



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Odontologia

Taísa Coelho Guimarães

**Deteccção de COVID-19 através da saliva e redução da carga viral de
SARS-CoV-2 na saliva de pacientes com COVID-19 após uso de
enxaguantes orais**

Rio de Janeiro

2022

Taísa Coelho Guimarães

Deteccção de COVID-19 através da saliva e redução da carga viral de SARS-CoV-2 na saliva de pacientes com COVID-19 após uso de enxaguantes orais

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Guimarães Fischer

Rio de Janeiro

2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBB

G936	Guimarães, Taísa Coelho. Detecção da COVID-19 através da saliva e redução da carga viral de SARS-CoV-2 na saliva de pacientes com COVID-19 após uso de enxaguantes orais. / Taísa Coelho Guimarães - 2021. 70 f. Orientador: Ricardo Guimarães Fischer. Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia. 1. Saliva. 2. Teste para COVID-19. 3. Reação em cadeia da polimerase em tempo real. 4. SARS - CoV-2. 5. Saúde pública. I. Fischer, Ricardo Guimarães. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Odontologia. III. Título. 616.314
------	---

Kárin Cardoso CRB/7 6287

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Taísa Coelho Guimarães

Detecção de COVID-19 através da saliva e redução da carga viral de SARS-CoV-2 na saliva de pacientes com COVID-19 após uso de enxaguantes orais

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Periodontia.

Aprovada em 07 de fevereiro de 2022.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Guimarães Fischer
Faculdade de Odontologia - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Eduardo Muniz Barretto Tinoco
Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof.^a Dra. Magali Silveira Monteiro Ribeiro
Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Mariana Fampa Fogacci
Universidade Federal de Pernambuco

Rio de Janeiro

2022

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que tiveram suas vidas perdidas para a COVID-19.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a meus pais que me deram o privilégio de ter uma educação de qualidade desde o princípio e que, hoje, têm uma paciência e carinho enormes com a minha trajetória, bem como toda a minha família.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Ricardo Guimarães Fischer, por toda a dedicação com a minha formação desde antes do mestrado. Obrigada por me incentivar e confiar em mim, especialmente para este projeto. É uma honra poder contar com um expoente da Periodontia na minha carreira. Jamais conseguirei agradecer o suficiente.

Ao professor Eduardo Muniz Barretto Tinoco, que também teve uma dedicação enorme, desde a elaboração do projeto, e me deu toda assistência necessária durante o desenvolvimento do mesmo e durante o meu estágio docente. Estendo meus agradecimentos à professora Justine Tinoco pela contribuição na elaboração do projeto e dos artigos.

À Barbara Bruno Fagundes Marques, que teve contribuição em todas as etapas deste trabalho e um grande empenho, como se esta dissertação também fosse dela. Nossa parceria prova que, quando se tem respeito, generosidade e empatia, todos têm a ganhar.

À toda equipe do Laboratório de Histocompatibilidade e Criopreservação da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (HLA-UERJ), especialmente ao professor Luís Cristóvão Moraes Sobrino Porto, Marcelle Viana de Castro, Daniele Angst Secco, por toda a receptividade e participação em ambos os estudos desta dissertação.

À equipe da especialização em Periodontia do Instituto de Odontologia da PUC-Rio: Alexandra Dias, Flavia Garcia, Magali Monteiro e Ricardo Fischer, que acreditaram em mim e que me deram base, incentivo e torcida para eu entrar no mestrado e, hoje, me dão acolhimento e disponibilidade com todas as dúvidas e dificuldades que enfrentei até agora.

À Cristine da Silva Furtado Amaral, Davi da Silva Barbirato e Mariana Fampa Fogacci, meus professores/orientadores desde a graduação, responsáveis por me fazer ver a Periodontia com outros olhos pela primeira vez. Agradeço também por,

ainda hoje, me ensinarem tanto e com tanto carinho. Jamais conseguirei agradecer o suficiente.

À Loreley Bragard por me apresentar ao mestrado, por me ensinar uma metodologia de estudo que me permitiu passar na seleção, por estar presente em todo o meu processo de aprendizagem na pós-graduação e, é claro, pela amizade e parceria que construímos ao longo dos últimos 4 anos.

Aos amigos da odontologia, em especial à Cristine Amaral que há algum tempo é extremamente presente e cujos ensinamentos, acolhimento e compreensão nos últimos 7 anos foram imprescindíveis para que eu chegasse até esta defesa; e à Marina Assef por toda a parceria desde o primeiro período da graduação, por me alegrar e me fazer rir durante as horas de ligações de 2020.

Aos amigos da vida, sobretudo à Amanda Lima, Beatriz Lima, Bruna Moss, Carlos Martinho, Carolina Castro, Clara Herrera, Fernanda Guimarães, Gabriel Freire, Jordane Vieira, Letícia Moutinho, Marina Assef, Nathalia Fraifeld e Yan Alvim por toda paciência e preocupação comigo durante a pandemia e este meu momento. Obrigada ainda por entenderem que se trata de um sonho e que eu precisei ficar mais ausente para conquistá-lo.

Agradeço enormemente aos pacientes que se disponibilizaram a participar dos estudos. Meu respeito e carinho à família da querida Maria do Carmo (*in memoriam*).

Agradeço aos professores Eduardo Tinoco, Magali Monteiro e Mariana Fogacci pela disponibilidade e por me permitirem ter sua presença como banca na defesa deste mestrado.

Aos funcionários da UERJ, cujo trabalho é fundamental para que o nosso possa acontecer.

Por fim, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos ao longo desses 2 anos.

RESUMO

GUIMARÃES, T. C. *Detecção de COVID-19 através da saliva e redução da carga viral de SARS-CoV-2 na saliva de pacientes com COVID-19 após uso de enxaguantes orais*. 2022. 70f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

A COVID-19 é uma doença viral relacionada a: gotículas respiratórias, tosse, espirro e aerossóis, e associada à Síndrome Respiratória Aguda Grave por coronavírus. Assim, o atendimento odontológico pode ser um potencial local de transmissão do vírus. Ademais, a testagem em massa da população foi e é considerada uma abordagem chave no combate dessa e de outras doenças contagiosas. **Objetivos:** Os objetivos desta dissertação foram (1) avaliar e comparar os resultados dos testes de RT-PCR provenientes de amostras nasofaríngeas com os resultados da saliva, e ainda, (2) avaliar a redução da carga viral salivar por antissépticos orais em pacientes com teste positivo para COVID-19. **Materiais e métodos:** No estudo 1, amostras de saliva e de swab nasofaríngeo (NPS, do inglês *nasopharyngeal swab*) foram coletadas de 189 indivíduos provenientes das testagens (N=378). No estudo 2, 63 indivíduos foram recrutados após terem testado positivo para COVID-19 por ensaio RT PCR para a detecção de SARS-CoV-2. Os indivíduos foram divididos em cinco grupos, que receberam soluções diferentes. O grupo 1 (placebo) recebeu água, o grupo 2 recebeu solução de peróxido de hidrogênio a 1,5% (H₂O₂), o grupo 3 recebeu clorexidina 0,12% (CHX), o grupo 4 recebeu solução de hipoclorito de sódio 0,1% (NaClO) e o grupo 5 recebeu uma combinação de soluções (0,12% CHX + 1,5% H₂O₂). Todos os indivíduos foram solicitados a produzir uma amostra inicial de saliva. Após a coleta, usaram o enxaguatório designado por 1 minuto. Amostras adicionais foram coletadas em três momentos diferentes: imediatamente após o enxágue, 15 minutos após o enxágue e 30 minutos após o enxágue. A extração de RNA foi feita usando o Bio Gene DNA / RNA Viral Extraction kit (Bioclin®) para ambos os objetivos. O programa estatístico SPSS 23.0 ("Statistical Package for Social Science") foi usado para a análise dos dados. **Resultados:** No estudo 1, 142 indivíduos apresentaram resultado não detectável (ND) na saliva, enquanto 47 apresentaram resultado detectável (D). Entre os 142 ND, 137 (94,4%) amostras obtiveram o mesmo resultado das amostras de swab nasofaríngeo, enquanto 5 amostras (3,4%) foram "D". Dentre as 47 amostras de NPS D, 35 (74,4%) apresentaram o mesmo resultado nas amostras de saliva. A sensibilidade do teste de saliva foi de 0,74 e a especificidade foi de 0,97. O valor preditivo positivo foi de 0,88, enquanto o valor preditivo negativo foi de 0,92. No estudo 2, houve diferença significativa quanto ao número de cópias do SARS-Cov-2 após 30 minutos no grupo 2, enquanto, no grupo 4, houve diferença imediatamente após, quando comparado ao inicial. Não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais e o grupo controle em qualquer período. **Conclusão:** A detecção de Sars-CoV-2 em amostras de saliva apresentou alta sensibilidade e especificidade quando comparada com swabs nasofaríngeos. Não houve diferenças significativas em comparação com o grupo controle.

Palavras-chave: Saliva. Swab nasofaríngeo. Covid-19. Real-time RT-PCR. SARS CoV-2. Saúde pública.

ABSTRACT

GUIMARÃES, T. C. *Detection of COVID-19 through saliva and reduction in the viral load of SARS-CoV-2 in saliva of patients with COVID-19 after the use of oral rinses*. 2022. 70f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

COVID-19 is a viral disease related to: respiratory droplets, coughing, sneezing and aerosols, and associated with Severe Acute Respiratory Syndrome by coronavirus. Thus, dental care may be a potential site of transmission of the virus. In addition, mass population testing was and is considered a key approach in combating this and other communicable diseases. Objectives: The objectives of this dissertation were (1) to evaluate and compare the results of RT-PCR tests from nasopharyngeal samples with the results of saliva, and also, (2) to evaluate the reduction of salivary viral load by oral antiseptics in patients with positive test for COVID-19. Materials and methods: In study 1, saliva and nasopharyngeal swab (NPS) samples were collected from 189 test subjects (N=378). In study 2, 63 subjects were recruited after testing positive for COVID-19 by RT PCR assay for the detection of SARS-CoV-2 RNA. The subjects were divided into five groups, which received different solutions. Group 1 (placebo) received sterile water, group 2 received 1.5% hydrogen peroxide solution (H₂O₂), group 3 received 0.12% chlorhexidine (CHX), group 4 received sodium hypochlorite solution 0.1% (NaClO) and group 5 received a combination of solutions (0.12% CHX + 1.5% H₂O₂). All subjects were asked to produce an initial saliva sample. After collecting the first sample, they used the designated mouthwash for 1 minute. Additional saliva samples were collected at three different times: immediately after rinsing, 15 minutes after rinsing and 30 minutes after rinsing. RNA extraction was performed using the Bio Gene DNA / RNA Viral Extraction kit (Bioclin®) for both purposes. The statistical program SPSS 23.0 ("Statistical Package for Social Science") was used for data analysis. Results: In study 1, 142 subjects had an undetectable result (ND) in saliva, while 47 had a detectable result (D). Among the 142 ND, 137 (94.4%) samples obtained the same result as the nasopharyngeal swab samples, while 5 samples (3.4%) were "D". Among the 47 samples of SPN D, 35 (74.4%) showed the same result in the saliva samples. The sensitivity of the saliva test was 0.74 and the specificity was 0.97. The positive predictive value was 0.88, while the negative predictive value was 0.92. In study 2, there was a significant difference in the number of copies of SARS-Cov-2 after 30 minutes in group 2, while in group 4 there was a difference immediately after, when compared to the initial one. There were no significant differences between the experimental groups and the control group at any period. Conclusion: The detection of Sars-CoV-2 in saliva samples showed high sensitivity and specificity when compared to nasopharyngeal swabs. There were no significant differences compared to the control group.

Keywords: Saliva. Nasopharyngeal Swab. COVID-19. Real-time RT-PCR. SARS-CoV-2. Public health.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Amostras de NPS e saliva para SARS CoV-2 por RT-PCR de pacientes ambulatoriais sintomáticos.....	28
Tabela 2 -	Média (DP) da idade, distribuição de gênero e frequência dos sintomas dos pacientes não hospitalizados com amostras nasofaríngeas positivas e negativas para o teste de COVID-19 por RT-PCR.....	29
Tabela 3 -	Média (DP) da idade, distribuição de gênero e frequência dos sintomas dos pacientes não hospitalizados com amostras de saliva positivas e negativas para o teste de COVID-19 por RT-PCR.....	29
Tabela 4 -	Média (DP) de idade, distribuição de gênero e frequência de fumantes e frequência de sinais e sintomas dos pacientes de cada grupo de enxaguantes.....	30
Tabela 5 -	Média (DP) do número de cópias / uL em cada grupo, no início do estudo, imediatamente após o enxágue, 15 e 30 minutos após o enxágue.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE2	Enzima conversora de angiotensina 2
CHX	Clorexidina
COVID-19	Doença por coronavírus 19
CT	Limiar de ciclo
D	Detectável
DP	Desvio-padrão
HMSJ	Hospital Municipal São José
HUPE	Hospital Municipal Pedro Ernesto
ND	Não detectável
NSP	Proteína não estrutural
NPS	Swab nasofaríngeo
ORFs	Estruturas de leitura aberta
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase.

LISTA DE SÍMBOLOS

H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
NaClO	Hipoclorito de sódio
μL	Microlitro
mL	Mililitro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	12
1	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
1.1	Patogênese da COVID-19.....	14
1.2	Testes diagnósticos para COVID-19.....	15
1.3	Enxaguantes orais e prevenção de doenças.....	16
1.3.1	<u>Peróxido de Hidrogênio.....</u>	17
1.3.2	<u>Clorexidina.....</u>	18
1.3.3	<u>Hipoclorito de Sódio.....</u>	18
1.3.4	<u>Outras substâncias.....</u>	19
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
2.1	Desenho do estudo.....	21
2.2	Cálculo amostral.....	21
2.3	Seleção dos pacientes.....	21
2.4	Critérios de inclusão e exclusão.....	24
2.5	Prontuário do Paciente.....	24
2.6	Coleta da Saliva.....	25
2.7	Extração do ácido nucleico.....	26
2.8	Análise de dados e estatística.....	26
3	RESULTADOS.....	28
4	DISCUSSÃO.....	32
	CONCLUSÃO.....	37
	APENDICE A – Ficha de anamnese da pesquisa.....	46
	APENDICE B – Estudo 1. Aceito para publicação no Brazilian Dental Journal.....	48
	ANEXO A – Aprovação do comitê de ética em pesquisa.....	59
	ANEXO B – Aceite do estudo 1 no Brazilian Dental Journal.....	63
	ANEXO C – Estudo 2. Aceito para publicação no Oral Diseases.....	64

INTRODUÇÃO

Em 11 de Março de 2020, o então diretor geral da Organização Mundial da Saúde, Dr. Tedros Adhanom Ghebreyesus, declarou a pandemia do novo coronavírus (COVID-19) visto que, nas duas semanas anteriores, o número de casos tinha aumentado em 13 vezes na China e o número de países com casos da doença tinha triplicado (CUCINOTTA; VANELLI, 2020).

Historicamente e especialmente em 2002, 2003 e 2012, a incidência de Síndrome Respiratória Aguda Grave por coronavírus (SARS-CoV, do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome-coronavirus*) e Síndrome Respiratória do Oriente Médio por coronavírus (MERS-CoV, do inglês *Middle East Respiratory Syndrome-coronavirus*) já vinha apontando o potencial de transmissão dos novos coronavírus tanto entre humanos, quanto de animais para humanos (KSI AZEK et al, 2003; DE GROOT et al., 2013). Assim, era esperado que, logo que fora identificado, o novo coronavírus tivesse uma taxa de transmissão similar. O que não era previsível eram a gravidade dos sintomas, os grupos que seriam mais afetados, o colapso do sistema de saúde e a crise global que veio logo em seguida ao surgimento da COVID-19.

Os sintomas mais comuns da COVID-19 aparecem após um período de incubação de 5,4 dias (LI et al., 2020) e envolvem febre, fadiga, tosse seca, mialgia e dor de garganta, com prevalências de 98,6%, 69,6%, 59,4%, 34,8% e 17,4%, respectivamente (SAMPSON et al., 2020.).

O teste diagnóstico inicialmente indicado pelo governo chinês foi o teste por reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa em tempo real (RT-PCR, do inglês *real-time reverse transcription polymerase chain reaction*) (ALSHARIF; QURASHI, 2020). Porém, outros métodos também se mostraram importantes uma vez que a demanda e a necessidade de resultados cada vez mais rápidos surgiram com a propagação da doença. A tomografia computadorizada ganhou destaque na identificação de casos com alteração pulmonar e, portanto, casos de pneumonia (ALSHARIF; QURASHI, 2020). Contudo, o teste de RT-PCR ainda é o mais relevante. Apesar dos exames de imagem serem uma forma de identificação de casos mais graves usada no Brasil em momentos em que o resultado de RT-PCR seria demasiadamente demorado por conta da demanda, não são capazes de

identificar a doença ainda na fase mais inicial e de transmissão. Assim, em se tratando de saúde pública, o RT-PCR se mostra essencial como medida de contenção da COVID-19.

A cavidade oral é uma porta de entrada crítica para agentes infecciosos, virais e bacterianos. Os órgãos de saúde visam muito a higiene das mãos e dos ambientes, mas é necessário ressaltar que a boca e o nariz, fazendo parte do sistema respiratório, são estruturas importantes na disseminação e contágio de doenças como a COVID-19. Além disso, a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), que é um receptor usado pelo SARS-CoV-2 para estabelecer a infecção por meio da ligação com a proteína Spike (NAQVI et al., 2020), é considerada altamente expressa na mucosa da cavidade oral e nasal (HAMMING et al., 2004).

Desta forma, o diagnóstico da COVID-19 por meio de fluidos orais, como fluido crevicular e saliva, veio sendo testado com o intuito de chegar a um teste que fosse mais simples, que apresentasse menos incômodo e que fosse mais seguro para os profissionais de saúde (GRUPTA et al., 2021).

Além disso, diferentes formas de contenção do avanço da contaminação também foram sendo estudadas. Dentre elas, melhorias quanto à prática odontológica, uma vez que esta se apresenta como um risco para a transmissão direta, pessoa a pessoa, de SARS-CoV-2. Isso porque a geração de bioaerossóis é comum nos consultórios dentários, decorrente do uso de aparelhos ultrassônicos, seringas tríplice e alta-rotações. Frente a isto, surgiu um questionamento sobre a possível redução da carga viral através do uso de enxaguantes orais utilizados previamente aos procedimentos odontológicos.

Os objetivos desta dissertação foram: (1) comparar os resultados de RT-PCR obtidos com amostras de swab nasofaríngeo e saliva (estudo 1), e (2) investigar se algum enxaguante com antissépticos orais reduziria a carga viral de SARS-CoV-2 na saliva de pacientes positivos para a COVID-19, diminuindo assim as chances de propagação do vírus durante a atividade odontológica (estudo 2).

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Patogênese da COVID-19

A análise filogenômica revela que o SARS-CoV-2 está intimamente relacionado a família dos betacoronavírus e, semelhante aos outros coronavírus, se trata de um RNA de fita simples. O seu genoma apresenta comprimento de menos de 30 kb com 14 estruturas de leitura aberta (ORFs, do inglês *open reading frames*) e codificação de proteínas não estruturais (NSPs, do inglês *non-structural proteins*) para replicação de vírus, além de processos de montagem; proteínas estruturais, incluindo a proteína Spike, envelope, membrana /matriz, nucleocapsídeo e proteínas acessórias (MOHAMADIAN et al., 2020).

A primeira ORF do genoma se traduz em uma poliproteína pp1a ou pp1ab. Entre elas, seis NSPs (NSP3, NSP9, NSP10, NSP12, NSP15 e NSP16) desempenham papéis críticos na replicação viral (MOHAMADIAN et al., 2020).

Outras ORFs codificam proteínas estruturais e acessórias, como a proteína S. Esta é uma proteína transmembrana responsável pela ligação entre o vírus e o receptor da ACE2, expresso na superfície das células do hospedeiro. Estudos anteriores apontaram a ACE2 como um receptor funcional específico para SARS-CoV (LI et al., 2003; ZHOU et al. 2020). Além disso, ZHOU et al. 2020, demonstraram que o SARS-CoV-2 pode entrar em células que expressam ACE2, mas não em células sem ACE2 ou expressando outro receptor de coronavírus, como aminopeptidase N e dipeptidil peptidase. A expressão de ACE2 ainda foi demonstrada em células epiteliais da língua, o que reforça a perspectiva que a mucosa oral é uma via de acesso à infecção por SARS-CoV-2 (ZHONG et al., 2020). Portanto, é a proteína responsável pela contaminação propriamente dita (NI et al., 2020).

A importância da ACE2 se estende além da questão da entrada do vírus na célula humana, ensaios clínicos já haviam mostrado que o polimorfismo de inserção / deleção de ACE pode estar correlacionado com a gravidade da

Síndrome Respiratória Aguda Grave (MARSHAL et al., 2002; CRUCES et al., 2012).

A importância da mucosa oral na COVID-19 não se resume a expressão de ACE2 e, assim, a possível porta de entrada para o vírus. As condições durante e após a doença relacionada as células epiteliais da língua também são pauta de pesquisas atuais. Úlceras têm sido associadas à infecção por SARS-CoV-2, sendo então possivelmente considerada uma manifestação da COVID-19 (RIAD et al., 2020). Ademais, alterações dimensionais nas células epiteliais da língua já foram demonstradas, embora ainda haja necessidade de mais estudos (MARQUES et al., 2020).

1.2 Testes diagnósticos para a Covid-19

O RT-PCR é a versão do método PCR desenvolvida para detecção do sequenciamento genômico do RNA, sendo este um teste confiável e rápido. Esta técnica é baseada em duas reações consecutivas: a conversão do RNA em DNA complementar através de uma enzima de transcrição; e a amplificação da amostra de DNA complementar por reação em cadeia da polimerase usando primers específicos de gene e sondas de fluorescência de hidrólise marcadas. A primeira etapa produz modelos de DNA para serem usados na segunda etapa, onde o número de cópias do DNA é aumentado ao longo de repetidos ciclos (YÜCE et al., 2021; NOLAN et al., 2006). Primers específicos do gene guiam a segunda reação para a amplificação da região selecionada, enquanto as sondas produzem sinais fluorescentes a cada amplificação bem-sucedida das regiões do gene, permitindo um sistema de reação quantificável (NOLAN et al. 2006).

Assim, a detecção no método de RT-PCR se dá através das diversas regiões genômicas virais conservadas, como o gene da RNA polimerase dependente de RNA, o gene da proteína do nucleocapsídeo e o gene da proteína do envelope, que têm sido alvos dos testes moleculares (EJAZI et al., 2021). Sendo assim, por ser capaz de amplificar níveis virais baixos, é capaz também de detectar a doença em seu estágio mais inicial.

Com isso, desde o começo da pandemia, esse método de detecção vem sendo usado como padrão-ouro para o diagnóstico de COVID-19 (WANG et al., 2020; CORMAN et al., 2020). Porém, é um método que requer um profissional especializado para realizar a coleta, exige equipamento de proteção individual do mesmo, pode induzir espirro e tosse por parte da pessoa testada e, por vezes, não se obtém o consentimento do indivíduo testado para fazer uma nova coleta, o que representa um risco alto para a saúde pública (VAZ et al., 2020).

Por outro lado, o mesmo tipo de teste laboratorial poderia ser efetivo quanto a detecção de SARS-CoV-2 caso outro tipo de amostra fosse usado (VAZ et al., 2020). Nesse sentido, começaram os testes com a saliva como método alternativo, uma vez que se trata de um espécime indolor, que pode ser auto coletada, podendo inclusive ser um meio de testar crianças. Além disso, laboratorialmente é ainda uma forma mais barata de detecção do vírus, uma vez que não precisa de nenhuma solução de transporte, como precisam as técnicas de swab orofaríngeo (VAZ et al., 2020).

Porém, dependendo do tempo decorrente do início dos sintomas, o diagnóstico e o acompanhamento de indivíduos convalescentes também devem ser feitos por meio do teste de anticorpos.

Níveis altos de carga viral são detectados no trato respiratório nos estágios iniciais da doença, de cinco a seis dias dos primeiros sintomas (PAN et al., 2020). Nesses casos, o teste ideal considerado é o RT-PCR (CHAN et al., 2020; ZOU et al., 2020). Contudo, presença de anticorpos sanguíneos é uma forma indireta de avaliação da COVID-19, sendo assim indicada para períodos mais avançados com relação ao início dos sintomas e de acordo com a janela imunológica (ISLAM et al., 2020). Tanto testes rápidos, quanto testes laboratoriais vêm sendo feitos com diferentes graus de sensibilidade e especificidade.

1.3 Enxaguantes orais na prevenção da COVID-19 e outras doenças

Antes do início da pandemia, o uso de enxaguantes orais previamente aos procedimentos odontológicos já era recomendado devido à disseminação de microrganismos que pode acontecer por meio do uso de equipamentos que

produzam aerossóis. Há evidência moderada de que o uso de enxaguantes reduz significativamente o número de microrganismos quando se gera bioaerossóis em ambientes odontológicos (MARUI et al., 2019).

Além disso, as hipóteses já haviam sido levantadas com relação ao efeito virucida dos enxaguantes envolvendo mecanismos biofisiológicos, como a lise do envelope viral, deterioração das cadeias de carbono dos nucleotídeos, e impacto na inativação e/ou bloqueio de proteínas virais (KARPIŃSKI, SZKARADKIEWICZ; 2015; BAQUI et al., 2001).

Assim, algumas substâncias se mostraram possíveis coadjuvantes na prevenção de doenças, especialmente a COVID-19.

1.3.1 Peróxido de Hidrogênio

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) tem sido estudado quanto a sua efetividade contra a COVID-19, tanto com relação ao tratamento da doença, quanto com relação a sua prevenção (DOMÊNICO et al., 2021; GOTTSÄUNER et al., 2020; TREJO et al., 2021). Além disso, já havia sido demonstrado que o peróxido de hidrogênio a 3% inativou diversos tipos de vírus in vitro, sendo os vírus da influenza e o coronavírus os mais sensíveis (MARSHAL et al., 1995).

A ruptura das membranas lipídicas induzida por radicais livres de oxigênio pode ser causada por peróxido de hidrogênio (O'DONNELL et al., 2020). Ainda, em recente revisão sistemática, essa substância foi eficaz na inativação de coronavírus por agentes biocidas em testes de suspensão com concentração de 0,5% e tempo de incubação de 1 min (KAMPF et al., 2020).

Estudos imunológicos in vitro indicam que o uso de peróxido de hidrogênio nas células epiteliais do nariz, garganta e boca pode ser excepcionalmente eficaz contra vírus, incluindo coronavírus (CARUSO et al., 2020).

Entretanto, mesmo com a reação química que se baseia nas propriedades antimicrobianas do peróxido de hidrogênio, essa degradação que ocorre não é seriamente capaz de impedir uma recontaminação imediata da cavidade oral, visto que partículas de um vírus (como o SARS-CoV-2) podem eventualmente surgir de várias fontes, como secreções respiratórias, orofaringe, glândulas salivares e fluido

gengival (BADRAN et al., 2020; PALLOS et al., 2020; TO et al., 2020a; TO et al., 2020b; XU et al., 2020)

1.3.2 Clorexidina (CHX)

Em 1990, um estudo in vitro demonstrou que o efeito antiviral do enxaguante bucal com clorexidina 0,12% ocorreu rapidamente e, geralmente, a eficácia contra vírus aumentou com o tempo. Porém, a clorexidina parece não ter atividade efetiva contra vírus sem envelope, mas sim contra vírus com envelope lipídico (BERNSTEIN et al., 1990), como o SARS-CoV-2, um vírus envelopado.

Um estudo in vivo foi realizado para avaliar o efeito do enxaguatório bucal com clorexidina sobre o SARS-CoV-2. Dois pacientes hospitalizados com diagnóstico de COVID-19 usaram Clorexidina 0,12% (15 mL). Esse enxaguatório bucal foi eficaz na redução da carga viral de SARS-CoV-2 na saliva por um período de curto prazo (YOON et al., 2020), apontando a necessidade de mais estudos com essa substância.

Mais recentemente, um estudo avaliou a redução de SARS-CoV-2 em 16 pacientes positivos para a COVID-19 incluindo enxaguante com CHX. Contudo, os resultados não mostraram nenhuma redução em até 6h após o uso do enxaguante (SENEVIRATNE et al., 2021).

Por outro lado, a Diretriz para o Diagnóstico e Tratamento da Nova Pneumonia por Coronavírus (5ª edição) divulgada pela Comissão Nacional de Saúde da República Popular da China aponta que, como o SARS-CoV-2 é um vírus vulnerável à oxidação, o uso de peróxido de hidrogênio a 1% ou povidona a 0,2% seria mais recomendado que a clorexidina com o objetivo de reduzir a carga salivar de microrganismos orais, incluindo o SARS-CoV-2 (PENG et al., 2020).

1.3.3 Hipoclorito de Sódio (NaOCl)

Um estudo in vitro mostrou que o hipoclorito de sódio pode inativar diferentes vírus em diferentes concentrações, tendo uma resposta à dose observada. O mecanismo observado foi a degeneração das partículas, uma vez que houve uma mudança morfológica significativa e perda de estruturas dentro das partículas virais (SHIRAI et al., 2000).

O hipoclorito de sódio também se mostrou eficaz contra o coronavírus na higienização das mãos em duas concentrações (0,05% e 0,25%) (MA et al., 2020).

Na odontologia, o hipoclorito é utilizado na endodontia para irrigar o sistema de canais radiculares e parece ser a substância ideal para isso, pois pode dissolver o tecido necrótico (ZEHNDER, 2006). Também pode ser usado no tratamento periodontal como enxaguatório bucal (0,05% e 0,25%) para reduzir o acúmulo de biofilme supragengival, reduzir o sangramento à sondagem e a inflamação gengival (De NARDO et al., 2012; GONZALEZ et al., 2015). Assim, o hipoclorito de sódio é um agente antimicrobiano eficaz em várias concentrações, seguro e acessível, cuja efetividade contra o SARS-CoV-2 deve ser estudada.

1.3.4 Outras substâncias

Outras substâncias foram recomendadas com o intuito de reduzir a disseminação da doença logo no início da pandemia. A solução de iodopovidona chegou a ser recomendada inclusive para sprays nasais (KRONBICHLER et al., 2020). Assim como a clorexidina e o peróxido de hidrogênio, substâncias como cetilpiridínio, citrox e óleos essenciais contém moléculas antivirais. Revisões de literatura mostraram que o cetilpiridínio e a iodopovidona foram as primeiras substâncias testadas e indicadas para a redução da carga viral na saliva e, portanto, da transmissão de COVID 19 (CARROUEL et al. 2020; HERRERA et al. 2020; KUMAR et al. 2020).

Mais recentemente, Seneviratne et al. (2021) avaliaram o cloreto de cetilpiridínio e iodopovidona, além da CHX, para a redução de SARS-CoV-2 na saliva, concluindo que tanto o cloreto de cetilpiridínio quanto a iodopovidona podem apresentar uma melhora no resultado do RT-PCR salivar dos pacientes positivos em até 6 horas após o uso dos respectivos enxaguantes.

Porém, o número de indivíduos e amostras incluídos nos estudos com estas substâncias até agora é reduzido, o que aponta a necessidade de mais pesquisas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto (4.045.586) e registrado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (RBR-10hj7jyn). Um termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido de todos os participantes no estudo e uma cópia foi entregue aos mesmos.

2.1 Desenho dos estudos

Estudo 1 foi transversal e o estudo 2 foi ensaio clínico prospectivo duplo-cego não randomizado.

2.2 Cálculo amostral

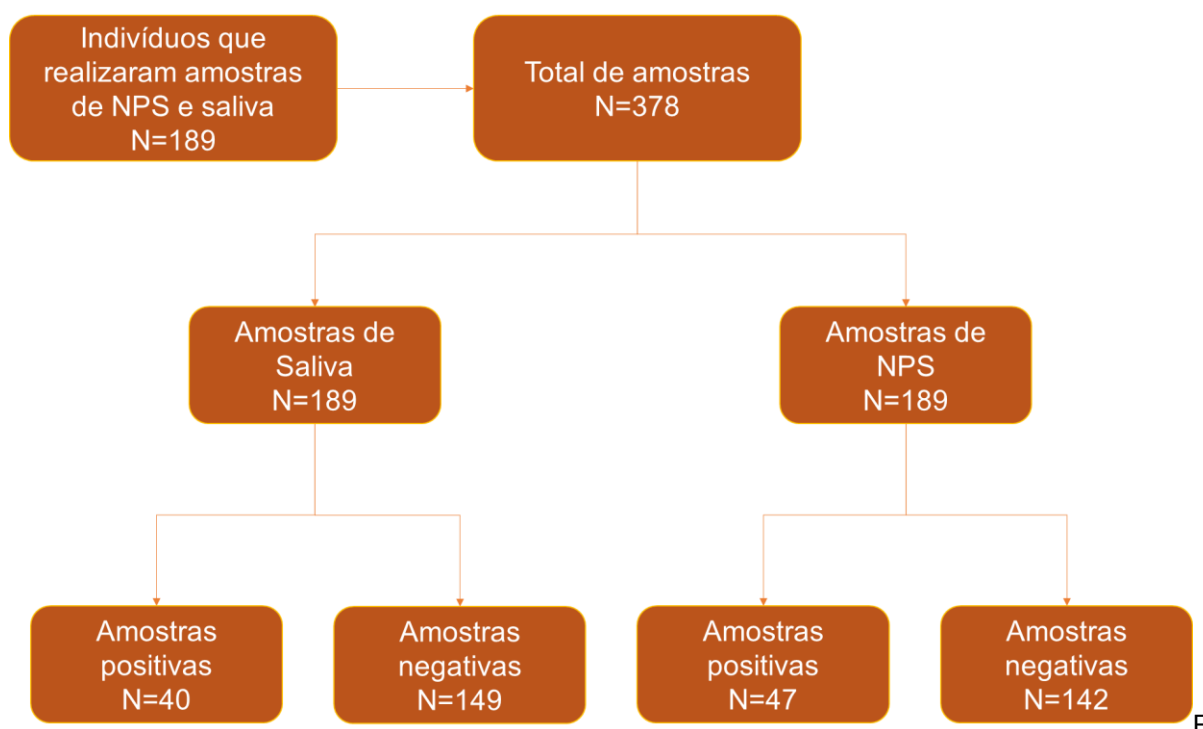
O tamanho da amostra do estudo 2 foi calculado para o desfecho primário (redução do número de cópias do SARS-CoV-2). Com base em $\alpha = 0,05$ e assumindo uma redução de 20% do número de cópias após um bochecho, um estudo com 12 pacientes em cada grupo teria 80% de poder para detectar diferenças significativas. Este ensaio clínico em humanos foi realizado em conformidade com as diretrizes CONSORT (referenciar CONSORT).

2.3 Seleção dos pacientes

Trezentos e setenta e seis indivíduos recrutados foram provenientes do ambulatório de testagem para a COVID-19 da Policlínica Piquet Carneiro, das enfermarias especializadas em COVID-19 do Hospital Universitário Pedro Ernesto e do Hospital Municipal São José, Rio de Janeiro, Brasil.

Dos 376 indivíduos, 189 eram provenientes da Policlínica Piquet Carneiro e, portanto, tiveram amostras de NPS coletadas no mesmo momento da coleta de saliva. Assim, as 378 amostras (189 de NPS e 189 de saliva) foram analisadas para a comparação dos resultados das mesmas, como demonstra a figura 1 (estudo 1).

Figura 1 – Fluxograma da seleção dos indivíduos que tiveram as amostras de NPS e saliva (estudo 1).

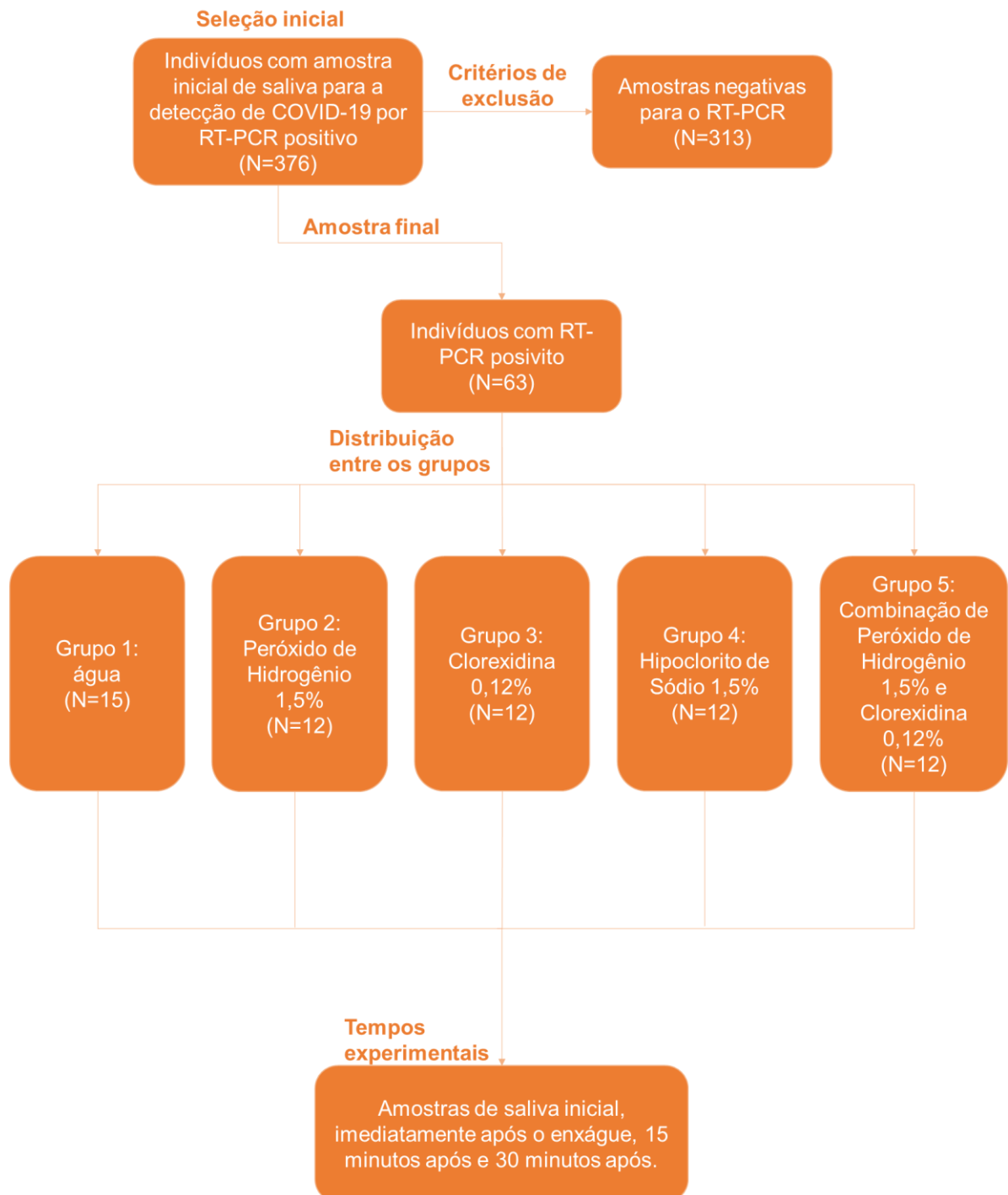


Fonte: A autora, 2022.

Contudo, pacientes oriundos do Hospital Municipal São José tiveram o resultado do RT-PCR apenas a partir das amostras de saliva, realizadas antes do uso do enxaguante. Desta forma, estes indivíduos tiveram suas amostras utilizadas apenas para avaliar a eficácia das soluções enxaguatórias. Os pacientes do Hospital Universitário Pedro Ernesto realizaram NPS previamente às coletas com um intervalo de no máximo 7 dias sendo direcionados, assim como os pacientes do Hospital Municipal São José, apenas para estudo 2.

Os pacientes que atenderam aos critérios da pesquisa foram convidados a participar voluntariamente da mesma, sendo alocados em 5 grupos diferentes de acordo com a solução enxaguatória, como demonstra a figura 2.

Figura 2 – Fluxograma da seleção dos indivíduos que tiveram as amostras pós uso de antissépticos orais analisadas (estudo 2).



Fonte: A autora, 2022.

2.4 Critérios de inclusão e exclusão

Para ser incluído no estudo 1, era necessário realizar um exame de RT-PCR por NPS (por ter tido pelo menos um sintoma de COVID-19 no momento da coleta ou até 14 dias anteriormente ou ter tido contato com alguém positivo para a doença). Já para ser incluído no estudo 2, era necessário ter a amostra inicial de saliva positiva através do RT-PCR.

Os critérios de exclusão foram pacientes sem amostras de NPS para o estudo 1. Para o estudo 2, amostras iniciais de saliva negativadas, ausência de sinais ou sintomas de COVID-19 e/ou contato com alguém positivo para a doença.

2.5 Prontuário dos pacientes

Para cada um dos participantes do estudo foi preenchida uma ficha contendo dados pessoais e anamnese. Os dados pessoais coletados incluíram: identificação do paciente, data de nascimento, endereço, autodeclaração de raça, local onde foi o atendimento, gênero, certificado de pessoa física, endereço e contato telefônico.

A anamnese incluía as seguintes perguntas tanto para o grupo teste quanto para o grupo controle: se tinha ou se já havia tido diagnóstico de hipertensão, problemas cardíacos, diabetes mellitus, problemas respiratórios ou alérgicos, HIV ou qualquer outro problema de saúde que fosse de conhecimento do paciente. Foi questionado, ainda, se o paciente fazia uso de algum medicamento, se era tabagista ou ex-tabagista. Para mulheres, foi questionada a possibilidade de gestação.

Quanto às questões relacionadas à COVID-19, foi perguntado se o paciente teve: febre, crises respiratórias (tais como tosse ou dificuldade de respirar), mal-estar, perda de olfato e paladar e/ou dores abdominais no momento da coleta ou nos últimos 14 dias.

2.6 Coleta de saliva

Inicialmente, 376 indivíduos entraram no estudo. Os indivíduos produziram uma amostra inicial de saliva não estimulada – nenhum dispositivo mastigatório foi utilizado para estimular a salivação – e sem terem se alimentado por pelo menos 30 minutos antes da coleta. As amostras iniciais foram testadas para a presença de SARS-CoV-2 por ensaio de RT PCR. O restante das amostras foi armazenado em tubo estéril individual (estudos 1 e 2).

No estudo 2, após a coleta da primeira amostra, todos os indivíduos foram solicitados a enxaguar com o antisséptico bucal designado por um minuto. Três amostras adicionais de saliva foram coletadas: imediatamente após o enxágue, 15 minutos após o enxágue e 30 minutos após o enxágue. Todas as amostras foram codificadas e imediatamente colocadas em gelo e, posteriormente, armazenadas em freezer (-80°C) até a extração do RNA.

Os pacientes não sabiam qual enxaguante estavam usando. Os códigos foram ocultados de todos os pacientes e funcionários do laboratório diretamente envolvidos no estudo até que as análises estatísticas fossem concluídas.

Se as amostras de saliva iniciais fossem positivas para a presença de SARS-CoV-2, as 3 amostras adicionais de saliva coletadas do paciente eram analisadas posteriormente. 63 das 376 amostras de saliva pré-enxágue dos indivíduos tiveram resultados positivos. Assim, estas amostras foram separadas em 5 grupos, de acordo com o enxaguatório bucal utilizado. O grupo 1 (controle) recebeu 15 mL de água, o grupo 2 recebeu 15 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 1,5%, preparado diluindo em 50:50 com H_2O , o grupo 3 recebeu 15 mL de clorexidina 0,12% (Perioxidin, Lacer, São Paulo, Brasil), o grupo 4 recebeu 15 mL de hipoclorito de sódio 0,1% (NaClO), preparado pela diluição de 2,5mL de hipoclorito de sódio (NaClO 5-6%) em 125 mL de H_2O , e o grupo 5 recebeu 15 mL de HP 1,5% por um minuto seguido de 15 mL de clorexidina 0,12% (H_2O_2 + CHX) por um minuto (Figura 1). Cada enxaguatório bucal foi administrado em um dia específico da semana.

2.7 Extração do ácido nucleico

A extração de ácido nucleico total foi realizada a partir de 200 µl de meio de transporte viral usando o kit de isolamento Bio-Gene DNA / RNA Viral Extraction (Bioclin® Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) seguindo o protocolo do fabricante.

Os resultados foram detectados pela técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa da transcriptase reversa (RT-qPCR) com sequências de primers e sondas do kit molecular SARS-CoV-2 (E) Bio-Manguinhos do Protocolo de Berlim. A metodologia de amplificação específica do alvo com sondas marcadas com fluorescência foi usada para determinar a presença do gene do envelope (E) de SARS-CoV-2 e de RNase P humana como controle de extração. O equipamento utilizado na etapa de amplificação e detecção foi o *7500 RT PCR System (Applied Biosystems™ Waltham, Massachusetts, USA)* e os ensaios RT-qPCR para detecção de RNA de SARS-CoV-2 sendo realizados a partir de amostras de saliva. Noventa amostras foram repetidas aleatoriamente (teste de Pearson = 0,9911) e retestadas com BIOMOL One Step / Covid-19 ORF1ab e alvos de genes N (teste de Pearson: gene E vs. Orf1ab = 0,9771 e E vs. N = 0,9795) para correlacionar os resultados de limiar de ciclo (CT, do inglês *Cycle Threshold*) entre diferentes alvos gênicos e garantir a reprodutibilidade entre os ensaios durante RT-qPCR. O limite de detecção de CT foi de 42. Os valores de CT foram convertidos para o número de cópias / µL, usando a seguinte fórmula (número de cópias / µL = $-107 \cdot \text{LN}(\text{valor de CT}) + 5,107$).

Todo processo de análises laboratoriais foi realizado no Laboratório de Histocompatibilidade e Criopreservação (HLA-UERJ).

2.8 Análise de dados e estatística

O programa estatístico “*Statistical Package for Social Science*” (SPSS) versão 23.0 foi utilizado para a análise dos dados. No estudo 1, o teste t de Student pareado foi usado para comparar os valores de CT de amostras positivas de NPS e saliva. O teste qui-quadrado foi usado para comparar as frequências dos sintomas em pacientes de acordo com a detecção de COVID-19 de NPS e saliva.

Já no estudo 2, o teste de Kolmogorov-Smirnov indicou que os dados foram distribuídos normalmente. O teste ANOVA com correção de Dunn foi utilizado para verificar diferenças entre o número de cópias / μL e a idade em cada período experimental. Um teste ANOVA de 2 fatores avaliou a interação entre o tempo de observação e o tipo de enxaguatório bucal. O teste do qui-quadrado avaliou diferenças na frequência de sinais e sintomas relacionados ao COVID-19 entre os 5 grupos. O nível de significância considerado para ambos os estudos foi de 5%.

3 RESULTADOS

Cento e oitenta e nove pacientes foram incluídos no estudo 1 (média idade: 39,6; DP 12,3), sendo 54 homens e 143 mulheres, com 378 amostras (189 saliva e 189 amostras de NPS). Entre as 189 amostras de NPS, 142 tiveram um resultado não detectável (ND), enquanto 47 tiveram um resultado detectável (D). Além disso, entre as 142 ND, 137 (94,4%) amostras de saliva obtiveram o mesmo resultado, enquanto 5 amostras (3,4%) eram D. Dentre as 47 amostras de NPS D, 35 (74,4%) apresentaram o mesmo resultado das amostras de saliva. O valor de sensibilidade do teste foi de 0,74 e a especificidade foi de 0,97. Os valores preditivos positivo e negativo foram 0,88 e 0,92, respectivamente. A concordância entre as amostras de NPS e saliva foi de 91% (172/189) (Tabela 1).

Tabela 1 – amostras de NPS e saliva para SARS CoV-2 por RT-PCR de pacientes ambulatoriais sintomáticos.

		Amostras de NPS		
		Positivo	Negativo	total
Amostras de saliva	Positivo	35	5	40
	negativo	12	137	149
	total	47	142	189

Fonte: A autora, 2022.

Uma frequência significativamente maior de pacientes referindo perda de olfato e paladar ($p = 0,003$), febre ($p = 0,003$), e indisposição ($p = 0,02$) foi observada em amostras positivas em comparação com NPS negativo (Tabela 2). Na saliva, uma frequência significativamente maior de pacientes referindo febre ($p = 0,03$) e mal-estar ($p = 0,03$) foi observada em amostras positivas em comparação com amostras negativas (Tabela 3). Entre as 35 amostras positivas de NPS e saliva ($n = 35$), a média (DP), os valores do CT de RT-PCR foram 27,8 (4,3) e 30,6 (5,1), respectivamente ($p = 0,007$).

Tabela 2 – Média (DP) da idade, distribuição de gênero e frequência dos sintomas dos pacientes não hospitalizados com amostras nasofaríngeas positivas e negativas para o teste de COVID-19 por RT-PCR.

	Total (n=189)	NPS + (n=47)	NPS - (n=142)	p value
Idade	39,2 (11,5)	39,5 (12)	38,1 (9,8)	0,45
Mulheres n (%)	141 (74,6)	34 (72,3)	107 (74)	0,7
Tabagismo n (%)	11 (5,8)	0 (0)	11 (7,7)	0,17
Mal-estar n (%)	146 (77,2)	42 (89,4)	104 (73,2)	0,02
Tosse n (%)	128 (67,7)	33 (70,2)	95 (67)	0,67
Perda de olfato e/ou paladar n (%)	71 (37,5)	26 (55,3)	45 (31,7)	0,003
Dor abdominal n (%)	70 (37)	18 (38,3)	52 (36,6)	0,83
Febre n (%)	86 (45,5)	30 (63,8)	56 (39,4)	0,003

Fonte: A autora, 2022.

Tabela 3 – Média (DP) da idade, distribuição de gênero e frequência dos sintomas dos pacientes não hospitalizados com amostras de saliva positivas e negativas para o teste de COVID-19 por RT-PCR.

	Total (n=189)	saliva + (n=40)	Saliva - (n=149)	p valor
Idade	39,2 (11,5)	38,3 (10,2)	39,4 (11,8)	0,6
Mulheres n (%)	139 (73,5)	30 (75)	109 (73,2)	0,8
Tabagismo n (%)	11 (5,8)	0 (0)	11 (7,4)	0,26
Mal-estar n (%)	149 (78,8)	36 (90)	110 (73,8)	0,03
Tosse n (%)	128 (67,7)	26 (65)	102 (68,5)	0,67
Perda de olfato e/ou paladar n (%)	71 (37,6)	20 (50)	51 (34,2)	0,06
Dor abdominal n (%)	70 (37)	15 (37,5)	55 (36,9)	0,95
Febre n (%)	86 (45,5)	24 (60)	62 (41,6)	0,03

Fonte: A autora, 2022.

Legenda: Saliva + = indivíduos que testaram positivo no teste da saliva; Saliva - = indivíduos que testaram negativo no teste salivar; p-valor = diferenças entre amostras positivas e negativas.

No estudo 2, não houve diferença significativa entre os grupos para sexo, idade média, número de fumantes ou frequência de sinais e sintomas relacionados ao COVID-19 (Tabela 4).

Tabela 4 - Média (DP) da idade, distribuição de gênero e frequência de: tabagistas, sinais e sintomas em pacientes de cada grupo.

	Grupo 1 Placebo (n=15)	Grupo 2 H ₂ O ₂ (n=12)	Grupo 3 CHX (n=12)	Grupo 4 NaClO (n=12)	Grupo 5 HP+ CHX (n=12)	p valor
Idade média (DP)	51 (17,8)	37,8 (11)	46 (15,7)	55 (17,3)	40,4 (14,8)	0,06
Gênero Feminino n (%)	11 (68,8)	9 (75)	4 (33,3)	6 (50)	8 (66,7)	0,21
Tabagismo n (%)	1 (6,3)	0 (0)	4 (33,3)	4 (33,3)	4 (33,3)	0,18
Febre n (%)	12 (75)	7 (58,3)	7 (58,3)	6 (50)	12 (100)	0,19
Tosse n (%)	11 (68,8)	8 (66,7)	8 (66,7)	9 (75)	10 (83,3)	0,87
Mal-estar n (%)	15 (93,8)	12 (100)	8 (66,7)	11 (91,7)	11 (91,7)	0,21
Perda de olfato e paladar n (%)	6 (37,5)	4 (33,3)	8 (66,7)	7 (58,3)	8 (66,7)	0,26
Dor abdominal n (%)	7 (43,8)	6 (50)	2 (16,7)	4 (33,3)	5 (41,7)	0,48

Fonte: A autora, 2022.

Legenda: H₂O₂ = 1,5 peróxido de hidrogênio, CHX = 0,12% Clorexidina, 0,1% NaClO = hipoclorito de sódio

Nota: # O teste ANOVA com correção de Dunn foi usado para verificar diferenças na média de idade e o teste Qui-quadrado para verificar diferenças na frequência de fumantes e na frequência de sintomas.

O teste ANOVA de 2 vias indicou uma interação entre o tempo de observação e o tipo de enxaguatório bucal ($F = 1.936$, $p = 0,047$). Não houve redução dos valores médios do número de cópias / μL dos grupos 1, 3 e 5 ao longo do tempo. O Grupo 2 (1,5% HP) apresentou redução significativa após 30 minutos ($p = 0,02$), enquanto o Grupo 4 (NaClO 0,1%) apresentou redução significativa ($p = 0,03$) imediatamente após o enxágue. Em comparação ao grupo controle, nenhum grupo experimental demonstrou redução significativa da carga viral (Tabela 5).

Observou-se ainda que alguns pacientes apresentaram aumento no número de cópias / μL de SARS-CoV-2 imediatamente após o bochecho inicial. Nos grupos 2 e 3 e 4, 12 indivíduos (33%) apresentaram esse aumento. Nos grupos 4 e 5, o aumento correspondente foi observado em um paciente (8,3%) (Tabela 5).

Tabela 5 - Média (DP) do número de cópias/ μL em cada grupo, inicialmente, imediatamente após, 15 e 30 minutos após o enxágue, imediatamente após, 15 e 30 minutos após o enxágue.

	Grupo 1 Placebo (n=15)	Grupo 2 H_2O_2 (n=12)	Grupo 3 CHX (n=12)	Grupo 4 NaClO (n=12)	Grupo 5 $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{CHX}$ (n=12)	p valor 1
Nº cópias/μL inicial	$152 \pm 16 \times 10^5$	$163 \pm 21 \times 10^5$	$151 \pm 14 \times 10^5$	$151 \pm 14 \times 10^5$	$153 \pm 16 \times 10^5$	0.33
Nº cópias/μL imediatamente após	$152 \pm 28 \times 10^5$	$159 \pm 18 \times 10^5$	$151 \pm 17 \times 10^5$	$137 \pm 21 \times 10^{5*}$	$146 \pm 16 \times 10^5$	0.07
Nº cópias/μL 15 min após	$156 \pm 25 \times 10^5$	$152 \pm 15 \times 10^5$	$149 \pm 19 \times 10^5$	$144 \pm 24 \times 10^5$	$148 \pm 13 \times 10^5$	0.56
Nº cópias/μL 30 min após	$149 \pm 22 \times 10^5$	$149 \pm 19 \times 10^{5*}$	$145 \pm 18 \times 10^5$	$144 \pm 20 \times 10^5$	$149 \pm 16 \times 10^5$	0.94
p valor 2	NS	0.02	NS	0.03	NS	

Fonte: A autora, 2022.

H_2O_2 = 1,5% peróxido de hidrogênio, CHX = 0,12% Clorexidina, 0,1% NaClO = hipoclorito de sódio

p-valor 1 = Teste ANOVA com correção de Dunn

p-valor 2 = Teste ANOVA de medidas repetidas

* Significativamente menor em comparação com os valores iniciais

4 DISCUSSÃO

No estudo 1, a sensibilidade e especificidade foram 0,74 e 0,97, respectivamente. Os valores preditivos positivo e negativo foram 0,88 e 0,92, respectivamente. A concordância entre as amostras de NPS e saliva foi de 91% (172/189). Dois estudos compararam amostras de saliva e NPS quanto a detecção de SARS-CoV-2 (JAMAL et al., 2020; LANDRY et al., 2020). Landry et al. (2020) testaram amostras pareadas de NPS / saliva, em um estudo transversal incluindo 124 pacientes ambulatoriais sintomáticos. Destes 124, 28 foram positivos para saliva e amostras de NPS. Dois pacientes foram negativos para amostras de NPS e positivos para amostras de saliva, enquanto 5 foram positivos apenas para a amostra NPS. A concordância geral entre as amostras de NPS e saliva foi de 94,4%, corroborando com os resultados da presente dissertação (91%). A sensibilidade para a saliva era de 0,85. Ambos os estudos não relataram valores preditivos positivos e negativos. Jamal et al. (2020) examinaram 91 pacientes internados com COVID-19 e testaram os pares de amostras NPS / saliva de cada paciente usando RT-PCR. Eles relataram que a sensibilidade foi de 0,89 para amostras de NPS e 0,72 para amostras de saliva. É possível calcular os valores preditivos positivos e negativos, e concluir que eles foram de 0,84 e 0,48, respectivamente. As diferenças quando comparadas aos resultados da presente dissertação podem ser relacionadas aos diferentes períodos em que as amostras foram coletadas após o início da doença.

To et al. (2020) verificaram a presença do vírus na saliva, mas não compararam as amostras de NPS e saliva. Os autores examinaram 12 pacientes hospitalizados com SARS-CoV-2. Embora o tamanho amostral fosse considerado pequeno, houve confirmação do diagnóstico em laboratório, apontando que 11 amostras de saliva também deram resultado positivo para detecção do vírus.

Wyllie et al. (2020) tiveram como objetivo validar o uso da saliva para detecção do SARS-CoV-2. Os autores encontraram uma sensibilidade na detecção de SARS-CoV-2 na saliva superior à de amostras de NPS no início da hospitalização e resultados ainda mais consistentes durante a hospitalização prolongada e recuperação.

Mais recentemente, Sakanashi et al. (2021) utilizaram 12 amostras de NPS pareados às amostras de saliva coletados de pacientes em vários momentos após o início dos sintomas. Seus resultados sugeriram que as amostras de saliva eram uma alternativa prática não invasiva quando comparada ao NPS na detecção de SARS-CoV 2 usando RT-PCR.

Com uma amostra mais significativa, outro estudo testou saliva combinada em 449 indivíduos, usando valores de CT de RT-PCR, assim como nesta dissertação, porém, encontraram que o teste de saliva não era tão sensível quanto teste nasofaríngeo (BARAT et al., 2021).

Os valores do CT foram significativamente menores nas amostras de NPS do que nas amostras de saliva, semelhante ao que já havia sido descrito por Williams et al. (2020) e Landry et al. (2020). Assim, a saliva é considerada um fluido biológico que pode ser usado como uma técnica de diagnóstico não invasiva, podendo ser auto coletada, não causando desconforto e protegendo os profissionais de saúde, diminuindo ainda o custo de ter uma equipe especializada.

No estudo 2, o Grupo 2 (1,5% HP) apresentou redução significativa após 30 minutos ($p = 0,02$), enquanto o Grupo 4 (NaClO 0,1%) apresentou redução significativa ($p = 0,03$) imediatamente após o enxágue. No entanto, em comparação ao grupo controle, nenhum grupo experimental demonstrou redução significativa da carga viral. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Chaudhary et al. (2021). Os autores mostraram uma redução mediana semelhante na carga viral de SARS-CoV-2 na saliva de pacientes com COVID-19 após 15 e 45 minutos após uma lavagem inicial com solução salina, peróxido de hidrogênio 1%, clorexidina 0,12% e 0,5 % iodopovidona. Todos os 4 enxaguatórios orais reduziram a carga viral em 61% a 89% após 15 min. No entanto, não houve diferenças entre os 4 grupos. No estudo 2 desta dissertação, a redução da carga viral variou de 0,4% a 4,2% imediatamente após o enxágue e de -0,2% a 7,1% após 15 min. Essas diferenças na redução mediana da carga viral podem estar relacionadas ao método de enxágue. Em estudo semelhante ao nosso, os pacientes enxaguaram com 7,5 ml do bochecho por 30 segundos, expectoraram e enxaguaram os 7,5 ml restantes por 30 segundos (CHAUDHARY et al. 2021). No presente estudo, os pacientes fizeram bochechos por 1 minuto, sem intervalo. A ausência de diferenças significativas entre os grupos experimental e controle pode estar relacionada ao número de pacientes em cada grupo. Um cálculo amostral de poder foi realizado antes do início do estudo e indicou

que seriam necessários 12 pacientes em cada grupo para verificar uma redução de 20% na carga viral de SARS-CoV-2 na saliva. No entanto, esse cálculo foi baseado em números hipotéticos, pois não havia estudo anterior que avaliasse essa possível redução da carga viral. Com base nos resultados deste estudo, o poder foi de 0,51. Chaudhary et al. (2021) também usaram um cálculo de poder semelhante e selecionaram 41 pacientes divididos em 4 grupos. Neste estudo, foram incluídos 63 pacientes divididos em 5 grupos. Ambos os estudos não observaram diferenças entre os grupos controle e experimental.

Há estudos avaliando a eficácia dos enxaguantes orais na prevenção de doenças (CHAUDHARY et al. 2021; GOTTSÄUNER, et al., 2020; SENEVIRATNE et al., 2021). Contudo, há uma limitação comum a maioria dos estudos, a avaliação aconteceu através de unidades formadoras de colônias bacterianas e não através da avaliação da redução de aerossol contaminado (EGGERS et al., 2018, NAGRAJ et al., 2020). Esta forma de avaliação não permite que se mensure a redução dos níveis de contaminação virais e fúngicas. Além disso, não se pode afirmar a influência destes resultados em aerossóis e, portanto, na contaminação através de procedimentos odontológicos (NAGRAJ et al., 2020).

As autoridades de saúde em diferentes países já recomendavam o uso de enxágue antisséptico antes dos procedimentos em consultório, especialmente durante a atual pandemia, esta recomendação foi intensificada (HERRERA et al., 2020). Os agentes mais frequentemente recomendados são peróxido de hidrogênio, iodopovidona e clorexidina (IZZETTI et al., 2020). No entanto, essas recomendações foram baseadas principalmente em estudos in vitro (HERRERA et al., 2020).

Esta dissertação inclui um estudo in vivo, onde a solução de NaClO usada como enxaguante bucal pré-procedimento reduziu significativamente a carga viral imediatamente após o enxaguante inicial (Tabela 5). As soluções de NaClO apresentam algumas vantagens: são baratas, prontamente disponíveis e oferecem uma eficácia não específica de amplo espectro em todos os microrganismos, incluindo esporos e vírus, além de serem usadas amplamente na odontologia (ZEHNDER, 2006). Gonzales et al. (2015) observaram que o enxágue com NaClO 0,25% por 25 semanas produziu uma redução no sangramento na sondagem por causa dos efeitos antiplaca e, portanto, antigengivite. Um estudo in vitro mostrou que o NaClO pode inativar diferentes vírus em diferentes concentrações, onde mecanismo observado foi a degeneração das partículas, pois houve uma mudança

morfológica e perda de estrutura dentro das partículas virais (SHIRAI et al. 2000). Atualmente, o NaClO também se mostrou eficaz contra a SARS-CoV-2 na higienização das mãos em duas concentrações (0,05% e 0,25%) (MA et al.2020).

Por outro lado, o enxaguante contendo 1,5% de H_2O_2 reduziu significativamente a carga viral 30 minutos após o uso enxaguante em comparação com a carga viral observada no início do estudo (Tabela 5). Uma vez que o SARS-CoV-2 é vulnerável à oxidação, um enxaguatório bucal pré-procedimento contendo agentes oxidantes, como H_2O_2 , pode ser recomendado (PENG et al., 2020). Gottsauner et al. (2020) concluíram, em um estudo piloto, que gargarejar com 1% de H_2O_2 não diminui a carga viral intraoral após 30 minutos em indivíduos positivos para COVID-19. Além disso, na odontologia, o H_2O_2 é amplamente usado como um agente para o clareamento dental por causar a ruptura das membranas lipídicas induzida por radicais livres de oxigênio e (O'DONNELL et al., 2020). Em uma recente revisão sistemática, o H_2O_2 foi considerado eficaz na inativação de coronavírus por agentes antimicrobiano em testes de suspensão, com concentração de 0,5% e tempo de incubação de 1 min (HERRERA et al., 2020). Porém, o H_2O_2 é rapidamente inativado pela catalase na saliva e peroxidases endógenas no ambiente oral (O'DONNELL et al., 2020). Mesmo assim, estudos imunológicos in vitro ilustram claramente que o uso de H_2O_2 nas células epiteliais do nariz, garganta e boca pode ser excepcionalmente eficaz contra vírus, incluindo coronavírus (CARUSO et al., 2020). No entanto, mesmo com as propriedades antimicrobianas do H_2O_2 , a recontaminação imediata da cavidade oral ocorre à medida que partículas de um vírus como o SARS-CoV-2 emanam rapidamente de fontes, como secreções respiratórias, orofaringe, glândulas salivares e fluido gengival (BADRAN et al., 2020; PALLOS et al., 2020; PARK & PARK, 1989; TO et al., 2020a; TO et al., 2020b; XU et al., 2020).

CHX 0,12% usada como um único enxaguatório oral ou em combinação com HP 1,5% não reduziu a carga viral de SARS-CoV-2 (Tabela 2). CHX é um antisséptico biguanida com ampla atividade antimicrobiana contra bactérias, vírus e leveduras (Herrera et al., 2020). Uma revisão sistemática recente indicou que o uso de CHX como enxaguatório bucal pré-procedimento reduziu significativamente a carga bacteriana em aerossol dental (MARUI et al., 2019). Foi relatado que CHX tem uma atividade virucida eficaz em vírus com envelope, como vírus herpes simplex 1 e 2, citomegalovírus, influenza A e hepatite B (BAQUI et al., 2001; BERNSTEIN et al.,

1990). Um estudo in vitro indicou que CHX 0,12% pode reduzir a concentração viral de vírus com envelope, mas não sem envelope (BERNSTEIN et al., 1990). Peng et al. (2020) indicou que CHX pode não ser eficaz em matar o vírus SARS-CoV-2. Há uma ausência de dados in vivo sobre o uso de enxaguantes com CHX para reduzir a carga viral relacionada ao SARS-CoV-2. Yoon et al. (2020) avaliaram o efeito do enxaguatório bucal com CHX no SARS-CoV-2. Dois pacientes hospitalizados com diagnóstico de COVID-19 usaram 0,12% de CHX (15 ml), concluindo que este antisséptico bucal foi eficaz na redução da carga viral da SARS-CoV-2 na saliva por um curto período. No entanto, este estudo teve algumas limitações, incluindo o pequeno número de amostras analisadas e a ausência de um grupo controle.

Observou-se que as amostras de saliva de alguns pacientes mostraram um aumento no número de cópias do SARS-CoV-2 imediatamente após o enxágue bucal inicial. Nos grupos 2 e 3, 4 dos 12 pacientes (33%) demonstraram esse aumento. Nos grupos 4 e 5, apenas um em 12 pacientes (8,3%) apresentou aumento. O enxágue bucal induz a descamação de células epiteliais orais e a lise das células infectadas pode liberar material genético na cavidade oral. Esta eliminação pode explicar o aumento inicial de cópias/uL de SARS-CoV-2 em certos pacientes e porque a redução média da carga viral nos grupos 2 e 3 só foi estatisticamente significativa após 30 minutos. Como a CHX pode ter reduzido a descamação epitelial por meio da estabilização da membrana celular, os pacientes com aumento inicial no material genético viral foram observados com menos frequência nos grupos 3 e 5. Dez amostras de saliva do grupo 2 (H₂O₂) foram submetidas à cultura viral, usando um ensaio de placa para avaliar se o vírus vivo era evidente nas amostras após o enxágue. Neste ensaio, a infecciosidade viral foi detectada por focos de lise de células aderentes em placas de cultura suscetíveis à infecção por um vírus. Mesmo quando os focos de lise celular eram evidentes, nenhuma placa com morfologia sugestiva de placas de SARS-CoV-2 pôde ser identificada. Assim, foi impossível confirmar a presença de partículas virais infecciosas de SARS-CoV-2 em culturas de amostras de enxágue oral de H₂O₂.

CONCLUSÃO

A detecção de Sars-CoV-2 por RT-PCR em amostras de saliva mostrou alta sensibilidade e especificidade quando comparada com swabs nasofaríngeos. Além disso, o enxaguatório bucal contendo NaClO 0,1% reduziu a carga viral imediatamente após o enxágue, enquanto o enxaguatório com 1,5% de H₂O₂ reduziu a carga viral 30 minutos após o enxágue inicial em comparação com seus valores basais. Porém, nenhum grupo experimental demonstrou redução significativa da carga viral em relação ao grupo controle.

REFERÊNCIAS

- ALSHARIF, W.; QURASHI, A. Effectiveness of COVID-19 diagnosis and management tools: A review. **Radiography**, v. 27, n.2, p. 682-687, maio 2021. doi: 10.1016/j.radi.2020.09.010.
- BADRAN, Z.; GAUDIN, A.; STRUILLOU, X.; AMADOR, G.; SOUEIDAN, A. Periodontal pockets: A potential reservoir for SARS-CoV-2? **Medical Hypotheses**, v. 143, p. 109907, out 2020. doi: 10.1016/j.mehy.2020.109907.
- BAQUI, A. A. M. A.; KELLEY, J. I.; JABRA-RIZK, M. A.; DEPAOLA, L. G.; FALKLER, W. A.; MEILLER, T. F. In vitro effect of oral antiseptics on human immunodeficiency virus1 and herpes simplex virus type 1. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 28 n. 7, p. 610–616, 2001. doi:10.1034/j.1600-051x.2001.028007610.x
- BARAT, B.; DAS, S.; DE GIORGI, V.; HENDERSON, D.K.; KOPKA, S.; LAU, A.F.; MILLER, T.; MORIARTY, T.; PALMORE, T.N.; SAWNEY, S.; SPALDING, C.; TANJUTCO, P.; WORTMANN, G.; ZELAZNY, A.M.; FRANK, K.M. Pooled Saliva Specimens for SARS-CoV-2 Testing. **Journal of clinical microbiology**, v. 59, n. 3, p. e02486-20, 2021. doi: 10.1128/JCM.02486-20.
- BERNSTEIN, D.; SCHIFF, G.; ECHLER, G.; PRINCE, A.; FELLER, M.; BRINER, W. In vitro Virucidal Effectiveness of a 0.12%-Chlorhexidine Gluconate Mouthrinse. **Journal of Dental Research**, v. 69, n. 3, p. 874–876, 1990. doi:10.1177/00220345900690030901.
- CARROUEL, F.; CONTE, M.P.; FISHER, J.; GONÇALVES, L.S.; DUSSART, C.; LLODRA, J.C.; BOURGEOIS, D. COVID-19: a recommendation to examine the effect of mouthrinses with β -cyclodextrin combined with citrox in preventing infection and progression. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 4, p. 1126, abr 2020. doi: 10.3390/jcm9041126.
- CARUSO, A. A.; DEL PRETE, A.; LAZZARINO, A. I. Hydrogen peroxide and viral infections: A literature review with research hypothesis definition in relation to the current covid-19 pandemic. **Medical Hypotheses**, v. 144, p. 109910, nov 2020. doi:10.1016/j.mehy.2020.109910.
- CHAN, J. F.-W.; YIP, C. C.-Y.; TO, K. K.-W.; HING-CHEUNG TANG, T.; WONG, S. C.-Y.; LEUNG, K.-H.; FUNG AY, NG AC, ZOU Z, TSOI HW, CHOI GK, TAM AR, CHENG VC, CHAN KH, TSANG OT, YUEN KY. Improved Molecular Diagnosis of COVID-19 by the Novel, Highly Sensitive and Specific COVID-19-RdRp/HeI Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay Validated In Vitro and with Clinical Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n. 5, p. e00310–e00320, abr 2020. doi: 10.1128/JCM.00310-20.
- CHAUDHARY, P.; MELKONYAN, A.; MEETHIL, A.; SARASWAT, S.; HALL, D.L.; COTTLE, J.; WENZEL, M.; AYOUTY, N.; BENISE, S.; CASANOVA, F.; CHANEY, M.; CHASE, H.; HERMEL, R.; MCCLEMENT, M.; SESSON, C.; WOOLSEY, B.; KUMAR P. Estimating salivary carriage of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in

nonsymptomatic people and efficacy of mouthrinse in reducing viral load: A randomized controlled trial. **The Journal of the American Dental Association**, v. 152, n. 11, p. 903-908, nov 2021. doi: 10.1016/j.adaj.2021.05.021

CORMAN, V.M.; LANDT, O.; KAISER, M.; MOLENKAMP, R.; MEIJER, A.; CHU, D.K.; BLEICKER, T.; BRÜNINK, S.; SCHNEIDER, J.; SCHMIDT, M.L.; MULDER, D.G.; HAAGMANS, B.L.; VAN DER VEER, B.; VAN DEN BRINK, S.; WIJSMAN, L.; GODERSKI, G.; ROMETTE, J.L.; ELLIS, J.; ZAMBON, M.; PEIRIS, M.; GOOSSENS, H.; REUSKEN, C.; KOOPMANS, M.P.; DROSTEN, C. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. **Eurosurveillance**, v. 3, n. 25, p. 1–8, jan 2020. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.

CRUCES, P.; DÍAZ, F.; PUGA, A.; ERRANZ, B.; DONOSO, A.; CARVAJAL, C.; WILHELM, J.; REPETTO, G.M. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism is associated with severe hypoxemia in pediatric ARDS. **Intensive care medicine**, v. 38, n. 1, p. 113-119, 2012. doi: 10.1007/s00134-011-2381-3.

CUCINOTTA, D.; VANELLI, M. WHO Declares COVID-19 a Pandemic. **Acta Biomedica**, v. 91, n. 1, p. 157-160, mar 2020. doi: 10.23750/abm.v91i1.9397.

DE GROOT, R.J.; BAKER, S.C.; BARIC, R.S.; BROWN, C.S.; DROSTEN, C.; ENJUANES, L.; FOUCHIER, R.A.; GALIANO, M.; GORBALENYA, A.E.; MEMISH, Z.A.; PERLMAN, S.; POON, L.L.; SNIJDER, E.J.; STEPHENS, G.M.; WOO, P.C.; ZAKI, A.M.; ZAMBON, M.; ZIEBUHR, J. Commentary: Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the coronavirus study group. **Journal of virology**, v. 87, n. 14, p. 7790-7792, 2013. doi: 10.1128/JVI.01244-13.

DE NARDO, R.; CHIAPPE, V.; GÓMEZ, M.; ROMANELLI, H.; SLOTS, J. Effects of 0.05% sodium hypochlorite oral rinse on supragingival biofilm and gingival inflammation. **International Dental Journal**, v. 62, n. 4, p. 208–212, 2012. doi: 10.1111/j.1875-595X.2011.00111.x.

DOMÊNICO, M.B.; CESCO, H.; PONCIANO, T.H.J.; DOS SANTOS, R.B.; LENZ, U.; ANTUNES, V.P.; GODINHO, V.W.; COLLARES, K.; CORAZZA, P.H. Effectiveness of hydrogen peroxide as auxiliary treatment for hospitalized COVID-19 patients in Brazil: preliminary results of a randomized double-blind clinical trial. **Epidemiology and Health**, v. 43, 2021. doi: 10.4178/epih.e2021032.

EGGERS, M.; KOBURGER-JANSSEN, T.; EICKMANN, M.; ZORN, J. In vitro bactericidal and virucidal efficacy of povidone-iodine gargle/mouthwash against respiratory and oral tract pathogens. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 7, n. 2, p. 249-59, 2018.

EJAZI, S.A.; GHOSH, S.; ALI, N. Antibody detection assays for COVID-19 diagnosis: an early overview. **Immunology and Cell Biology**, v. 99, n. 1, p. 21-33, jan 2021. doi: 10.1111/imcb.12397.

FERNANDEZ, M.D.S.; GUEDES, M.I.F.; LANGA, G.P.J.; RÖSING, C.K.; CAVAGNI, J.; MUNIZ, F.W.M.G. Virucidal efficacy of chlorhexidine: a systematic review. **Odontology**, n. 12, p. 1–17, out 2021. doi: 10.1007/s10266-021-00660-x.

GONZALEZ, S.; COHEN, C. L.; GALVÁN, M.; ALONAIZAN, F. A.; RICH, S. K.; SLOTS, J. Gingival bleeding on probing: Relationship to change in periodontal pocket depth and effect of sodium hypochlorite oral rinse. **Journal of Periodontal Research**, v. 50, n. 3, p. 397–402, jul 2015. doi:10.1111/jre.12219

GOTTSÄUNER, M. J.; MICHAELIDES, I.; SCHMIDT, B.; SCHOLZ, K. J.; BUCHALLA, W.; WIDBILLER, M.; CIEPLIK, F. A prospective clinical pilot study on the effects of a hydrogen peroxide mouthrinse on the intraoral viral load of SARS-CoV-2. **Clinical Oral Investigations**, v. 24, n. 10, p. 3707-3713, 2020. doi:10.1007/s00784-020-03549-1

GUPTA, S.; MOHINDRA, R.; CHAUHAN, P.K.; SINGLA, V.; GOYAL, K.; SAHNI, V.; GAUR, R.; VERMA, D.K.; GHOSH, A.; SONI, R.K.; SURI, V.; BHALLA, A.; SINGH, M.P. SARS-CoV-2 Detection in Gingival Crevicular Fluid. **Journal of Dental Research**, v. 100, n. 2, p. 187-193, fev 2021. doi: 10.1177/0022034520970536.

HAMMING, I.; TIMENS, W.; BULTHUIS, M.L.; LELY, A.T.; NAVIS, G.; VAN GOOR, H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. **The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland**, v. 203, n. 2, p. 631-637, 2004. doi: 10.1002/path.1570.

HERRERA, D.; SERRANO, J.; ROLDÁN, S.; SANZ, M. Is the oral cavity relevant in SARS-CoV-2 pandemic? **Clinical Oral Investigations**, v. 24, n. 8, p. 2925–2930, ago 2020. doi: 10.1007/s00784-020-03413-2.

ISLAM K.U.; IQBAL, J. An Update on Molecular Diagnostics for COVID-19. **Front Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 694, nov 2020. doi: 10.3389/fcimb.2020.560616.

IZZETTI, R.; GENNAI, S.; NISI, M.; BARONE, A.; GIUCA, M.R.; GABRIELE, M.; GRAZIANI, F. A perspective on dental activity during COVID-19: The Italian survey. **Oral Diseases**; n. 3, p. 694-702, 2020. doi:10.1111/odi.13606

JAMAL, A.J.; MOZAFARIHASHJIN, M.; COOMES, E.; ANCEVA-SAMI, S.; BARATI, S.; CROWL, G.; FAHEEM, A.; FAROOQI, L.; KANDEL, C.E.; KHAN, S.; LI, A.X.; MISTRY, H.; PATERSON, A.; PLENDERLEITH, S.; PROST, K.; POUTANEN, S.; POWIS, J.; SCHRYER, R.; TAYLOR, M.; YIP, L.; ZHONG, X.Z.; MCGEER, A.J.; MUBAREKA S. Toronto Invasive Bacterial Diseases Network COVID-19 Investigators. Sensitivity of midturbinate versus nasopharyngeal swabs for the detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 42, n. 8, p. 1001-1003, 2021. doi: 10.1017/ice.2020.1326.

KAMPF, G.; TODT, D.; PFAENDER, S.; STEINMANN, E. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents.

Journal of Hospital Infection, v. 104, n. 3, p. 246–251, 2020. doi: 10.1016/j.jhin.2020.01.022.

KANG, S.; YANG, M.; HONG, Z.; ZHANG, L.; HUANG, Z.; CHEN, X.; HE, S.; ZHOU, Z.; CHEN, Q.; YAN, Y.; ZHANG, C.; SHAN, H.; CHEN, S. Crystal structure of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites. **Acta Pharmaceutica Sinica B**. v. 10, n. 7, p. 1228-1238, 2020. doi: 10.1016/j.apsb.2020.04.009.

KARPIŃSKI, T.M.; SZKARADKIEWICZ, A.K. Chlorhexidine--pharmaco-biological activity and application. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**. v., 19, n. 7, p. 1321-6, abr 2015.

KRONBICHLER, A.; EFFENBERGER, M.; EISENHUT, M.; LEE, K.H.; SHIN, J.I. Seven recommendations to rescue the patients and reduce the mortality from COVID-19 infection: An immunological point of view. **Autoimmunity reviews**, v. 19, n. 7, p. 102570, jul 2020. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102570.

KSIAZEK, T.G.; ERDMAN, D.; GOLDSMITH, C.S.; ZAKI, S.R.; PERET, T.; EMERY, S.; TONG, S.; URBANI, C.; COMER, J.A.; LIM, W.; ROLLIN, P.E.; DOWELL, S.F.; LING, A.E.; HUMPHREY, C.D.; SHIEH, W.J.; GUARNER, J.; PADDOCK, C.D.; ROTA, P.; FIELDS, B.; DERISI, J.; YANG, J.Y.; COX, N.; HUGHES, J.M.; LEDUC, J.W.; BELLINI, W.J.; ANDERSON, L.J. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. **New England journal of medicine**, v. 348, n. 20, p. 1953-1966, 2003. doi: 10.1056/NEJMoa030781.

KUMAR, G.D.; MISHRA, A.; DUNN, L.; TOWNSEND, A.; OGUADINMA, I.C.; BRIGHT, K.R.; GERBA, C.P. Biocides and novel antimicrobial agents for the mitigation of coronaviruses. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1351, 2020. doi: 10.3389/fmicb.2020.01351.

LANDRY, M.L.; CRISCUOLO, J.; PEAPER, D.R. Challenges in use of saliva for detection of SARS CoV-2 RNA in symptomatic outpatients. **Journal of Clinical Virology**, v. 130, p. 104567, 2020. doi: 10.1016/j.jcv.2020.104567.

LI, Q.; GUAN, X.; WU, P.; WANG, X.; ZHOU, L.; TONG, Y.; REN, R.; LEUNG, K.S.M.; LAU, E.H.Y.; WONG, J.Y.; XING, X.; XIANG, N.; WU, Y.; LI, C.; CHEN, Q.; LI, D.; LIU, T.; ZHAO, J.; LIU, M.; TU, W.; CHEN, C.; JIN, L.; YANG, R.; WANG, Q.; ZHOU, S.; WANG, R.; LIU, H.; LUO, Y.; LIU, Y.; SHAO, G.; LI, H.; TAO, Z.; YANG, Y.; DENG, Z.; LIU, B.; MA, Z.; ZHANG, Y.; SHI, G.; LAM, T.T.Y.; WU, J.T.; GAO, G.F.; COWLING, B.J.; YANG, B.; LEUNG, G.M.; FENG, Z. Early transmission dynamics in wuhan, China, of novel coronavirus infected pneumonia. **New England journal of medicine**, n. 382, p. 1199-1207, mar 2020.

LI, W.; MOORE, M.; VASILIEVA, N.; SUI, J.; WONG, S.; BERNE, M.; SOMASUNDARAN, M.; SULLIVAN, J.L.; LUZURIAGA, K.; GREENOUGH, T.C.; CHOE, H.; FARZAN, M. Angiotensin converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. **Nature**, v. 426, n. 6965, p. 450-454, 2003. doi: 10.1038/nature02145.

MA, Q. X.; SHAN, H.; ZHANG, H. L.; LI, G. M.; YANG, R. M.; CHEN, J. M. Potential utilities of mask-wearing and instant hand hygiene for fighting SARS-CoV-2. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 9, p. 1567–1571, 2020. doi:10.1002/jmv.25805

MARQUES B.B.F.; GUIMARÃES, T.C.; FISCHER, R.G.; TINOCO, J.M.M.; PIRES, F.R.; LIMA JUNIOR J.D.C.; STEVENS, R.H.; TINOCO, E.M.B. Morphological alterations in tongue epithelial cells infected by SARS-CoV-2: A case-control study. **Oral Diseases**, agosto 2021. doi: 10.1111/odi.13988.

MARSHALL, M.V.; CANCRO, L.P.; FISCHMAN, S.L. Hydrogen peroxide: a review of its use in dentistry. **Journal of periodontology**, v. 66, n. 9, p. 786-796, set 1995. doi: 10.1902/jop.1995.66.9.786.

MARSHALL, R.P.; WEBB, S.; BELLINGAN, G.J.; MONTGOMERY, H.E.; CHAUDHARI, B.; MCANULTY, R.J.; HUMPHRIES, S.E.; HILL, M.R.; LAURENT, G.J. Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism is associated with susceptibility and outcome in acute respiratory distress syndrome. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 166, n. 5, p. 646-650, 2002. doi: 10.1164/rccm.2108086.

MARUI, V. C.; SOUTO, M. L. S.; ROVAI, E. S.; ROMITO, G. A.; CHAMBRONE, L.; PANNUTI, C. M. Efficacy of preprocedural mouthrinses in the reduction of microorganisms in aerosol: A systematic review. **Journal of the American Dental Association**, n. 150, p. 1015-1026, 2019. doi:10.1016/j.adaj.2019.06.024

MOHAMADIAN, M.; CHITI, H.; SHOGHLI, A.; BIGLARI, S.; PARSAMANESH, N.; ESMAEILZADEH, A. COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis. **The Journal of Gene Medicine**, v. 23, n. 2, p. e3303, 2021. doi: 10.1002/jgm.3303.

NAGRAJ, S. K.; EACHEMPATI, P.; PAISI, M.; NASSER, M.; SIVARAMAKRISHNAN, G.; VERBEEK, J. H. Interventions to reduce contaminated aerosols produced during dental procedures for preventing infectious diseases. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 12, p. 10, out 2020. doi: 10.1002/14651858.CD013686.pub2.

NAQVI AAT, FATIMA K, MOHAMMAD T, FATIMA U, SINGH IK, SINGH A, ATIF SM, HARIPRASAD G, HASAN GM, HASSAN MI. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 10, p. 165878, 2020. doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165878.

NI, W.; YANG, X.; YANG, D.; BAO, J.; LI, R.; XIAO, Y.; HOU, C.; WANG, H.; LIU, J.; YANG, D.; XU, Y.; CAO, Z.; GAO, Z. Role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in COVID-19. **Critical Care**, v. 24, n. 1, p. 1-10, 2020. doi: 10.1186/s13054-020-03120-0.

NOLAN, T.; HANDS, R.E.; BUSTIN, S.A. Quantification of mRNA using real-time RTPCR. **Nature protocols**, v. 1, n. 3, p. 1559-1582, 2006. doi:10.1038/nprot.2006.236.

O'DONNELL, V. B.; THOMAS, D.; STANTON, R.; MAILLARD, J.-Y.; MURPHY, R. C.; JONES, S. A.; HUMPHREYS, I.; WAKELAM, M. J. O.; FEGAN, C.; WISE, M. P.; BOSCH, A.; SATTAR, S. A. Potential Role of Oral Rinses Targeting the Viral Lipid Envelope in SARS-CoV-2 Infection. **Function**, v. 1, n. 1, p. zqaa002, 2020. doi:10.1093/function/zqaa002.

PALLOS, D.; RUIVO, G. F.; FERRARI-JUNIOR, S. H.; PANNUTI, C. S.; PEROZINI, C.; SARMENTO, D. J. S.; BRAZ-SILVA, P. H. Periodontal disease and detection of human herpesviruses in saliva and gingival crevicular fluid of chronic kidney disease patients. **Journal of Periodontology**, v. 91, n. 9, p. 1139–1147, 2020. doi:10.1002/JPER.19-0583

PAN, Y.; ZHANG, D.; YANG, P.; POON, L. L.M.; WANG, Q. Viral Load of SARS-CoV-2 in Clinical Samples. **The Lancet infectious diseases**, v. 20, n. 4, p. 411-412, 2020. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30113-4.

PARK, J. B.; PARK, N. H. Effect of chlorhexidine on the in vitro and in vivo herpes simplex virus infection. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology**, v. 67, n. 2, p. 149-153, 1989. doi:10.1016/0030-4220(89)90320-4.

PENG, X.; XU, X.; LI, Y.; CHENG, L.; ZHOU, X.; REN, B. Transmission routes of 2019-nCoV and controls in dental practice. **International Journal of Oral Science**, v. 12, n. 1, p. 9, 2020. doi:10.1038/s41368-020-0075-9.

RIAD, A.; KASSEM, I.; HOCKOVA, B.; BADRAH, M.; KLUGAR, M. Tongue ulcers associated with SARS-CoV-2 infection: A case series. **Oral Diseases**, agosto 2020. doi:10.1111/odi.13635.

SAKANASHI, D.; ASAI, N.; NAKAMURA, A.; MIYAZAKI, N.; KAWAMOTO, Y.; OHNO, T.; YAMADA, A.; KOITA, I.; SUEMATSU, H.; HAGIHARA, M.; SHIOTA, A.; KURUMIYA, A.; SAKATA, M.; KATO, S.; MURAMATSU, Y.; KOIZUMI, Y.; KISHINO, T.; OHASHI, W.; YAMAGISHI, Y.; MIKAMO, H. Comparative evaluation of nasopharyngeal swab and saliva specimens for the molecular detection of SARS-CoV-2 RNA in Japanese patients with COVID-19. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 27, n. 1, p. 126-129, 2021. doi: 10.1016/j.jiac.2020.09.027.

SAMPSON, V.; KAMONA, N.; SAMPSON, A. Could there be a link between oral hygiene and the severity of SARS-CoV-2 infections? **British dental journal**, v. 228, n. 12, p. 971-975, 2020. doi: 10.1038/s41415-020-1747-8.

SENEVIRATNE, C.J.; BALAN, P.; KO, K.K.K.; UDAWATTE, N.S.; LAI, D.; NG, D.H.L.; VENKATACHALAM, I.; LIM, K.S.; LING, M.L.; OON, L.; GOH, B.T.; SIM, X.Y.J. Efficacy of commercial mouth-rinses on SARS-CoV-2 viral load in saliva: randomized control trial in Singapore. **Infection**, v. 49, n. 2, p. 305-311, 2021. doi: 10.1007/s15010-020-01563-9.

SHIRAI, J.; KANNO, T.; TSUCHIYA, Y.; MITSUBAYASHI, S.; SEKI, R. Effects of Chlorine, Iodine, and Quaternary Ammonium Compound Disinfectants on Several

Exotic Disease Viruses. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 62, n. 1, p. 85–92, 2000. doi:10.1292/jvms.62.85.

TO, K. K. W., TSANG, O. T. Y., YIP, C. C. Y., CHAN, K. H., WU, T. C., CHAN, J. M. C., LEUNG, W. S., CHIK, T. S. H., CHOI, C. Y. C., KANDAMBY, D. H., LUNG, D. C., TAM, A. R., POON, R. W. S., FUNG, A. Y. F., HUNG, I. F. N., CHENG, V. C. C., CHAN, J. F. W., & YUEN, K. Y. (2020). Consistent Detection of 2019 Novel Coronavirus in Saliva. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 15, p. 841–843, jul 2020. doi: 10.1093/cid/ciaa149.

TO, K.K.; TSANG, O.T.; LEUNG, W.S.; TAM, A.R.; WU, T.C.; LUNG, D.C.; YIP, C.C.; CAI, J.P.; CHAN, J.M.; CHIK, T.S.; LAU, D.P.; CHOI, C.Y.; CHEN, L.L.; CHAN, W.M.; CHAN, K.H.; IP, J.D.; NG, A.C.; POON, R.W.; LUO, C.T.; CHENG, V.C.; CHAN, J.F.; HUNG, I.F.; CHEN, Z.; CHEN, H.; YUEN, K.Y. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 5, p. 565–574, mar 2020. doi:10.1016/S1473-3099(20)30196-1.

TREJO, A.C.; CASTAÑEDA, I.D.; RODRÍGUEZ, A.C.; ANDRADE CARMONA, V.R.; MERCADO, M.D.P.C.; VALE, L.S.; CRUZ M.; BARRERO CASTILLERO, S.; CONSUELO, L.C.; DI SILVIO, M. Hydrogen Peroxide as an Adjuvant Therapy for COVID-19: A Case Series of Patients and Caregivers in the Mexico City Metropolitan Area. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, n. 3, jul 2021. doi: 10.1155/2021/5592042.

VAZ, S.N.; SANTANA, D.S.; NETTO, E.M.; PEDROSO, C.; WANG, W.K.; SANTOS, F.D.A.; BRITES, C. Saliva is a reliable, non-invasive specimen for SARS-CoV-2 detection. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 24, p. 422-427, 2020. doi: 10.1016/j.bjid.2020.08.001.

WANG Y, KANG H, LIU X, TONG Z. Combination of RT-qPCR testing and clinical features for diagnosis of COVID-19 facilitates management of SARS-CoV-2 outbreak. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 6, p. 538-539, 2020. doi:10.1002/jmv.25721.

WILLIAMS, E.; BOND, K.; ZHANG, B.; PUTLAND, M.; WILLIAMSON, D.A. Saliva as a noninvasive Specimen for Detection of SARS-CoV-2. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n. 8, p. e00776-20, jul 2020. doi: 10.1128/JCM.00776-20.

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.; DATTA, R.; HANDOKO, R.; NAUSHAD, N.; SEWANAN, L.R.; VALDEZ, J.; WHITE, E.B.; LAPIDUS, S.; KALINICH, C.C.; JIANG, X.; KIM, D.J.; KUDO, E.; LINEHAN, M.; MAO, T.; MORIYAMA, M.; OH, J.E.; PARK, A.; SILVA, J.; SONG, E.; TAKAHASHI, T.; TAURA, M.; WEIZMAN, O.E.; WONG, P.; YANG, Y.; BERMEJO, S.; ODIO, C.D.; OMER, S.B.; DELA CRUZ, C.S.; FARHADIAN, S.; MARTINELLO, R.A.; IWASAKI, A.; GRUBAUGH, N.D.; KO, A.I. Saliva or Nasopharyngeal Swab Specimens for

Detection of SARS-CoV-2. **The new england journal of medicine**, v. 383, n. 13, p. 1283-1286, 2020. doi: 10.1056/NEJMc2016359.

XU, J.; LI, Y.; GAN, F.; DU, Y.; YAO, Y. Salivary Glands: Potential Reservoirs for COVID-19 Asymptomatic Infection. **Journal of Dental Research**, v. 99, n.8, p. 989, jul 2020. doi:10.1177/0022034520918518

YOON, J.G.; YOON, J.; SONG, J.Y.; YOON, S.Y.; LIM, C.S.; SEONG, H.; NOH, J.Y.; CHEONG, H.J.; KIM, W.J. Clinical Significance of a High SARS-CoV-2 Viral Load in the Saliva. *Journal of Korean medical science*, v. 35, n. 20, 2020. doi:10.3346/jkms.2020.35.e195.

YÜCE, M.; FILIZTEKIN, E.; ÖZKAYA, K.G. COVID-19 diagnosis -A review of current methods. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 172, p. 112752, 2021. doi: 10.1016/j.bios.2020.

ZEHNDER, M. Root Canal Irrigants. **Journal of Endodontics**, n. 32, p. 389–398, 2006. doi:10.1016/j.joen.2005.09.014

ZHONG, M.; LIN, B.; PATHAK, J. L.; GAO, H.; YOUNG, A. J.; WANG, X.; LIU, C.; WU, K.; LIU, M.; CHEN, J.M.; HUANG, J.; LEE, L.H.; QI, C.L.; GE, L.; WANG, L. ACE2 and Furin Expressions in Oral Epithelial Cells Possibly Facilitate COVID-19 Infection via Respiratory and Fecal-Oral Routes. **Frontiers in Medicine**, v. 7, p. 580796, 2020. doi:10.3389/fmed.2020.580796.

ZHOU, P.; YANG, X.L.; WANG, X.G.; HU, B.; ZHANG, L.; ZHANG, W.; SI, H.R.; ZHU, Y.; LI, B.; HUANG, C.L.; CHEN, H.D.; CHEN, J.; LUO, Y.; GUO, H.; JIANG, R.D.; LIU, M.Q.; CHEN, Y.; SHEN, X.R.; WANG, X.; ZHENG, X.S.; ZHAO, K.; CHEN, Q.J.; DENG, F.; LIU, L.L.; YAN, B.; ZHAN, F.X.; WANG, Y.Y.; XIAO, G.F.; SHI, Z.L. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, p. 270-273, 2020. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7.

ZOU, L.; RUAN, F.; HUANG, M.; LIANG, L.; HUANG, H.; HONG, Z.; YU, J.; KANG, M.; SONG, Y.; XIA, J.; GUO, Q.; SONG, T.; HE, J.; YEN, H.L.; PEIRIS, M.; WU, J. SARSCoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 12, p. 1177–1179, mar 2020. doi: 10.1056/NEJMc2001737.

APÊNDICE A - Ficha de anamnese da pesquisa**Número de identificação:**

Nome: _____
Sexo: _____
CPF: _____
Data de nascimento: _____
Idade: _____
Endereço: _____
Tel.: _____ Tel. de emergência: _____
Email: _____

Você tem ou já teve alguma das condições abaixo?

Hipertensão arterial: SIM () NÃO ()
Problemas cardíacos: SIM () NÃO () - Qual?

Diabetes: SIM () NÃO ()
Problemas respiratórios: SIM () NÃO () - Qual?

Problemas alérgicos: SIM () NÃO () - Qual?

HIV: SIM () NÃO ()
Algum outro problema de saúde? Qual?

Toma algum medicamento?

Hábitos

Tabagista: SIM () NÃO ()
Ex-tabagista: SIM () NÃO ()

Para mulheres

Está grávida: SIM () NÃO ()

Covid-19

Teve febre nos últimos 14 dias?
SIM () NÃO ()
Teve crises respiratórias, tais como tosse e dificuldade de respirar nos últimos 14 dias?
SIM () NÃO ()
Teve mal-estar nos últimos 14 dias?
SIM () NÃO ()
Teve perda de olfato ou paladar nos últimos 14 dias?
SIM () NÃO ()
Teve dores abdominais nos últimos 14 dias?
SIM () NÃO ()

Exames complementares

Temperatura: _____
Frequência cardíaca: _____
Pressão arterial: _____

Peso: _____

Altura: _____

Sorologia: IgG: _____

IgM: _____

RT-PCR: _____

Cultura: _____

Códigos de identificação:

A = solução de clorexidina 0,12%;

B = Solução de H₂O₂ 1,5%;

C = solução de NaClO 0,1% ;

D = Solução de iodopovidona 1%;

E = Combinação de bochechos (clorexidina 0,12% + Solução de H₂O₂ 1,5%);

F = Placebo (água estéril)

1/Pré = Antes do bochecho

2/Pós = imediatamente após o bochecho

3/15 = 15 minutos após o bochecho

4/30 = 30 minutos após o bochecho

APÊNDICE B – Estudo 1. Aceito para publicação no Brazilian Dental Journal

SARS-COV-2 detection in saliva and nasopharyngeal swabs using RT-PCR was similar

Short Title: SARS-CoV-2 in saliva and nasopharyngeal swab

Taísa Coelho Guimarães^a, Barbara Bruno Fagundes Marques^a, Justine Monteiro Monnerat Tinoco^c, Luís Cristóvão Moraes Sobrino Porto^{bd}, Eduardo Muniz Barretto Tinoco^a, Ricardo Guimarães Fischer^a

a. Department of Periodontology, Rio de Janeiro State University, Brazil

b. Histocompatibility and Cryopreservation Laboratory, Rio de Janeiro State University, Brazil

c. Department of Endodontic, Rio de Janeiro Federal University, Brazil

d. Clinical Pathology Service, Piquet Carneiro Polyclinic, Rio de Janeiro State University, Brazil

Address of correspondence:

Ricardo Guimarães Fischer

Dental School

Rio de Janeiro State University

Boulevard 28 de Setembro, 157

Vila Isabel

Rio de Janeiro, RJ, Brazil

CEP- 22431-050

e-mail: ricfischer@globo.com

Abstract

The World Health Organization has declared the widespread spread of SARS-CoV-2 and its associated disease (COVID-19) a public health emergency. The standard gold test for detecting the virus is the RT-PCR, performed from nasopharyngeal swab (NPS) samples. However, this test may be uncomfortable for the patient and requires specific training and attire from the health professional responsible for collecting the sample. Therefore, the search for alternative ways to collect samples that may be used in the diagnosis of COVID-19 is relevant. This study aimed to compare the results obtained from NPS and saliva samples. NPS and saliva samples were collected from 189 symptomatic outpatients suspected of COVID-19, who came to Piquet Carneiro Polyclinic. RNA extraction was performed using the Bio-Gene DNA/RNA Viral Extraction kit (Bioclin®). Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) reactions used the Molecular SARS-CoV-2 (E / RP) kit (Bio-Manguinhos). The results indicated that 142 showed a non-detectable result (ND), while 47 showed a detectable result (D). Among the 142 "ND", 137 (94.4%) saliva samples obtained the same result, while 5 samples (3.4%) were "D". Among the 47 "D" swab samples, 35 (74.4%) showed the same result in the saliva samples. The sensitivity of the saliva test was 0.74 and the specificity was 0.97. The positive predictive value was 0.88 while the negative predictive value was 0.92. The results showed that detection of Sars-CoV-2 using saliva samples showed high sensitivity and specificity compared to nasopharyngeal swabs.

Keywords: saliva, real-time RT-PCR, nasopharyngeal swab, Covid-19, SARS CoV-2

INTRODUCTION

Concerned by the alarming levels of spread and severity, on March 11, 2020, the World Health Organization (WHO) declared the outbreak of COVID-19 a pandemic. The disease has spread worldwide and there have been over 226 million reported cases and 4.6 million deaths on September 16, 2021 (1).

Testing individuals for COVID-19 has been an important activity since the pandemic started to contain the advance of the transmission. It seems that testing individuals is even more critical since most countries are reopening their establishments, such as schools, restaurants, and shopping malls. The virus has been detected in various clinical specimen such as blood, crevicular fluid, urine, anal swabs (2,3). SARS-CoV-2 can infect multiple systems whose fluids can be used to test individuals for this disease.

Even though nasopharyngeal swab (NPS) detects the presence of the virus itself, other forms of tracking COVID-19 have been tested and not achieving the same results (2,4). Therefore, the standard gold test for detecting SARS-CoV-2 is still the Real-Time – polymerase chain reaction (RT-PCR) performed from NPS.

However, this test may be uncomfortable for the patient and requires specific training from the health professional responsible for collecting the sample and personal protective equipment. On the other hand, since a saliva specimen is a simple sample to collect, it would not require a trained professional. It could also be performed in children without significant complications because of its the self-collection way of obtaining the specimen.

Thereby, saliva has been tested as an alternative way to collect samples that may be used to diagnose COVID-19 for both detection of infection, and for determining whether an infected individual is no longer capable of infecting and safe to encounter uninfected members of the community (5-7). To elucidate the versatility of non-invasive samples for testing for viral infections, studies with severe acute respiratory syndrome and Middle East respiratory syndrome coronavirus were performed (7). Therefore, saliva has been tested as an alternative for SARS-CoV-2 (7-9), especially in community settings (5). Thus, this study aimed to compare the results obtained from RT-PCR from NPS and saliva samples.

MATERIALS AND METHODS

Three hundred and seventy-eight samples from Piquet Carneiro Polyclinic 189 outpatients were collected between September and November 2020. All of them had at least one symptom of Covid-19 at the time of collection and gave a written consent to participate. The Ethical Committee approved the study from Pedro Ernesto University Hospital (4.045.586).

NPS were collected by trained health professionals and placed in conical tubes containing 3 mL of sterile saline solution. The saliva samples were collected by the patient him/herself in a sterile universal collector, using the spitting technique.

The 378 samples collected were sent and processed at the Histocompatibility and Cryopreservation Laboratory (HLA-UERJ). The materials were classified into two groups of 189 samples: NPS group and saliva group. The total nucleic acid was extracted from 200 µl of viral transport medium using the Bio-Gene DNA/ RNA Viral Extraction (Bioclin® Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil) isolation kit following the manufacturer's protocol.

The results were detected by the real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique with sequences of primers and probes from the molecular kit SARS-CoV-2 Bio-Manguinhos of the Berlin Protocol (Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil). The target-specific amplification methodology with fluorescence-labeled probes is used to determine the presence of the SARS-COV2 envelope gene and human RNase P (RP) as an extraction control. The equipment used in the amplification and detection stage was the 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™ Waltham, Massachusetts, USA). The CT limit of detection was 42.

The statistic program used in this study was SPSS (“Statistical Package for the Social Science”) version 23.0. Paired Student t-test was used to compare CT values from positive NPS and saliva samples. A Chi-square test was used to compare frequencies of symptoms in patients according to their NPS and saliva COVID-19 detection. The level of significance was set as 0.05.

RESULTS

There were 189 patients included in the present study (mean age: 39.6 ± 12.3 , 54 men and 143 female), with 378 samples (189 saliva and 189 NPS samples). Among the 189 swab samples, 142 had a non-detectable result (ND), while 47 had a detectable result (D). In addition, among

the 142 "ND", 137 (94.4%) saliva samples obtained the same result, while 5 samples (3.4%) were "D". Among the 47 "D" swab samples, 35 (74.4%) showed the same result as the saliva samples. The sensitivity value was 0.74 and the specificity was 0.97. The positive and negative predictive values were 0.88 and 0.92, respectively. The overall agreement between the NPS and saliva samples was 91% (172/189) (Table 1).

A significantly higher frequency of patients referring loss of smell and taste ($p=0.003$), fever ($p=0.003$), and unwellness ($p=0.02$) was observed in positive samples as compared to negative NPS (Table 2). In saliva, a significantly higher frequency of patients referring fever ($p=0.03$) and unwellness ($p=0.03$) was observed in positive samples as compared to negative samples (Table 3). Among the 35 positive NPS and saliva samples ($n=35$), the mean ($\pm$ SD) values of the cycle threshold (CT) of RT-PCR were $27.8 (\pm 4.3)$ and $30.6 (\pm 5.1)$, respectively ($p=0.007$).

DISCUSSION

This study aimed to compare the results obtained from NPS and saliva samples using RT-PCR. The results showed that the sensitivity value was 0.74, and the specificity was 0.97. The positive and negative predictive values were 0.88 and 0.92, respectively. Two studies specifically compared both samples (10,11). Jamal et al. (10) examined 91 inpatients with COVID-19 and tested one pair of NPS/saliva samples from each patient using RT-PCR. They reported that sensitivity was 0.89 for NPS samples and 0.72 for saliva samples. However, the authors did not describe specificity and positive and negative predictive values. If we calculate positive and negative predictive values, they were 0.84 and 0.48. Differences may be related to the different periods that the samples were collected after the onset of the illness. Landry et al. (11) tested paired samples of NPS/saliva, in a cross-sectional study including 124 symptomatic outpatients. Out of these 124, 28 were positive for both saliva and NPS samples. Two patients were negative for NPS samples and positive for saliva samples, while 5 were positive just for the NPS sample. The overall agreement between NPS and saliva samples was 94.4%, similar to the agreement of the present study (91%). The sensitivity for saliva was 0.85. Both studies did not report positive and negative predictive values. After a laboratory test, these results would be interesting if one wants to identify patients with a disease.

To et al. (9) examined 12 patients hospitalized with laboratory-confirmed SARS-CoV-2 and informed that 11 saliva samples were also positive to detect the virus. However, their sample size was small. They aimed to verify the presence of the virus in the saliva, not to compare NPS and saliva samples.

Wyllie et al. (12) aimed to validate the use of saliva for SARS-CoV-2 detection. The authors found that the sensitivity of saliva SARS-CoV-2 detection is superior to nasopharyngeal swabs in early hospitalization and more consistent during extended hospitalization and recovery. More recently, Sakanashi et al. (13) used 12 paired NPS and saliva specimens collected from patients at various time points after symptom onset. Their results suggested that saliva samples were a practical non-invasive alternative to NPS in detecting SARS-CoV-2 using RT-PCR.

Another study tested pooled saliva in 449 individuals, using the same CT values from RT-PCR. On the other hand, they have found that saliva testing is not quite as sensitive as nasopharyngeal and midturbinate testing (14). They still highlighted that higher viral load in an asymptomatic screening program is adequate to detect saliva.

CT values were significantly lower in NPS samples than saliva samples, similar to what was described by Williams et al and Landry et al. (11). Saliva is a biological fluid that may be used as a non-invasive diagnostic technique. It may be self-collected, does not cause patient discomfort, protects the health professionals, and reduces the cost of having a specific team for collecting and using protective equipment. Azzi et al. (15) examined 25 saliva samples of inpatients with severe or very severe COVID-19. The authors suggested that saliva might be a promising tool in COVID-19 diagnoses.

Other forms of analyzing the SARS-CoV-2 have been suggested. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, which is a gene amplification procedure, has been tested. Compared to RT-PCR, it was demonstrated to be a simple, rapid, specific, and cost-effective nucleic acid amplification method (16,17). However, RT-PCR is routinely used to detect causative viruses from respiratory secretions due to its laboratory diagnostic reliability (18).

In conclusion, detection of Sars-CoV-2 using saliva samples showed high sensitivity and specificity compared with nasopharyngeal swabs.

RESUMO

A Organização Mundial da Saúde declarou a disseminação generalizada do SARS-CoV-2 e sua doença associada (COVID-19) uma emergência de saúde pública. O teste padrão ouro para detecção do vírus é o RT-PCR, realizado a partir de amostras de swab nasofaríngeo (NPS). No entanto, esse exame pode ser desconfortável para o paciente e requer treinamento específico e vestimenta do profissional de saúde responsável pela coleta da amostra. Portanto, a busca por formas alternativas de coleta de amostras que possam ser utilizadas no diagnóstico de COVID-19 é relevante. O objetivo deste estudo foi comparar os resultados obtidos em amostras de NPS e saliva. Amostras de NPS e saliva foram coletadas de 189 pacientes ambulatoriais sintomáticos com suspeita de COVID-19, que procuraram a Policlínica Piquet Carneiro. A extração de RNA foi realizada com o kit Bio-Gene DNA / RNA Viral Extraction (Bioclin®) e as reações em tempo real da reação em cadeia da polimerase-transcriptase reversa (RT-PCR) usaram o kit Molecular SARS-CoV-2 (E / RP) (Bio-Manguinhos). Os resultados indicaram que 142 apresentaram resultado não detectável (ND), enquanto 47 apresentaram resultado detectável (D). Entre os 142 "ND", 137 (94,4%) amostras de saliva obtiveram o mesmo resultado, enquanto 5 amostras (3,4%) foram "D". Dentre as 47 amostras de swab "D", 35 (74,4%) apresentaram o mesmo resultado nas amostras de saliva. A sensibilidade do teste de saliva foi de 0,74 e a especificidade foi de 0,97. O valor preditivo positivo foi de 0,88, enquanto o valor preditivo negativo foi de 0,92. Os resultados mostraram que a detecção de Sars-CoV-2 em amostras de saliva apresentou alta sensibilidade e especificidade quando comparada com swabs nasofaríngeos.

Acknowledgment

This research received financial support from Rio de Janeiro Foundation for Research Support (FAPERJ, E-26/202.810/2018)

REFERENCES

1. World Health Organization. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. (2020). World Heal Organ. <https://covid19.who.int/> accessed 2021 June 25.
2. Peng L, Liu J, Xu W, Luo Q, Chen D, Lei Z, et al. SARS-CoV-2 can be detected in urine, blood, anal swabs, and oropharyngeal swabs specimens. J Med Virol 2020; 92(9):1676-1680.
3. Gupta S, Mohindra R, Chauhan PK, Singla V, Goyal K, Sahni V, et al. SARS-CoV-2

- Detection in Gingival Crevicular Fluid. *J Dent Res* 2021; 100(2):187-193.
4. Bwire GM, Majigo MV, Njiro BJ, Mawazo A. Detection profile of SARS-CoV-2 using RT-PCR in different types of clinical specimens: A systematic review and meta-analysis. *J Med Virol* 2021; 93(2):719-725.
 5. Becker D, Sandoval E, Amin A, De Hoff P, Diets A, Leonetti N, et al. Saliva is less sensitive than nasopharyngeal swabs for COVID-19 detection in the community setting. *medRxiv* 2020.
 6. McCormick-Baw C, Morgan K, Gaffney D, Cazares Y, Jaworski K, Byrd A, et al. Saliva as an Alternate Specimen Source for Detection of SARS-CoV-2 in Symptomatic Patients Using Cepheid Xpert Xpress SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol* 2020; 58(8), 2–3.
 7. Sean Sullivan P, Sailey C, Lynn Guest J, Guarner J, Kelley C, Julius Siegler A, et al. Detection of SARS-CoV-2 RNA and Antibodies in Diverse Samples: Protocol to Validate the Sufficiency of Provider-Observed, Home-Collected Blood, Saliva, and Oropharyngeal Samples. *JMIR Public Health Surveill* 2020; 6(2):e19054.
 8. Niedrig M, Patel P, El Wahed AA, Schädler R, Yactayo S. Find the right sample: A study on the versatility of saliva and urine samples for the diagnosis of emerging viruses. *BMC Infect Dis* 2018, 18(1), 1–14.
 9. To, KKW, Tsang OTY, Yip, CCY, Chan KH, Wu TC, Chan, JMC, et al. Consistent Detection of 2019 Novel Coronavirus in Saliva. *Clin Infect Dis* 2020; 71(15), 841–843.
 10. Jamal AJ, Mozafarihashjin M, Coomes E, Anceva-Sami S, Barati S, Crowl G, et al. Toronto Invasive Bacterial Diseases Network COVID-19 Investigators. Sensitivity of midturbinate versus nasopharyngeal swabs for the detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Infect Control Hosp Epidemiol* 2020; Nov 18:1-3.
 11. Landry ML, Criscuolo J, Peaper DR. Challenges in use of saliva for detection of SARS CoV-2 RNA in symptomatic outpatients. *J Clin Virol* 2020; 130, 104567.
 12. Wyllie AL, Fournier J, Casanovas-Massana A, Campbell M, Tokuyama M, Vijayakumar P, et al. Saliva or nasopharyngeal swab specimens for detection of SARS-CoV-2. *N Engl J Med* 2020; 383(13), 1283-1286.
 13. Sakanashi D, Asai N, Nakamura A, Miyazaki N, Kawamoto Y, Ohno T, et al.

- Comparative evaluation of nasopharyngeal swab and saliva specimens for the molecular detection of SARS-CoV-2 RNA in Japanese patients with COVID-19. *J Infect Chemother* 2021; 27(1), 126–129.
14. Barat B, Das S, De Giorgi V, Henderson DK, Kopka S, Lau AF, Miller T, Moriarty T, Palmore TN, Sawney S, Spalding C, Tanjutco P, Wortmann G, Zelazny AM, Frank KM. Pooled Saliva Specimens for SARS-CoV-2 Testing. *J Clin Microbiol*. 2021 Feb 18;59(3):e02486-20. doi: 10.1128/JCM.02486-20. PMID: 33262219; PMCID: PMC8106731.
 15. Azzi L, Carcano G, Gianfagna F, Grossi P, Gasperina DD, Genoni A, et al. Saliva is a reliable tool to detect SARS-CoV-2. *J Infect* 2020, 81(1): e45-e50.
 16. Lamb LE, Bartolone SN, Ward E, Chancellor MB. Rapid detection of novel coronavirus/Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *PLoS ONE* 2020; 15(6), 1–15.
 17. Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc* 2008; 3(5), 877–882.
 18. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* 2020; 25(3):2000045.

Table 1. SARS Covid-19 RT-PCR from nasopharyngeal (NPS) and saliva samples in symptomatic outpatients.

		NP swabs		
		positive	negative	total
Saliva samples	positive	35	5	40
	negative	12	137	149
total		47	142	189

Table 2. Mean ($\pm$ SD) of age, gender distribution, and frequency of symptoms in outpatients with positive and negative nasopharyngeal samples (NPS) to detect COVID-19.

	Total (n=189)	NPS + (n=47)	NPS - (n=142)	p value
Age	39.2 ($\pm$ 11.5)	39.5 ($\pm$ 12)	38.1 ($\pm$ 9.8)	0.45
Gender female n (%)	141 (74.6)	34 (72.3)	107 (74)	0.7
Smoking yes n (%)	11 (5.8)	0 (0)	11 (7.7)	0.17
Unwellness yes n (%)	146 (77.2)	42 (89.4)	104 (73.2)	0.02
Cough yes n (%)	128 (67.7)	33 (70.2)	95 (67)	0.67
Loss of smell and/or taste n (%)	71 (37.5)	26 (55.3)	45 (31.7)	0.003
Abdominal pain yes n (%)	70 (37)	18 (38.3)	52 (36.6)	0.83
Fever yes n (%)	86 (45.5)	30 (63.8)	56 (39.4)	0.003

NPS +: individuals who tested positive on the NPS test;

NPS -: individuals who tested negative on the NPS test.

p-value: differences among positive and negative samples

Table 3. Mean ($\pm$ SD) of age, gender distribution, and frequency of symptoms in outpatients with positive and negative saliva samples to detect COVID-19.

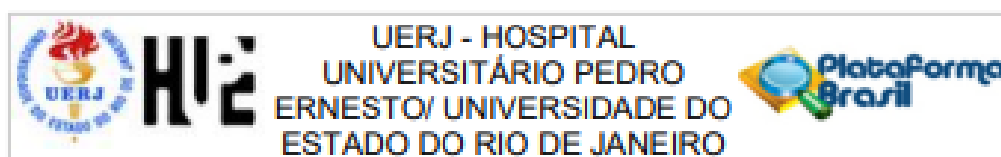
	Total (n=189)	saliva + (n=40)	Saliva - (n=149)	p value
Age	39.2 ($\pm$ 11.5)	38.3 ($\pm$ 10.2)	39.4 ($\pm$ 11.8)	0.6
Gender Female n (%)	139 (73.5)	30 (75)	109 (73.2)	0.8
Smoking n (%)	11 (5.8)	0 (0)	11 (7.4)	0.26
Unwellness n (%)	149 (78.8)	36 (90)	110 (73.8)	0.03
Cough n (%)	128 (67.7)	26 (65)	102 (68.5)	0.67
Loss of smell and/or taste n (%)	71 (37.6)	20 (50)	51 (34.2)	0.06
Abdominal pain n (%)	70 (37)	15 (37.5)	55 (36.9)	0.95
Fever n (%)	86 (45.5)	24 (60)	62 (41.6)	0.03

Saliva +: individuals who tested positive on the saliva test.

Saliva -: individuals who tested negative on the saliva test.

p-value: differences among positive and negative samples

ANEXO A – Aprovação do comitê de ética em pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação in vivo da eficácia de duas soluções antissépticas na redução da carga viral de SARS-CoV-2 na saliva de pacientes com COVID-19

Pesquisador: Justine Monteiro Monnerat Tinoco

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 31222820.6.0000.5259

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da UERJ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.045.586

Apresentação do Projeto:

Transcrição editada do conteúdo registrado no protocolo e dos arquivos anexados à Plataforma Brasil.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou que a disseminação desenfreada da SARS-CoV-2 e sua doença associada (COVID-19) é uma emergência de saúde pública com uma taxa de mortalidade geral atualmente conhecida como 3,4%. Dada a ampla transmissão do SARS-CoV-2 e os relatos de sua disseminação entre prestadores de serviços de saúde, estudantes e profissionais de odontologia correm alto risco de infecção hospitalar e podem se tornar portadores potenciais da doença. Esses riscos podem ser atribuídos às peculiaridades das intervenções odontológicas, como a geração de aerossóis e a proximidade do profissional à região orofaríngea do paciente. Além disso, se as precauções adequadas não forem tomadas, a clínica odontológica pode potencialmente expor os pacientes à contaminação cruzada. Portanto, medidas preventivas de controle de infecção são importantes para proteger estudantes e profissionais de odontologia do COVID-19. O uso pré-operatório de antissépticos orais é capaz de reduzir a carga microbiana na saliva em até 70%. No entanto, a eficácia dos antissépticos orais contra SARS-CoV-2 na saliva não é bem conhecida. O objetivo deste projeto de pesquisa é avaliar a redução da carga viral salivar por meio de antissépticos orais em pacientes com teste positivo para COVID-19.

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Tímaco

Bairro: Vila Isabel

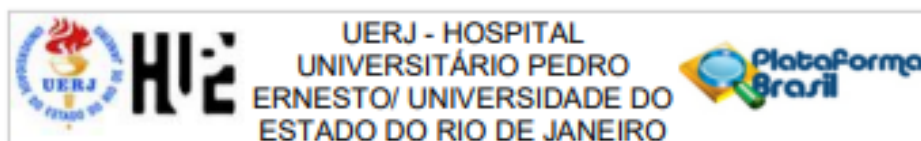
CEP: 20.551-030

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2668-8253

E-mail: cep.hupa.interno@gmail.com



Continuação do Parecer: 4.045.586

Objetivo da Pesquisa:

Transcrição editada do conteúdo registrado no protocolo e dos arquivos anexados à Plataforma Brasil.
O objetivo deste projeto de pesquisa é avaliar a redução da carga viral salivar por antissépticos orais (clorexidina 0,12%; H2O2 1%) em pacientes com teste positivo para COVID-19.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Prezado pesquisador: Caracteriza-se como risco direto para os participantes da pesquisa a possibilidade de desconforto ou constrangimento no momento do preenchimento dos questionários. Os pesquisadores devem se comprometer a minimizar os riscos ou desconfortos que possam vir a ser causados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Para avaliar a eficácia das soluções antissépticas orais, serão recrutados 36 indivíduos da Policlínica Piquet Carneiro da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, com sintomas de COVID-19 e que já haviam testado positivo para SARS-CoV-2 usando swabs nasofaríngeos. Os pacientes serão divididos em 3 grupos de 12 indivíduos e cada grupo receberá um enxaguatório bucal contendo: A- solução de clorexidina (0,12%); B: Solução de H2O2 (1%); ou C - placebo (água). A pesquisa está bem estruturada e o referencial teórico e metodológico estão explicitados, demonstrando aprofundamento e conhecimento necessários para sua realização. As referências estão adequadas e a pesquisa é exequível.

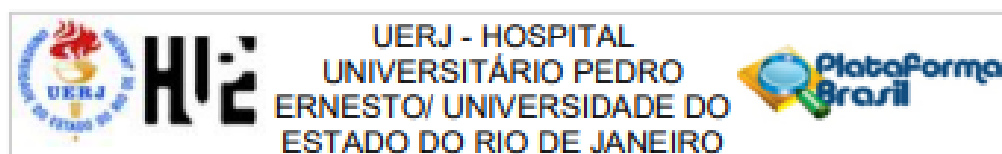
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram avaliadas as informações contidas na Plataforma Brasil e as mesmas se encontram dentro das normas vigentes e sem riscos iminentes aos participantes envolvidos de pesquisa.

Foram analisados os seguintes documentos de apresentação obrigatória:

- 1) Folha de Rosto para pesquisa envolvendo seres humanos: Documento devidamente preenchido, datado e assinado
- 2) Projeto de Pesquisa: Adequado
- 3) Orçamento financeiro e fontes de financiamento: adequado/apresentado
- 4) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Adequado
- 5) Cronograma: Adequado

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Tênis
Bairro: Vila Isabel **CEP:** 20.551-030
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21) 2968-8253 **E-mail:** cep.hupe.interno@gmail.com



Continuação do Parecer: 4.045.586

6) Documentos pertinentes à inclusão do HUPE: Adequado

7) Currículo do pesquisador principal e demais colaboradores: anexados e conforme as normas.

Os documentos de apresentação obrigatória foram enviados a este Comitê, estando dentro das boas práticas e apresentando todos dados necessários para apreciação ética e tendo sido avaliadas as informações contidas na Plataforma Brasil e as mesmas se encontram dentro das normas vigentes e sem riscos iminentes aos participantes envolvidos de pesquisa.

Recomendações:

De acordo com a Resolução 446/12 do Conselho Nacional de Saúde/CNS, o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), que deverá seguir os seguintes itens:

Acrescentar - Contato do Comitê de Ética em Pesquisa - Caso seja necessário você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do HUPE para esclarecimentos ou informações quanto a validade da pesquisa: Av. 28 de setembro, 77 térreo Vila Isabel – CEP 20551-030 - Tel: 21-2868.8253 – Email: cep-hupe@uerj.br.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto pode ser realizado da forma como está apresentado. Diante do exposto e à luz da Resolução CNS nº466/2012, o projeto pode ser enquadrado na categoria – APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em consonância com a resolução CNS 466/12 e a Norma Operacional CNS 001/13, o CEP recomenda ao Pesquisador: Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e no termo de consentimento livre e esclarecido, para análise das mudanças; Informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa; O Comitê de Ética solicita a V. Sª., que encaminhe relatórios parciais de andamento a cada 06 (seis) Meses da pesquisa e ao término, encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto; Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo

Bairro: Vila Isabel

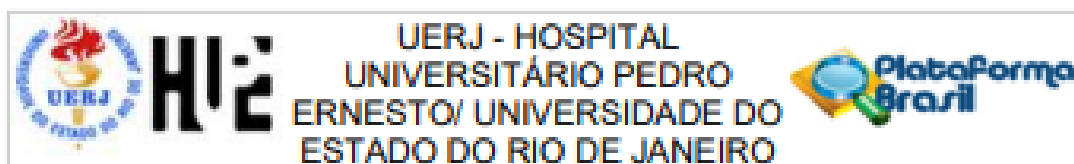
CEP: 20.551-030

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2868-8253

E-mail: cep.hupe.interno@gmail.com



Continuação do Parecer: 4.045.586

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1548293.pdf	30/04/2020 00:55:29		Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	30/04/2020 00:55:05	Justine Monteiro Monnerat Tinoco	Acelto
Declaração de concordância	CONCORDANCIA.pdf	30/04/2020 00:54:02	Justine Monteiro Monnerat Tinoco	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	vinculo_preenchido.pdf	30/04/2020 00:52:25	Justine Monteiro Monnerat Tinoco	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.pdf	30/04/2020 00:49:37	Justine Monteiro Monnerat Tinoco	Acelto
Orçamento	Orcamento.docx	30/04/2020 00:48:26	Justine Monteiro Monnerat Tinoco	Acelto
Cronograma	Cronograma.docx	30/04/2020 00:47:58	Justine Monteiro Monnerat Tinoco	Acelto
Folha de Rosto	Folha_de_rostoassinada.pdf	30/04/2020 00:47:44	Justine Monteiro Monnerat Tinoco	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 25 de Maio de 2020

Assinado por:
WILLE OIGMAN
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo

Bairro: Vila Isabel

CEP: 20.551-030

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21) 2588-8253

E-mail: cep.hups.interno@gmail.com

ANEXO B – Aceite do estudo 1 no Brazilian Dental Journal.

ScholarOne Manuscripts™ Taisa Guimarães ▾ English (US) ▾ Instructions & Forms Help Log Out

SciELO Brazilian Dental Journal

Home Author

Author Dashboard

Author Dashboard

2 Manuscripts I Have Co-Authored >

[Start New Submission](#) >

[Legacy Instructions](#) >

[5 Most Recent E-mails](#) >

Manuscripts I Have Co-Authored

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SUBMITTED
ADM: Feitosa, Carlos	BDJ-2021-4591.R1	SARS-COV-2 detection in saliva and nasopharyngeal swabs using RT-PCR was similar View Submission Submitting Author: FISCHER, RICARDO	23-Sep-2021	23-Sep-2021
Accept (05-Oct-2021)				
Contact Journal		Cover Letter		

ANEXO C – Estudo 2. Aceito para publicação no Oral Diseases.

Received: 22 October 2021 | Revised: 20 December 2021 | Accepted: 22 December 2021

DOI: 10.1111/odi.14118

ORIGINAL ARTICLE



Reducing the viral load of SARS-CoV-2 in the saliva of patients with COVID-19

Táísa Coelho Guimarães¹ | Barbara Bruno Fagundes Marques¹ | Marcelle Viana de Castro² | Daniele Angst Secco² | Luís Cristóvão Moraes Sobrino Porto^{2,3} | Justine Monteiro Monnerat Tinoco⁴ | Eduardo Muniz Barretto Tinoco¹ | Paul Fletcher⁵ | Ricardo Guimarães Fischer¹

¹Department of Periodontology, Dental School, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil

²Histocompatibility and Cryopreservation Laboratory, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil

³Service of Clinical Pathology, Piquet Carneiro Polyclinic, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil

⁴Department of Endodontic, Rio de Janeiro Federal University, Rio de Janeiro, Brazil

⁵Department of Periodontology, Stony Brook School of Dental Medicine, Stony Brook, New York, USA

Correspondence

Ricardo Guimarães Fischer, Dental School, Rio de Janeiro State University, Boulevard 28 de Setembro, 157, Vila Isabel- Rio de Janeiro, Brazil, CEP: 20551-030.
Email: ricardogfischer@icloud.com

Funding information

Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, Grant/Award Number: FAPERJ and E-26/202.810/2018

Abstract

Objective: To evaluate the reduction in the salivary viral load using oral antiseptic mouthwashes in patients testing positive for COVID-19.

Methods: Sixty-three individuals were recruited after testing positive for COVID-19 by real-time RT-PCR assay and divided into 5 groups. Group 1 received sterile water, group 2 received 1.5% hydrogen peroxide solution (HP), group 3 received 0.12% chlorhexidine (CHX), group 4 received 0.1% sodium hypochlorite solution (NaClO), and group 5 received sequential rinses using CHX and HP. After collecting the initial saliva sample, individuals were asked to use the designated mouthwash for 1 min. Additional saliva samples were collected immediately after rinsing, 15, and 30 min after rinsing. Real-time RT-PCR assays for RNA detection of SARS-CoV-2 were performed on the saliva samples.

Results: There were no significant differences among the experimental groups and the control group in any period. Compared to the baseline values, there was a significant reduction in the number of copies of SARS-CoV-2 after 30 min in group 2 and immediately after the initial mouthwash in group 4.

Conclusions: No experimental group demonstrated a significant reduction in the viral load compared to the control group.

KEYWORDS

coronavirus, COVID-19, dental health survey, oral hygiene, saliva

1 | INTRODUCTION

In late December 2019, the first documented cases of COVID-19 emerged in Wuhan, China, killing more than 1800 and infecting more than 70,000 people in the first 50 days of the epidemic (Shereen et al., 2020). COVID-19 causes severe acute respiratory syndrome by a coronavirus (SARS-CoV-2) (Zou et al., 2020). Coronaviruses are surrounded by a lipid envelope, into which spike glycoproteins are inserted (O'Donnell et al., 2020) and are considered members of the coronavirus β group, containing a single-stranded positive RNA as a

nucleic material (Li et al., 2020; Weiss & Navas, 2005). The standard transmission routes of SARS-CoV-2 include direct human-to-human transmission due to close contact with an infected person, exposure to coughing, sneezing, respiratory drops, or airborne particles (Li et al., 2020), and contact transmission (contact with oral and nasal mucous membrane) (Peng et al., 2020). Concerned by the alarming levels of spread and severity, on March 11, 2020, the World Health Organization (WHO) declared the outbreak of COVID-19 a pandemic. The disease has spread worldwide, and there have been 204 million reported cases and 4 million deaths as of August 12, 2021 (WHO, 2021).

Dental professionals and patients may be exposed to pathogenic microorganisms, such as bacteria and viruses that infect the oral cavity. These microorganisms may be transmitted in dental settings through inhalation of airborne microorganisms that may remain suspended in the air or by direct contact with blood and oral fluids (Peng et al., 2020). To minimize the spread of the virus in a dental office, dental professionals should identify suspected cases of COVID-19 by performing a triage that excludes patients with previous contact with COVID-19-positive individuals, having a recent history of fever, or having any other possible symptom of the disease (Izzetti et al., 2020). It is expected that patients with COVID-19, or suspected of having the disease, should not be treated in the dental clinic. However, a substantial proportion of SARS-CoV-2 transmission by patients may occur up to 11 days before symptom onset, with the proportion of presymptomatic transmission ranging from 37% to 48% (He et al., 2020).

It has been recommended that the patient rinses with mouthwash before a dental procedure (Izzetti et al., 2020; Peng et al., 2020). Preoperative oral antiseptic rinses have been used as a standard measure before routine dental treatment (Kosutic et al., 2009). They have been shown to reduce the number of microorganisms in the oral cavity, and there is also moderate evidence that preprocedural mouthwashes significantly decrease the number of microorganisms in the dental aerosols (Marui et al., 2019). It is essential to understand whether a mouthwash could reduce the risk of transmission of COVID-19 between the patient and the professional. In vitro studies have been carried out to determine whether mouthwashes, such as povidone-iodine, chlorhexidine digluconate, essential oils, and hydrogen peroxide, have a virucidal effect against SARS-CoV-2 that might mitigate the risk of virus transmission in the dental clinic (Brida et al., 2020; Meister et al., 2020). Few studies with small samples have been performed to evaluate the possible impact of preoperative rinsing with oral antiseptics on the SARS-CoV-2 viral load (Gottsauer et al., 2020; Seneviratne et al., 2021). Recently, Chaudhary et al. (2021) showed that the use of mouthrinses might decrease the viral load 15 and 45 min after initial rinsing. Therefore, this in vivo clinical study aimed to investigate whether rinsing with oral antiseptics would reduce the viral load of SARS-CoV-2 in a patient's saliva, thus decreasing the chances of spreading the virus during dental activity.

2 | MATERIALS AND METHODS

This nonrandomized double-blind clinical trial was approved by the Ethical Committee from Pedro Ernesto University Hospital (number 4.045.586) and registered in the Brazilian Clinical Trials Registry (number RBR-10hj7jyn). All patients included in the study gave written consent to participate. Individuals were recruited from outpatients from the Piquet Carneiro Polyclinic and Pedro Ernesto University Hospital from Rio de Janeiro State University and City Hospital São José. All patients completed a form containing general health questions and questions about symptoms of COVID-19 and

had at least one symptom of COVID-19. The sample size was calculated for the primary outcome (reducing the number of copies of SARS-CoV-2). Based on $\alpha = 0.05$ and assuming a 20% reduction in the number of copies after a mouthwash, a study with 12 patients in each group would have 80% power to detect significant differences. This human clinical trial was conformed to the CONSORT guidelines.

Initially, 376 patients entered the study. The individuals produced an initial sample of unstimulated saliva, part of which was tested for the presence of SARS-CoV-2 by RT-PCR assay. The remainder of the sample was stored in an individual sterile tube. After collecting the first sample, all individuals were asked to rinse with a designated mouthwash for one minute. Three additional saliva samples were collected: immediately after rinsing, 15 min after rinsing, and 30 min after rinsing. All samples were coded and immediately placed on ice and stored in a freezer (-80°C) until RNA extraction. The patients were not aware of which rinsing they were using. Codes were concealed from all patients and laboratory staff directly involved in the study until statistical analyses were completed. If the initial saliva samples were positive for the presence of SARS-CoV-2, the patient's 3 additionally collected saliva samples were analyzed further. Sixty-three of the 376 individual's prerinse saliva samples tested positive. These samples were separated into 5 groups, depending on the mouthwash used: group 1 (control), 15 patients (11 women and 4 men), had received 15 mL of sterile water, group 2 (12 patients, 9 women and 3 men), had received 15 mL of 1.5% hydrogen peroxide (HP), prepared by diluting HP 50:50 with H_2O , group 3 (12 patients, 4 women and 8 men), had received 15 mL of 0.12% chlorhexidine (Perioxidin, Lacer.), group 4 (12 patients, 6 women and 6 men), had received 15 mL of 0.1% sodium hypochlorite (NaClO), prepared by diluting 2.5 mL of standard household bleach (5%–6% NaClO) in 125 mL of H_2O , and group 5 (12 patients, 8 women and 4 men), had received 15 mL of 1.5% HP for one minute followed by 15 mL of 0.12% chlorhexidine (HP + CHX) for one minute (Figure 1). Each mouthwash was given on a specific day of the week.

The total nucleic acid from a saliva sample was extracted from 200 μL of viral transport medium using the Bio-Gene DNA/RNA Viral Extraction isolation kit (Bioclin[®]) following the manufacturer's protocol. The results were detected by the reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) technique with sequences of primers and probes from the molecular kit SARS-CoV-2 (E) Bio-Manguinhos of the Berlin Protocol. The target-specific amplification methodology with fluorescence-labeled probes was used to determine the presence of the SARS-CoV-2 envelope (E) gene and human RNase P as an extraction control. The equipment used in the amplification and detection stage was the 7500 RT PCR System and RT-qPCR assays for RNA detection of SARS-CoV-2 being performed from saliva samples. Ninety samples were randomly repeated (Pearson test = 0.9911) and retested with BIOMOL One-Step/COVID-19 ORF1ab and N gene targets (Pearson's test: E vs. Orf1ab Gene = 0.9771 and E vs. N = 0.9795) to correlate the CT results among different gene targets and assure reproducibility among assays during RT-qPCR.

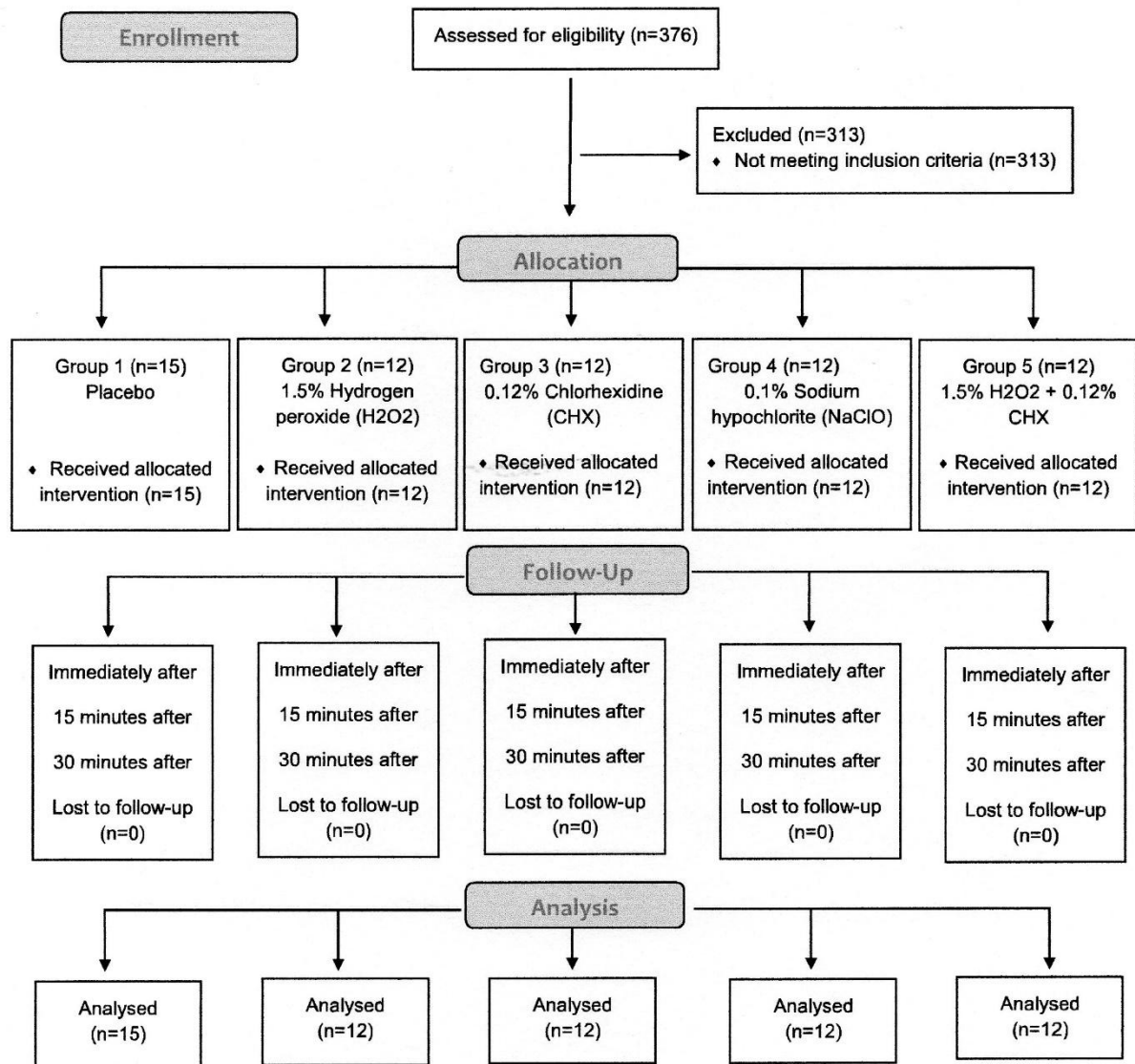


FIGURE 1 Flowchart for the selection of the patients

The CT limit of detection was 42. CT values were converted to the number of copies/ μ l, using the following formula (number of copies/ μ l = $-10^7 \cdot \text{LN}(\text{CT value}) + 5 \cdot 10^7$).

The statistical program SPSS 23.0 ("Statistical Package for Social Science") was used for data analysis. The Kolmogorov-Smirnov test indicated that the data were normally distributed. ANOVA test with Dunn's correction was used to verify differences between the number of copies/ μ l and the age in each experimental period. A two-way ANOVA test evaluated an interaction between observation time and type of mouthwash. The chi-square test assessed differences in the frequency of signs and symptoms related to COVID-19 between the 5 groups. The level of significance considered was 5%.

3 | RESULTS

There was no significant difference between groups for gender, mean age, number of smokers, or frequency of signs and symptoms related to COVID-19 (Table 1). A two-way ANOVA test indicated an interaction between observation time and type of mouthwash ($F = 1936$, $p = 0.0047$). There was no reduction in the mean values of the number of copies/ μ l of groups 1, 3, and 5 over time. Group 2 (1.5% HP) presented a significant reduction after 30 min ($p = 0.02$), while group 4 (0.1% NaClO) presented a significant reduction ($p = 0.03$) immediately after rinsing. Compared to the control group, no experimental group demonstrated a significant reduction in the viral load.

TABLE 1 Mean ($\pm$ SD) of age, gender distribution, frequency of smokers, and frequency of signs and symptoms in patients of each group

	Group 1 Placebo (n = 15)	Group 2 HP (n = 12)	Group 3 CHX (n = 12)	Group 4 NaClO (n = 12)	Group 5 HP+CHX (n = 12)	p value #
Age mean $\pm$ SD	51 $\pm$ 17.8	37.8 $\pm$ 11	46 $\pm$ 15.7	55 $\pm$ 17.3	40.4 $\pm$ 14.8	0.06
Gender female n (%)	11 (68.8)	9 (75)	4 (33.3)	6 (50)	8 (66.7)	0.21
Smoking n (%)	1 (6.3)	0 (0)	4 (33.3)	4 (33.3)	4 (33.3)	0.18
Fever n (%)	12 (75)	7 (58.3)	7 (58.3)	6 (50)	12 (100)	0.19
Cough n (%)	11 (68.8)	8 (66.7)	8 (66.7)	9 (75)	10 (83.3)	0.87
Unwellness n (%)	15 (93.8)	12 (100)	8 (66.7)	11 (91.7)	11 (91.7)	0.21
Loss of smell or taste n (%)	6 (37.5)	4 (33.3)	8 (66.7)	7 (58.3)	8 (66.7)	0.26
Abdominal pain n (%)	7 (43.8)	6 (50)	2 (16.7)	4 (33.3)	5 (41.7)	0.48

Note: HP-1.5% hydrogen peroxide, CHX- 0.12% chlorhexidine, and NaClO- 0.1% sodium hypochlorite.

#ANOVA test with Dunn's correction was used to verify differences in mean age and chi-square test to verify differences in the frequency of smokers and frequency of symptoms.

TABLE 2 Mean ($\pm$ SD) number of copies/ μ L in each group, at baseline, immediately after rinsing, 15, and 30 min after rinsing

	Group 1 Placebo (n = 15)	Group 2 HP (n = 12)	Group 3 CHX (n = 12)	Group 4 NaClO (n = 12)	Group 5 HP +CHX (n = 12)	p value 1
No copies/ μ L baseline	152 $\pm$ 16 $\times 10^5$	163 $\pm$ 21 $\times 10^5$	151 $\pm$ 14 $\times 10^5$	151 $\pm$ 14 $\times 10^5$	153 $\pm$ 16 $\times 10^5$	0.33
No copies/ μ L after	152 $\pm$ 28 $\times 10^5$	159 $\pm$ 18 $\times 10^5$	151 $\pm$ 17 $\times 10^5$	137 $\pm$ 21 $\times 10^{5*}$	146 $\pm$ 16 $\times 10^5$	0.07
No copies/ μ L 15 min	156 $\pm$ 25 $\times 10^5$	152 $\pm$ 15 $\times 10^5$	149 $\pm$ 19 $\times 10^5$	144 $\pm$ 24 $\times 10^5$	148 $\pm$ 13 $\times 10^5$	0.56
No copies/ μ L 30 min	149 $\pm$ 22 $\times 10^5$	149 $\pm$ 19 $\times 10^{5*}$	145 $\pm$ 18 $\times 10^5$	144 $\pm$ 20 $\times 10^5$	149 $\pm$ 16 $\times 10^5$	0.94
p-value 2	NS	0.02	NS	0.03	NS	

Note: HP- 1.5% hydrogen peroxide, CHX- 0.12% chlorhexidine, and NaClO- 0.1% sodium hypochlorite.

p-value 1- ANOVA test with Dunn's correction.

p-value 2- ANOVA test with repeated measurements.

*Significantly lower as compared to baseline values.

It was observed that some patients showed an increase in the number of copies/ μ L of SARS-CoV-2 immediately after the initial mouthwash. In groups 2 and 3, 4 out of 12 patients (33%) showed this increase. In groups 4 and 5, the corresponding increase was seen in one patient (8.3%).

4 | DISCUSSION

This study results indicated that, compared to the control group, no experimental group showed a significant viral load reduction. When compared with the baseline values, group 2 showed a statistically significant reduction after 15 min, while group 4 showed a significant reduction in viral load immediately after initial use of the mouthwash. These results were like those presented by Chaudhary et al. (2021). The authors showed a similar median reduction in the viral load of SARS-CoV-2 in saliva of patients with COVID-19 after 15 and 45 minutes after an initial rinsing with saline solution, 1% hydrogen peroxide, 0.12% chlorhexidine, and 0.5% povidone-iodine. All 4 mouthrinses reduced the viral load by 61% through 89% after 15 min. However, there were no differences between the 4 groups. In our study, the reduction in the

viral load ranged from 0.4% to 4.2% immediately after rinsing and from -0.2% to 7.1% after 15 min. These differences in the median reduction in the viral load may be related to the method of rinsing. In Chaudhary et al. (2021), the patients rinsed with 7.5 ml of the mouthrinse for 30 s and expectorated and rinsed the remaining 7.5 ml for 30 s. In our study, the patients rinsed 1 min with the mouthrinse, without interval. The absence of significant differences between experimental and control groups may be related to the number of patients in each group. A power sample calculation was performed before the start of the study, and it indicated that 12 patients in each group would be necessary to verify a 20% reduction in the viral load of SARS-CoV-2 in the saliva. However, this calculation was based on hypothetical numbers, since there was no previous study that evaluated this possible reduction in the viral load. Based on the results of this study, the power was 0.51. Chaudhary et al. (2021) also used a similar power calculation and selected 41 patients divided into 4 groups. In our study, we included 63 patients divided into 5 groups. Both studies did not observe differences between control and experimental groups. This study was not a randomized clinical trial, and the patients were selected if SARS-CoV-2 was detected after an initial examination and presented different levels of virus detection at baseline

among the groups. Significant differences were observed within group 2 (NaClO) and group 4, in different periods, but not significant when compared to the control group.

Health authorities in different countries have recommended using a preprocedure in-office antiseptic rinse before dental treatment, especially during the current pandemic (Herrera et al., 2020). The most frequently recommended agents are hydrogen peroxide, povidone-iodine, and chlorhexidine (Izzetti et al., 2020). However, these recommendations were based primarily on *in vitro* studies (Herrera et al., 2020). In this study, NaClO solution used as a preprocedure mouthwash significantly reduced the viral load immediately after the initial rinsing (Table 2). NaClO solutions are inexpensive, readily available, and offer a wide-spectrum, nonspecific killing efficacy on all microbes, including spores and viruses (Zehnder, 2006). It is widely used in endodontics as an irrigant during root canal instrumentation, as it dissolves necrotic tissue at concentrations less than 1% (Zehnder, 2006). Gonzalez et al. (2015) observed that rinsing with 0.25% NaClO for 25 weeks produced a reduction in bleeding on probing because of anti-plaque and anti-gingivitis effects. An *in vitro* study showed that NaClO might inactivate different viruses at different concentrations. The observed mechanism was particle degeneration, as there was a dramatic morphological change and loss of structure inside the virus particles (Shirai et al., 2000). NaClO has also been shown to be effective against SARS-CoV-2 in hand hygiene in two concentrations (0.05% and 0.25%) (Ma et al., 2020).

The mouthwash containing 1.5% HP significantly reduced the viral load 30 min after the initial rinsing compared to the viral load observed at baseline (Table 2). Since SARS-CoV-2 is vulnerable to oxidation, a preprocedural mouthwash containing oxidative agents such as HP may be recommended (Peng et al., 2020). Gottsauner et al. (2020) concluded in a pilot study that gargling mouth and throat with 1% HP does not decrease intraoral viral load after 30 min in SARS-CoV-2-positive individuals. HP causes oxygen-free radical-induced disruption of lipid membranes and is widely used as an agent for tooth whitening (O'Donnell et al., 2020). In addition, in a recent systematic review, it was effective in the inactivation of coronaviruses by biocidal agents in suspension tests, with a concentration of 0.5% and an incubation time of 1 min (Herrera et al., 2020). HP is rapidly inactivated by catalase in saliva and endogenous peroxidases in the oral environment (O'Donnell et al., 2020). *In vitro* immunological studies clearly illustrate that the use of HP in the epithelial cells of the nose, throat, and mouth can be exceptionally effective against viruses, including coronavirus (Caruso et al., 2020). However, even with the antimicrobial properties of HP, immediate recontamination of the oral cavity occurred as particles of a virus such as SARS-CoV-2 rapidly emanate from sources, such as respiratory secretions, oropharynx, salivary glands, and gingival fluid (Badran et al., 2020; Pallos et al., 2020; Park & Park, 1989; To, Tsang, Leung, et al., 2020; To, Tsang, Yip, et al., 2020; Xu et al., 2020).

CHX 0.12% used as a single mouthwash or in combination with 1.5% HP did not reduce the viral load of SARS-CoV-2 (Table 2).

CHX is a biguanide antiseptic with broad antimicrobial activity against bacteria, viruses, and yeast (Herrera et al., 2020). A recent systematic review indicated that using CHX as a preprocedural mouthwash significantly reduced the bacterial load in a dental aerosol (Marui et al., 2019). CHX has been reported to have an effective virucidal activity on enveloped viruses, such as herpes simplex virus 1 and 2, cytomegalovirus, influenza A, and hepatitis B (Baqui et al., 2001; Bernstein et al., 1990). An *in vitro* study indicated that CHX 0.12% might reduce the viral concentration of enveloped but not nonenveloped viruses (Bernstein et al., 1990). Peng et al. (2020) indicated that CHX might not be effective in killing the SARS-CoV-2 virus. There is an absence of *in vivo* data on the use of CHX mouthwashes to reduce the viral load related to SARS-CoV-2. Yoon et al. (2020) evaluated the effect of CHX mouthwash on SARS-CoV-2. Two hospitalized patients diagnosed with COVID-19 used 0.12% CHX (15 ml). This mouthwash was effective in reducing the SARS-CoV-2 viral load in saliva for a short-term period. However, this study had some limitations, including the small number of samples analyzed and the absence of a control group. Guidelines for diagnosing and treating novel coronavirus pneumonia released by the National Health Commission of the People's Republic of China (5th edition) stated that CHX might not be effective against SARS-CoV-2. As the virus is vulnerable to oxidation, using 1% HP or 0.2% povidone-iodine would be more appropriate for reducing the salivary load of oral microbes, including SARS-CoV-2 (Peng et al., 2020).

It was observed that saliva samples of some patients showed an increase in the number of copies of SARS-CoV-2 immediately after the initial mouth rinse. In both groups 2 and 3, 4 out of 12 patients (33%) demonstrated this increase. In groups 4 and 5, only one out of 12 patients (8.3%) showed an increase. Oral mouth rinses induce oral epithelial cell shedding, and lysis of infected cells may liberate genetic material in the oral cavity. This shedding might explain the initial increase in copies/μL of SARS-CoV-2 in certain patients, and why the mean reduction in viral load in groups 2 and 3 was only statistically significant after 30 min. As CHX may have reduced epithelial shedding by stabilizing the cell membrane, patients showing an initial increase in viral genetic material were less frequently observed in groups 4 and 5. Ten saliva samples from group 2 (HP) were submitted for viral culture using a plaque assay to assess whether the live virus was evident in the samples following rinsing. In this assay, viral infectivity was detected by foci of lysis of adherent cells on culture plates susceptible to infection by a virus. Even when foci of cell lysis were evident, no plaques with a morphology suggestive of plaques of SARS-CoV-2 could be identified. Thus, it was impossible to confirm the presence of infectious SARS-CoV-2 viral particles in cultures of HP oral rinse samples.

5 | CONCLUSIONS

No experimental group demonstrated a significant reduction in the viral load compared to the control group.

ACKNOWLEDGMENTS

This study received financial support from the Rio de Janeiro Foundation for Research Support (FAPERJ, E-26/202.810/2018).

CONFLICT OF INTEREST

All authors gave their final approval and agreed to be accountable for all aspects of the study. All authors reported no conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Taísa Coelho Guimarães: Data curation; Formal analysis; Investigation; Methodology; Writing – original draft. **Barbara Bruno Fagundes Marques:** Data curation; Formal analysis; Investigation; Methodology; Writing – original draft. **Marcelle Viana Castro:** Data curation; Formal analysis; Investigation; Supervision. **Daniele Angst Secco:** Data curation; Formal analysis; Investigation; Supervision; Writing – original draft. **Luis Cristovão Moraes Sobrinho Porto:** Conceptualization; Methodology; Resources; Supervision; Writing – review & editing. **Justine Monteiro Monnerat Tinoco:** Conceptualization; Methodology; Project administration; Writing – review & editing. **Eduardo Muniz Barretto Tinoco:** Conceptualization; Methodology; Supervision; Writing – original draft; Writing – review & editing. **Paul Fletcher:** Methodology; Visualization; Writing – review & editing. **Ricardo Guimaraes Fischer:** Conceptualization; Funding acquisition; Methodology; Resources; Supervision; Writing – original draft; Writing – review & editing.

PEER REVIEW

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1111/odi.14118>.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Barbara Bruno Fagundes Marques  <https://orcid.org/0000-0003-0876-8607>

Ricardo Guimarães Fischer  <https://orcid.org/0000-0003-0695-8159>

REFERENCES

- Badran, Z., Gaudin, A., Struillou, X., Amador, G., & Soueidan, A. (2020). Periodontal pockets: A potential reservoir for SARS-CoV-2? *Medical Hypotheses*, 143, 109907. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109907>
- Baqui, A. A. M. A., Kelley, J. I., Jabra-Rizk, M. A., DePaola, L. G., Falkler, W. A., & Meiller, T. F. (2001). In vitro effect of oral antiseptics on human immunodeficiency virus-1 and herpes simplex virus type 1. *Journal of Clinical Periodontology*, 28(7), 610–616. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.2001.028007610.x>
- Bernstein, D., Schiff, G., Ehler, G., Prince, A., Feller, M., & Briner, W. (1990). In vitro virucidal effectiveness of a 0.12%-chlorhexidine gluconate mouthrinse. *Journal of Dental Research*, 69(3), 874–876. <https://doi.org/10.1177/00220345900690030901>
- Bidra, A. S., Pelletier, J. S., Westover, J. B., Frank, S., Brown, S. M., & Tessema, B. (2020). Rapid in-vitro inactivation of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) using povidone-iodine oral antiseptic rinse. *Journal of Prosthodontics*, 29(6), 529–533. <https://doi.org/10.1111/jopr.13209>
- Caruso, A. A., Del Prete, A., & Lazzarino, A. I. (2020). Hydrogen peroxide and viral infections: A literature review with research hypothesis definition in relation to the current covid-19 pandemic. *Medical Hypotheses*, 144, 109910. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109910>
- Chaudhary, P., Melkonyan, A., Meethil, A., Saraswat, S., Hall, D. L., Cottle, J., Wenzel, M., Ayouty, N., Bense, S., Casanova, F., Chaney, M., Chase, H., Hermel, R., McClement, M., Sesson, C., Woolsey, B., & Kumar, P. (2021). Estimating salivary carriage of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in nonsymptomatic people and efficacy of mouthrinse in reducing viral load. A randomized controlled trial. *Journal of the American Dental Association*, 152(11), 903–908. <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2021.05.021>
- Gonzalez, S., Cohen, C. L., Galván, M., Alonizan, F. A., Rich, S. K., & Slots, J. (2015). Gingival bleeding on probing: Relationship to change in periodontal pocket depth and effect of sodium hypochlorite oral rinse. *Journal of Periodontal Research*, 50(3), 397–402. <https://doi.org/10.1111/jre.12219>
- Gottsauer, M. J., Michaelides, I., Schmidt, B., Scholz, K. J., Buchalla, W., Widbiller, M., Hitznrichler, F., Ettl, T., Reichert, T. E., Bohr, C., Vielsmeier, V., & Cieplik, F. (2020). A prospective clinical pilot study on the effects of a hydrogen peroxide mouthrinse on the intraoral viral load of SARS-CoV-2. *Clinical Oral Investigations*, 24(10), 3707–3713. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03549-1>
- He, X. I., Lau, E. H. Y., Wu, P., Deng, X., Wang, J., Hao, X., Lau, Y. C., Wong, J. Y., Guan, Y., Tan, X., Mo, X., Chen, Y., Liao, B., Chen, W., Hu, F., Zhang, Q., Zhong, M., Wu, Y., Zhao, L., ... Leung, G. M. (2020). Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nature Medicine*, 26(5), 672–675. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0869-5>
- Herrera, D., Serrano, J., Roldán, S., & Sanz, M. (2020). Is the oral cavity relevant in SARS-CoV-2 pandemic? *Clinical Oral Investigations*, 24(8), 2925–2930. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03413-2>
- Izzetti, R., Gennai, S., Nisi, M., Barone, A., Giuca, M. R., Gabriele, M., & Graziani, F. (2020). A perspective on dental activity during COVID-19: The Italian survey. *Oral Diseases*, 3, 694–702. <https://doi.org/10.1111/odi.13606>
- Kosutic, D., Uglesic, V., Perkovic, D., Persic, Z., Solman, L., Lupi-Ferandin, S., Knezevic, P., Sokler, K., & Knezevic, G. (2009). Preoperative antiseptics in clean/contaminated maxillofacial and oral surgery: Prospective randomized study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 38(2), 160–165. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2008.11.023>
- Li, Y., Ren, B., Peng, X., Hu, T., Li, J., Gong, T., Tang, B., Xu, X., & Zhou, X. (2020). Saliva is a non-negligible factor in the spread of COVID-19. *Molecular Oral Microbiology*, 35(4), 141–145. <https://doi.org/10.1111/omi.12289>
- Ma, Q. X., Shan, H., Zhang, H. L., Li, G. M., Yang, R. M., & Chen, J. M. (2020). Potential utilities of mask-wearing and instant hand hygiene for fighting SARS-CoV-2. *Journal of Medical Virology*, 92(9), 1567–1571. <https://doi.org/10.1002/jmv.25805>
- Marui, V. C., Souto, M. L. S., Rovai, E. S., Romito, G. A., Chambrone, L., & Pannuti, C. M. (2019). Efficacy of preprocedural mouthrinses in the reduction of microorganisms in aerosol: A systematic review. *Journal of the American Dental Association*, 150, 1015–1026. <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2019.06.024>
- Meister, T. L., Brüggemann, Y., Todt, D., Conzelmann, C., Müller, J. A., Groß, R., Münch, J., Krawczyk, A., Steinmann, J., Steinmann, J., Pfander, S., & Steinmann, E. (2020). Virucidal efficacy of different oral rinses against severe acute respiratory syndrome Coronavirus

2. *Journal of Infectious Diseases*, 222(8), 1289–1292. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa471>
- O'Donnell, V. B., Thomas, D., Stanton, R., Maillard, J.-Y., Murphy, R. C., Jones, S. A., Humphreys, I., Wakelam, M. J. O., Fegan, C., Wise, M. P., Bosch, A., & Sattar, S. A. (2020). Potential role of oral rinses targeting the viral lipid envelope in SARS-CoV-2 infection. *Function*, 1(1):zqaa002. <https://doi.org/10.1093/function/zqaa002>
- Pallos, D., Ruivo, G. F., Ferrari-Junior, S. H., Pannuti, C. S., Perozini, C., Sarmiento, D. J. S., Palmieri, M., Souza, A. C. M. F., Tozetto-Mendoza, T. R., Doglio, A., & Braz-Silva, P. H. (2020). Periodontal disease and detection of human herpesviruses in saliva and gingival crevicular fluid of chronic kidney disease patients. *Journal of Periodontology*, 91(9), 1139–1147. <https://doi.org/10.1002/JPER.19-0583>
- Park, J. B., & Park, N. H. (1989). Effect of chlorhexidine on the in vitro and in vivo herpes simplex virus infection. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 67(2), 149–153. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(89\)90320-4](https://doi.org/10.1016/0030-4220(89)90320-4)
- Peng, X., Xu, X., Li, Y., Cheng, L., Zhou, X., & Ren, B. (2020). Transmission routes of 2019-nCoV and controls in dental practice. *International Journal of Oral Science*, 12(1):9. <https://doi.org/10.1038/s41368-020-0075-9>
- Seneviratne, C. J., Balan, P., Ko, K. K. K., Udawatte, N. S., Lai, D., Ng, D. H. L., Venkatachalam, I., Lim, K. S., Ling, M. L., Oon, L., Goh, B. T., & Sim, X. Y. J. (2021). Efficacy of commercial mouth-rinses on SARS-CoV-2 viral load in saliva: Randomized control trial in Singapore. *Infection*, 1, 3. <https://doi.org/10.1007/s15010-020-01563-9>
- Shereen, M. A., Khan, S., Kazmi, A., Bashir, N., & Siddique, R. (2020). COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *Journal of Advanced Research*, 24, 91–98. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.03.005>
- Shirai, J., Kanno, T., Tsuchiya, Y., Mitsubayashi, S., & Seki, R. (2000). Effects of chlorine, iodine, and quaternary ammonium compound disinfectants on several exotic disease viruses. *Journal of Veterinary Medical Science*, 62(1), 85–92. <https://doi.org/10.1292/jvms.62.85>
- To, K. W., Tsang, O. Y., Leung, W. S., Tam, A. R., Wu, T. C., Lung, D. C., Yip, C. Y., Cai, J. P., Chan, J. C., Chik, T. H., Lau, D. L., Choi, C. C., Chen, L. L., Chan, W. M., Chan, K. H., Ip, J. D., Ng, A. K., Poon, R. S., Luo, C. T., ... Yuen, K. Y. (2020). Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: An observational cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(5), 565–574. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30196-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30196-1)
- To, K. W., Tsang, O. Y., Yip, C. Y., Chan, K. H., Wu, T. C., Chan, J. C., Leung, W. S., Chik, T. H., Choi, C. C., Kandamby, D. H., Lung, D. C., Tam, A. R., Poon, R. S., Fung, A. F., Hung, I. N., Cheng, V. C., Chan, J. W., & Yuen, K. Y. (2020). Consistent detection of 2019 novel coronavirus in saliva. *Clinical Infectious Diseases*, 71(15), 841–843. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa149>
- Weiss, S. R., & Navas-Martin, S. (2005). Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(4), 635–664. <https://doi.org/10.1128/mmbr.69.4.635-664.2005>
- World Health Organization (2021). *Coronavirus disease (COVID-19) dashboard*. World Health Organization. <https://covid19.who.int/>
- Xu, J., Li, Y., Gan, F., Du, Y., & Yao, Y. (2020). Salivary glands: Potential reservoirs for COVID-19 asymptomatic infection. *Journal of Dental Research*, 99, 989. <https://doi.org/10.1177/0022034520918518>
- Yoon, J. G., Yoon, J., Song, J. Y., Yoon, S.-Y., Lim, C. S., Seong, H., Noh, J. Y., Cheong, H. J., & Kim, W. J. (2020). Clinical significance of a high SARS-CoV-2 viral load in the saliva. *Journal of Korean Medical Science*, 35(20):e195. <https://doi.org/10.3346/JKMS.2020.35.E195>
- Zehnder, M. (2006). Root Canal Irrigants. *Journal of Endodontics*, 32, 389–398. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.09.014>
- Zou, L., Ruan, F., Huang, M., Liang, L., Huang, H., Hong, Z., Yu, J., Kang, M., Song, Y., Xia, J., Guo, Q., Song, T., He, J., Yen, H.-L., Peiris, M., & Wu, J. (2020). SARS-CoV-2 Viral load in upper respiratory specimens of infected patients. *New England Journal of Medicine*, 382(12), 1177–1179. <https://doi.org/10.1056/nejmc2001737>

How to cite this article: Guimarães, T. C., Marques, B. B. F., Castro, M. V. D., Secco, D. A., Porto, L. C. M. S., Tinoco, J. M. M., Tinoco, E. M. B., Fletcher, P., & Fischer, R. G. (2022). Reducing the viral load of SARS-CoV-2 in the saliva of patients with COVID-19. *Oral Diseases*, 00, 1–7. <https://doi.org/10.1111/odi.14118>