saliva, verificou-se um menor valor de Ct comparado ao swab, o que demonstra uma maior quantidade de material celular, bem como apresentou uma concentração de RNA significativamente maior, assim como o grau de pureza, corroborando com os achados no estudo de Landry et al., Moreno Contreras et al. e Abasiyanik et al.<sup>18,22,23</sup>

Ao analisar o custo podemos observar que as despesas com a amostra de saliva é seis vezes menor, seu custo é de R\$ 1,34, enquanto para o swabs é de R\$ 8,37, isto é, uma redução de 84% concordando com Bastos et al. e Butler-Laport et al.<sup>7,8</sup> Ao utilizarmos a amostra alternativa, pode-se aumentar o alcance do teste para populações e países mais carentes, tornando o teste mais acessível, podendo ser utilizado em crianças e idosos, que normalmente apresentam maior dificuldade na realização da coleta por swab.<sup>13,24,25</sup>

Embora esse estudo tenha demonstrado que os resultados entre saliva e swab concordam, a pesquisa apresenta vieses e limitações, bem como a baixa prevalência de amostra positivas, devido a diminuição da circulação viral e o número amostral, e a utilização do Gene "E" que, apesar de ser muito sensível, não é específico para o SARS-CoV-2, mas para o subgênero *Sarbecovirus*.

Em suma, esse estudo demonstrou que embora em um período epidemiológico com baixa incidência de casos de SARS-CoV-2 é possível correlacionar a saliva e o swab, podendo optar-se entre um ou outro material biológico sem importante ônus à sensibilidade analítica. A análise quantitativa de saliva não apenas demonstrou uma maior concentração de material genético como também aparentemente demonstrou-se de qualidade superior em relação às amostras de swab, o que não se refletiu na carga viral superior observada. Diante desses fatos e considerando as potenciais vantagens da saliva como material biológico de eleição para essa e

outras infecções do trato respiratório superior, sugere-se que mais estudos sejam desenvolvidos a fim de subsidiar as decisões tanto de gestores públicos quanto de empresas privadas que atuam de modo direto para o diagnóstico molecular microbiológico.

#### **AGRADECIMENTOS**

A equipe da Unidade de Pronto Atendimento UPA 24HRS do Município de Santa Maria/RS e a todos que participaram diretamente ou indiretamente no desenvolvimento desse projeto.

ahead of print

## REFERÊNCIAS

1. Ortiz-prado E, Simbaña-rivera K, Barreno LG, et al. Clinical, molecular, and epidemiological characterization of the SARS-CoV-2 virus and the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), a comprehensive literature review. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2020;98(115094):1-31. doi:<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115094>
2. Marchesan JT, Warner BM, Byrd KM. The “oral” history of COVID-19: Primary infection, salivary transmission, and post-acute implications. *Journal of Periodontology*. 2021;(July):1-11. doi:10.1002/jper.21-0277
3. Wyllie AL, Fournier J, Casanovas-Massana A, et al. Saliva or Nasopharyngeal Swab Specimens for Detection of SARS-CoV-2. *New England Journal of Medicine*. 2020;383(13):1283-1286. doi:10.1056/NEJMc2016359
4. Torretta S, Zuccotti G, Cristofaro V, et al. Diagnosis of SARS-CoV-2 by RT-PCR Using Different Sample Sources: Review of the Literature. *Ear, Nose and Throat Journal*. 2021;100(2\_suppl):131S-138S. doi:10.1177/0145561320953231
5. Shen M, Zhou Y, Ye J, Al-maskri AAA, Kang Y, Zeng S. Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2020;10(2):97-101. doi:10.1016/j.jpha.2020.02.010
6. Byrne RL, Kay GA, Kontogianni K, et al. Saliva Alternative to Upper Respiratory Swabs for SARS-CoV-2 Diagnosis. *medRxiv*. 2020;26(11):2-3. doi:10.1101/2020.07.09.20149534
7. Bastos ML, Perlman-Arrow S, Menzies D, Campbell JR. The Sensitivity and Costs of Testing for SARS-CoV-2 Infection With Saliva Versus Nasopharyngeal Swabs : A Systematic Review and Meta-analysis. *Annals of internal medicine*. 2021;174(4):501-510. doi:10.7326/M20-6569
8. Butler-Laporte G, Lawandi A, Schiller I, et al. Comparison of Saliva and Nasopharyngeal Swab Nucleic Acid Amplification Testing for Detection of SARS-CoV-2. *JAMA Internal Medicine*. 2021;181(3). doi:10.1001/jamainternmed.2020.8876
9. Teo AKJ, Choudhury Y, Tan IB, et al. Saliva is more sensitive than nasopharyngeal or nasal swabs for diagnosis of asymptomatic and mild COVID-19 infection. *Scientific Reports*. 2021;11(1):1-8. doi:10.1038/s41598-021-82787-z
10. Oba J, Taniguchi H, Sato M, et al. RT-PCR Screening Tests for SARS-CoV-2 with Saliva Samples in Asymptomatic People: Strategy to Maintain Social and Economic Activities while Reducing the Risk of Spreading the Virus. *The Keio Journal of Medicine*. 2021;70(2):35-43. doi:10.2302/kjm.2021-0003-OA
11. Tsang NNY, So HC, Ng KY, Cowling BJ, Leung GM, Ip DKM. Diagnostic performance of different sampling approaches for SARS-CoV-2 RT-PCR testing: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2021;3099(21):1-13. doi:10.1016/s1473-3099(21)00146-8

12. To KKW, Tsang OTY, Yip CCY, et al. Consistent detection of 2019 novel coronavirus in saliva. *Clinical Infectious Diseases*. 2020;71(15):841-843. doi:10.1093/cid/ciaa149
13. vander Schaaf NA, Fund AJ, Munnich B v., et al. Routine, Cost-Effective SARS-CoV-2 Surveillance Testing Using Pooled Saliva Limits Viral Spread on a Residential College Campus. *Microbiology Spectrum*. 2021;9(2). doi:10.1128/spectrum.01089-21
14. Pasomsub E, Watcharananan SP, Boonyawat K, et al. Saliva sample as a non-invasive specimen for the diagnosis of coronavirus disease 2019: a cross-sectional study. *Clinical Microbiology and Infection*. 2021;27(2):285.e1-285.e4. doi:10.1016/j.cmi.2020.05.001
15. McCormick-Baw C, Morgan K, Gaffney D, et al. Saliva as an Alternate Specimen Source for Detection of SARS-CoV-2 in Symptomatic Patients Using Cepheid Xpert Xpress SARS-CoV-2. McAdam AJ, ed. *Journal of Clinical Microbiology*. 2020;58(8). doi:10.1128/JCM.01109-20
16. Jamal AJ, Mozafarihashjin M, Coomes E, et al. Sensitivity of Nasopharyngeal Swabs and Saliva for the Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Clinical Infectious Diseases*. 2021;72(6):1064-1066. doi:10.1093/cid/ciaa848
17. Williams E, Bond K, Zhang B, Putland M, Williamson DA. Saliva as a Noninvasive Specimen for Detection of SARS-CoV-2. McAdam AJ, ed. *Journal of Clinical Microbiology*. 2020;58(8):565-574. doi:10.1128/JCM.00776-20
18. Landry ML, Criscuolo J, Peaper DR. Challenges in use of saliva for detection of SARS CoV-2 RNA in symptomatic outpatients. *Journal of Clinical Virology*. 2020;130(January):104567. doi:10.1016/j.jcv.2020.104567
19. Palacios R, Batista AP, Albuquerque CSN, et al. Efficacy and Safety of a COVID-19 Inactivated Vaccine in Healthcare Professionals in Brazil: The PROFISCOV Study. *SSRN Electronic Journal*. Published online 2021. doi:10.2139/ssrn.3822780
20. Agência Nacional de Vigilância Sanitária . Brasília: Vacinas [Internet]; 2021 [atualizada 2021 Ago 17; citado 2021 nov 22]. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/bulas-e-rotulos/bulas-uso-emergencial/vacinas>.
21. Prefeitura Municipal de Santa Maria. Santa Maria: Monitoramento da imunização COVID-19; 2021 [ atualizada 2021 nov 25; citado em 2021 nov 25]. Disponível em: <https://www.santamaria.rs.gov.br/vacinacao/?secao=vacinometro>
22. Moreno-Contreras J, Espinoza MA, Sandoval-Jaime C, et al. Saliva Sampling and Its Direct Lysis, an Excellent Option To Increase the Number of SARS-CoV-2 Diagnostic Tests in Settings with Supply Shortages. Caliendo AM, ed. *Journal of Clinical Microbiology*. 2020;58(10). doi:10.1128/JCM.01659-20
23. Abasiyanik MF, Flood B, Lin J, et al. Sensitive detection and quantification of SARS-CoV-2 in saliva. *Scientific Reports*. 2021;11(1):1-12. doi:10.1038/s41598-021-91835-7
24. Güçlü E, Koroglu M, Yürümez Y, et al. Comparison of saliva and oro-nasopharyngeal swab sample in the molecular diagnosis of COVID-19. *Revista da Associacao Medica Brasileira*. 2020;66(8):1116-1121. doi:10.1590/1806-9282.66.8.1116

25. Du Z, Pandey A, Bai Y, et al. Comparative cost-effectiveness of SARS-CoV-2 testing strategies in the USA: a modelling study. *The Lancet Public Health*. 2021;6(3):e184-e191. doi:10.1016/S2468-2667(21)00002-5

ahead of print