



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE EDUCAÇÃO TUTORIAL (PET-FARMÁCIA)



Tutora: Profa. Dra. Leônia Maria Batista

11º Consultoria Acadêmica-Disciplina: Microbiologia

Bolsista: Letícia Augusta Schmidt da Costa Miranda – Graduanda do 7º período

Orientada por: Profª. Drª. Darlene Camati Persuhn

TESTE MOLECULAR e teste rápido NO DIAGNÓSTICO DO COVID-19.

1. Introdução

No final de 2019 na cidade de Wuhan, China iniciou a epidemia de uma síndrome respiratória aguda (SARS) muito grave. O patógeno responsável é um vírus de RNA simples, envelopado, classificado como betacoronavírus, que recebe a nomenclatura de SARS-CoV-2 devido ao fato desse vírus está atrelado ao desenvolvimento da Síndrome Respiratória Aguda Grave (Y. Wu et al, 2020).

A transmissão dessa doença pode ocorrer tanto por pessoas contaminadas, como assintomáticas e até mesmo pelo contato com superfícies que apresentem partículas virais depositadas. A liberação dessas partículas virais ocorre, na maioria dos casos, via gotículas liberadas durante a fala, espirros e tosse. Ainda não se tem comprovação quanto a transmissão fecal-oral e sanguínea (OPAS, 2020; ABIH; SBI; CBR; SBA; Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia; SOBED; AMIB; USP; Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2020).

A capacidade de transmissão de vírus é maior do que os causadores de SARS verificadas anteriormente no mundo. Por isso, embora a infecção tenha menor capacidade de causar a morte, tem potencial de infectar um percentual muito elevado de pessoas o que pode desencadear o colapso dos sistemas de atendimento de saúde (CHAN et al, 2015; CHENG et al, 2007).

2. Diagnóstico

Associado a detecção dos sintomas clínicos, o diagnóstico do COVID-19 pode ser realizado por meio de exames laboratoriais como Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), Reação de Amplificação em tempo real da Reação da Polimerase em Cadeia (RT-PCR), imunofluorescência e imunocromatografia (BRASIL,2020a).

De acordo com a ANVISA, cerca de 90 testes estão sendo disponibilizados no país para a realização do diagnóstico do COVID-19, tais dados estão expressos no quadro 1 (BRASIL,2020a).

Quadro 1. Distribuição dos testes moleculares dispostos pela ANVISA, para o diagnóstico do COVID-19, 2020.

Teste	Material utilizado	Alvo de detecção	Nº
Imunocromatografia	Sangue, soro e plasma	IgG IgM	52
	Swab oro/nasofaríngeo	Ag	1
RT-PCR	Lavado bronco-alveolar, swab nasofaríngeo, swab orofaríngeo e escarro	Genes RdRp, E e N	4
	Swab nasal e orofaríngeo	Genes N1 e N2	1
	-Aspirado nasofaríngeo / swab combinado (naso/oro), fezes e escarro	Genes ORF1ab e N	8
	Swab oro/nasofaríngeo	Genes RdSp-CoV-2 RdRp e N	1
	Swab oro/nasofaríngeo	Genes RdRp e N	1
	Swab oro/nasofaríngeo	Gene ORF1 SARS-CoV-2	1
	Escarro, swab naso/orofaríngeo	Genes RdRp, E	3
	Aspirado nasofaríngeo /	Genes Rp, E, P1	1

	swab triplo combinado		
	Aspirado nasofaríngeo	Genes Rp e E	1
	Swab naso e orofaríngeo	Genes E, S	1
	Secreção Nasofaríngea	Genes RdRp, N e E	1
	Aspirado/secreção nasofaríngea, escarro, lavado bronquico	Genes N e E	1
	Swab oro e nasofaríngeo	Gene S	1
	Swab/aspirado nasofaríngeo, lavagem broncoalveolar	Genes ORF1ab, N, S	1
	Swab nasofaríngeo e lavado/aspirado nasal	Genes E, N2	1

Fonte: portal.anvisa.gov.br

Dentre os métodos de diagnóstico expostos, o teste RT-PCR é considerado o padrão, possuindo especificidade de cerca de 100%, com sensibilidade variando entre 63% a 93%. Caso haja necessidade de repeti-lo é indicado que o teste seja feito na segunda semana dos sintomas (DIAS et al, 2020).

Em relação aos exames sorológicos, esses possuem maior sensibilidade após a primeira semana dos sintomas (DIAS et al, 2020). Dessa forma, serão evidenciados a seguir os métodos de diagnóstico mais utilizados para a detecção do COVID-19.

2.1 Imunocromatografia

Assim como os demais testes abordados, a imunocromatografia detecta a formação do complexo Ag-Ac através de um dispositivo imunocromatográfico, que é constituído de uma membrana porosa de celulose modificada. O esquema metodológico desse teste se constitui por uma fase sólida, local onde são mobilizados os agentes de captura e uma fase móvel formada por conjugados e a amostra a ser analisada (BRASIL, 2010).

Dessa forma é adicionada uma gota de sangue da amostra contendo o anticorpo contra a doença a ser diagnosticada, essa gota é misturada ao conjugado formando um complexo. Por capilaridade esse complexo migra até a linha de captura (linha teste T), que contém moléculas do antígeno que ao se conectarem formam um complexo responsável pela emissão de cor. Em seguida esse novo complexo formado se conecta a uma segunda linha da fase móvel (linha de controle C), cuja função é averiguar se houve a migração do conjugado pela fase móvel, através da formação de um terceiro complexo entre o conjugado livre e a molécula da captura. Dessa forma, tanto quando o teste é positivo ou não, a linha do controle deve permanecer colorida para garantir a eficácia do teste (BRASIL, 2010).

Como limitações desses testes, inclui-se apenas o diagnóstico auxiliar ao COVID-19 sendo um resultado qualitativo, além disso, o teste pode indicar um falso negativo, devido à baixa quantidade de anticorpos circulantes no início da infecção. Somado a isso, o nível do hematócrito total pode alterar o resultado, sendo recomendável, esses estejam entre 25% e 65% (BRASIL, 2020b; BRASIL, 2020c).

2.2 RT-PCR

A reação de amplificação em tempo real (RT-PCR), consiste em uma modificação da reação da polimerase em cadeia, que por sua vez, pode ser definida como uma técnica de biologia molecular que possibilita a amplificação e replicação do DNA do agente infeccioso. Tendo em vista que em alguns microrganismos o material genético encontra-se sob a forma de RNA, a transcrição reversa torna-se imprescindível, visto que essa técnica possibilita a formação do DNA de fita dupla a partir da molécula de RNAm, utilizando, dentre outros componentes, a enzima DNA-polimerase RNA-dependente (LADEIRA; ISAAC; FERREIRA, 2011).

Após o processo de extração e purificação do RNAm, inicia-se a técnica de PCR, realizada em ciclos, no aparelho termociclado. Em um tubo de ensaio são adicionados os seguintes elementos: *primers*, desoxinucleotídeos trifosfatados, enzima DNA polimerase termoestável, íons magnésio e uma solução tampão. A partir disso, iniciam-se os ciclos em diferentes temperaturas,

que resultam na molécula *amplicon*. Para a visualização dessa molécula, é necessário a técnica de eletroforese em gel de agarose, contendo um corante fluorescente de DNA, para posterior observação transiluminador de luz ultravioleta (WANDERLEY, 2017; LADEIRA; ISAAC; FERREIRA, 2011).

Como alvos utilizados para a detecção do coronavírus, destacam-se gene E (proteínas do envelope viral), gene S (espiga), gene N (nucleocapsídeo viral), gene ORF1ab (estrutura de leitura) e gene RdRp (RNA polimerase dependente de RNA). Um estudo realizado por KASTEREN et al, avaliou as seguintes marcas de teste (Altona Diagnostics, BGI, CerTest Biotec, KH Medical, PrimerDesign, R-Biopharm AG e Seegene) e verificou que todos os testes conseguiram detectar o vírus SARS-CoV-2. Além disso, nenhum ensaio evidenciou reação cruzada, exceto o do gene E, uma vez, que esse é expresso no vírus SARS-CoV-1, no entanto tal reação cruzada não oferece risco a veracidade e qualidade do teste, tendo em vista que o SARS-CoV-1, não se apresenta exposto na população (KASTEREN et al, 2020).

A escolha de onde obter a amostra pode apresentar diferenças no diagnóstico, de forma que, para pacientes que apresentam casos da doença grave ou progressiva é recomendado que a amostra seja do trato respiratório inferior. Para casos de pacientes assintomáticos ou que apresentem sintomas brandos, é preferível que a coleta seja realizada por meio de swab na região nasofaríngea (HONG et al, 2020).

Com relação a interpretação da confirmação ou não dos casos, a identificação pode ocorrer com mais de um gene, de modo que um gene é utilizado como forma de triagem, enquanto o outro como método confirmatório, sendo necessário a detecção de todos os genes para se obter um resultado positivo para a infecção. Vale ressaltar que, para os casos em que o teste de triagem seja negativo e o teste de confirmação seja positivo, deve-se refazer o exame (HONG et al, 2020).

Mesmo sendo o método padrão de diagnóstico, o RT-PCR, possui algumas limitações, como amostras que apresentem inibidores da PCR podem ocasionar em um resultado falso positivo, sendo necessário a realização de diluição da amostra. Ademais, contaminações cruzadas podem ocorrer durante o processo de coleta interferindo no resultado do exame. Diferentemente dos

outros métodos de diagnóstico, o RT-PCR necessita de um profissional habilitado para a interpretação dos resultados o que torna se acesso mais dificultoso (BRASIL, 2020d; BRASIL, 2020e).

3. Conclusão

Diante do exposto, as técnicas de diagnóstico molecular tornam-se imprescindíveis para o contexto da saúde, uma vez que sua alta especificidade e rapidez nos resultados, possibilitando o início do tratamento o mais rápido possível, e para as doenças que ainda não possuem um esquema terapêutico conciso, como o caso do COVID-19, são de extrema importância para auxiliar no isolamento social, ajudando assim no combate da doença.

Referências:

Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA. Instruções de Uso. ALL test. Disponível em:< file:///C:/Users/Rafael/Downloads/INSTRUCAO-DE-USO%20-%201%20de%203.PDF>. 2020b.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA. Instruções de Uso. ImunoTest COVID-19. Disponível em:< file:///C:/Users/Rafael/Downloads/INSTRUCAO-DE-USO%20-%201%20de%201%20(5).PDF>. 2020c.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA. Instruções de Uso. BIO GENE. Disponível em:<file:///C:/Users/Rafael/Downloads/Instru%C3%A7%C3%A3o%20de%20Uso%20-%20BIO%20GENE%20COVID-19%20PCR.PDF>. 2020d.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA. Instruções de Uso. GENCURIX. Disponível em:< file:///C:/Users/Rafael/Downloads/INSTRUCAO-DE-USO%20-%201%20de%201%20(10).PDF>. 2020e.

Associação Brasileira dos Profissionais em Controle de Infecções e Epidemia Hospitalar (ABIH); Sociedade Brasileira de Ingectologia (SBI); Colégio Brasileiro de Radiologia e Diagnóstico por Imagem (CBR); Sociedade Brasileira de Anestesiologia (SBA); Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia; Sociedade Brasileira de Endoscopia Digestiva (SOBED); Associação de Medicina Intensiva Brasileira (AMIB); Universidade de São Paulo (USP); Sociedade Brasileira de Nefrologia. GRUPO FORÇA COLABORATIVA COVID-19 BRASIL. Orientações sobre Diagnóstico, Tratamento e Isolamento de Pacientes com COVID-19. Disponível em: <<https://www.infectologia.org.br/admin/zcloud/125/2020/04/58d801e961f64463109881311316e4e661d8a1e865fb7638ad61c0827cd83430.pdf>>. 2020.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Produtos para diagnóstico in vitro de COVID-19 regularizados. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/informacoestecnicas13//asset_publisher/WvKKx2fhdiM2/content/prioridade-de-analise-em-situacoes-de-aumento-da-seguranca-de-uso-dos-produt-1/33912?redirect=%2Fprodutos-para-asaude&inheritRedirect=true>. 2020a

BRASIL. Fundação Oswaldo Cruz. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. v. 4. 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA. Instruções de Uso. Infection AFIAS COVID-19 Ab. Disponível em: <file:///C:/Users/Rafael/Downloads/BL3683%20-%20REV02%20-%2004-2020%20-%20%20AFIAS%20COVID-19%20Ab.PDF>. 2020d

DIAS, V. M. C. H et al. J. **Infect. Control**. v. 9, n. 2, p. 1-20. 2020.

LADEIRA, P. R. S; ISAAC, C; FERREIRA, M. C. Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real. **Rev Med**. v. 90, n. 1, p. 47-51. jan-mar, 2011.

Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). Folha informativa – COVID-19 (doença causada pelo novo coronavírus). Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=6101:covid19&Itemid=875>. 2020.

RIBEIRO, H. F et al. *Imunologia Clínica*. 1 ed. Porto Alegre: Editora SAGAH, 2019.

WANDERLEY, Leandro Batista. **Avaliação da técnica Nested-PCR no diagnóstico de Schistosoma mansoni em caramujos e amostras biológicas humanas**. 2017. f. 86 Tese: Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz, Recife-PE, 2017.

Y. Wu et al. A noncompeting pair of human neutralizing antibodies block COVID-19 virus binding to its receptor ACE2. **Science**. 2020.

KASTEREN, P. B. V et al. Comparação de kits de diagnóstico comercial de RT-PCR para COVID-19. **Jornal Clínico Virologia**. 2020

HONG, K. H et al. Guidelines for Laboratory Diagnosis of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in Korea. **Ann Lab Med**. v. 40, n. 5, p. 351-360. 2020.

CHAN, J. F et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus: another zoonotic betacoronavirus causing SARS-like disease. **Clin Microbiol Rev**. v. 28, p. 465-522, 2015.

CHENG, V. C. C et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. **Clin Microbiol Rev**. v. 20, p. 660-694, 2007.