



Aula 4 – Compreendendo conceitos e aplicabilidades dos testes de biologia molecular



Ficha Técnica

Supervisão – Marcela Santos

Coordenação Pedagógica – Hirla Arruda

Conteudista – Sarah Mendes

Revisão técnica – Luciano Pamplona

Revisão – Keila Resende

Design Instrucional – Guilherme Duarte

Ilustração - Guilherme Duarte

Supervisão – Associação Brasileira de Profissionais de
Epidemiologia de Campo – ProEpi

Sara Ferraz

Supervisão – Sala de Situação – Universidade de Brasília

Jonas Brant

Copyright © 2021, Associação Brasileira de Profissionais de Epidemiologia de Campo.

Todos os direitos reservados.

A cópia total ou parcial, sem autorização expressa do(s) autor(es) ou com o intuito de lucro, constitui crime contra a propriedade intelectual, conforme estipulado na Lei nº 9.610/1998 (Lei de Direitos Autorais), com sanções previstas no Código Penal, artigo 184, parágrafos 1º ao 3º, sem prejuízo das sanções cabíveis à espécie.

Sumário

Contextualização	6
RT-PCR	6
RT LAMP	8
3.1. Como funciona o RT-LAMP?	9
Conclusão	10
Referências	12

Aula 4 – Compreendendo conceitos e aplicabilidades dos testes de biologia molecular



Tecnologia foto criado por DCStudio - br.freepik.com

Olá,

Ao final desta aula, você compreenderá os conceitos e aplicabilidades dos testes, considerando as vantagens e limitações dos testes de biologia molecular do tipo **RT-PCR em tempo real (RT-qPCR) e RT-LAMP**.

Contextualização

A pandemia da Covid-19 trouxe o campo dos diagnósticos para o centro das atenções. A melhor e mais robusta evidência de infecção viral ocorre a partir da detecção de fragmentos do vírus, **como proteínas ou ácidos nucleicos**, em testes virológicos no organismo humano.

Os testes de amplificação de ácido nucleico (do inglês: *nucleic acid amplification tests* - NAATs) permitem identificar a presença do material genético (RNA) do vírus SARS-CoV-2 em amostras de secreção respiratória, por meio das metodologias de RT-PCR em tempo real (RT-qPCR) e RT-LAMP (amplificação isotérmica mediada por alça com transcrição reversa).

Apesar de serem os mais indicados, o alto custo desses testes também pode limitar a cobertura de testagem a ser alcançada, essencialmente em países de baixo desenvolvimento socioeconômico.

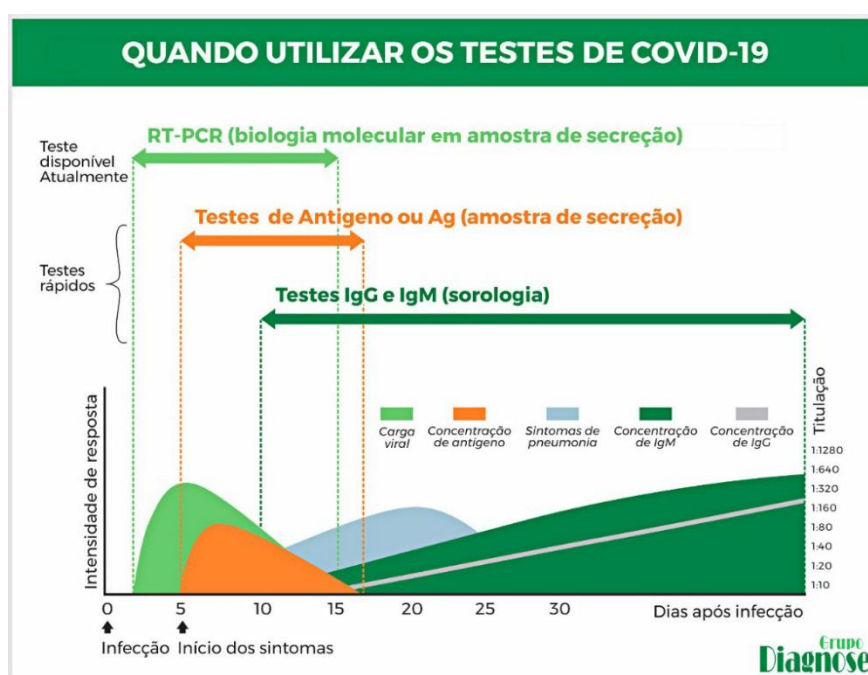
RT-PCR

O RT-PCR é o teste recomendado pela OMS para o diagnóstico e monitoração **de indivíduos com infecções ativas**. No caso de pessoas sintomáticas, o RNA viral torna-se detectável desde o **primeiro dia dos sintomas e seu pico ocorre na primeira semana dos sintomas**.

O declínio da carga viral começa a ocorrer a partir do 10º ao 11º dia do início da sintomatologia, mas em alguns casos, ainda pode ser detectada até o 28º dia do início dos sintomas em pacientes recuperados.

Ressalta-se que alguns estudos mostram que a carga viral detectada a mais de 20 dias ocorreu em um terço dos pacientes, sendo que a detecção prolongada

representa um desafio para as **limitadas instalações de isolamento hospitalar**, uma vez que os pacientes podem não receber alta até o RNA (ácido ribonucleico) viral se tornar indetectável. Entretanto, ainda não se sabe se esses pacientes continuam eliminando vírus vivos, já que a soropositividade concomitante pode caracterizar que os *virions* estão revestidos com anticorpos do hospedeiro, tornando-os não infecciosos. Significa que mesmo com teste detectável, a probabilidade de infectar outros indivíduos após 20 dias é reduzida, pois o vírus está “inativado” pelos anticorpos.



O teste de RT-PCR possui alta sensibilidade e especificidade para detectar a infecção por SARS-CoV-2. Os indivíduos infectados podem testar positivo mesmo **sem sintomas** (assintomáticos), **antes do início dos sintomas** (período pré-sintomático) e **durante a doença** (sintomáticos).

É importante destacar que **resultados negativos** não excluem, necessariamente, a infecção por SARS-CoV-2 (principalmente em indivíduos com clínica sugestiva). Uma série de fatores podem levar a um resultado falso negativo em um indivíduo infectado, incluindo:

- amostra coletada no final do curso da doença, ou amostra retirada de uma parte do corpo que não continha o vírus naquele momento;
- amostra não manuseada e/ou transportada e/ou armazenada apropriadamente; e
- razões técnicas próprias do teste, por exemplo, inibição da PCR ou mutação viral.

Algumas limitações são observadas para a ampla utilização do teste RT-PCR, pois uma demanda sem precedentes por diagnósticos RT-PCR tem sobrecarregado todos os aspectos da condução desses ensaios laboratoriais.

Apesar da disponibilidade de protocolos desenvolvidos rapidamente, a escassez de materiais (por exemplo, cotonetes, reagentes e consumíveis) e de infraestrutura (instalações aprovadas, técnicos e equipamento) têm inviabilizado o teste, rastreamento e isolamento eficientes de indivíduos infecciosos. Essas carências levaram a uma crise global de saúde pública de consequências ainda imprevistas.

RT LAMP

Entre os métodos rápidos de direcionamento aos ácidos nucleicos, a **amplificação isotérmica mediada por loop de transcrição reversa** (RT-LAMP - *Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification*) ganhou destaque durante o curso da pandemia de Covid-19. Além de sua natureza isotérmica, o que elimina a necessidade de instrumentos complexos como termocicladores necessários para PCR, o RT-LAMP é atraente, pois produz uma imensa quantidade de produtos de amplificação que permitem a detecção visual a olho nu por meio de diversos métodos.

Desde o surgimento da Covid-19, vários conjuntos de primers para SARS-CoV-2 e variações no método RT-LAMP foram publicadas e alguns receberam autorização para uso de emergência pela *Food and Drug Administration* dos EUA (FDA).

Mesmo que o fluxo de trabalho RT-LAMP ofereça resultados mais rápidos do que RT-PCR e seja altamente escalonável, ainda requer um técnico treinado para realizar o ensaio, bem como envio e armazenamento a frio de reagentes. No entanto, um teste rápido habilitado para LAMP acessível foi desenvolvido para resolver algumas das deficiências.

Portanto, o teste RT-LAMP é um dos testes que chegou com a promessa de ter boa capacidade de detecção populacional para Covid-19, devido ao seu processamento rápido, principalmente, por não ter a etapa de extração e de purificação do RNA do vírus.

3.1. Como funciona o RT-LAMP?

Durante o procedimento do teste RT-LAMP, ocorre a transcrição reversa (RT), que é o momento em que o RNA viral é transcrito reversamente em DNA. Com base nisso, regiões específicas do **genoma viral são amplificadas por meio da metodologia LAMP** (*Loop-mediated isothermal amplification*). No RT-LAMP, a amplificação é feita de forma isotérmica, ou seja, em temperatura fixa, por cerca de uma hora, visando a detecção molecular do RNA do vírus causador da Covid-19. Ele é um teste que deve ser utilizado durante a fase precoce da doença, até o término da primeira semana desde o aparecimento dos sintomas.

A saliva é o material utilizado para esse tipo de teste, o que facilita e auxilia na coleta, evitando os inconvenientes inerentes ao Swab de naso e orofaríngeo, utilizado no RT-PCR. Além disso, essa forma de coleta diminui o risco de contaminação do responsável pela coleta e o gasto com Equipamentos de Proteção Individual (EPIs).

Após a coleta, a amostra tem estabilidade de **até três dias em temperatura ambiente**.

Apesar da sua praticidade, o RT-LAMP ainda não deve ser considerado um teste substituto do RT-PCR. Uma das limitações é a sua menor sensibilidade quando comparado ao RT-PCR. Desenvolvedores do RT-LAMP estão buscando aumentar sua sensibilidade de detecção, tornando o procedimento capaz de detectar o vírus mesmo quando presente em número muito baixo de cópias de RNA viral na saliva.

Mesmo que a coleta de saliva tenha inúmeras vantagens, ela contém substâncias que podem **inibir a ação das enzimas usadas para a detecção viral**, além de degradar o próprio material genético do vírus e interferir na reação de amplificação. Por esse motivo, está em andamento um processo de padronização do teste com a utilização de soluções químicas que são capazes de manter o RNA viral estável por mais tempo, não sofrendo ação de enzimas presentes na saliva. Além disso, estudos realizados por grupos internacionais desenvolvendo o RT-LAMP para a detecção de outros vírus, além do coronavírus causador da Covid-19, tiveram que recorrer a alterações do protocolo original para aumentar a sensibilidade para um nível próximo da sensibilidade do RT-PCR.

Devido à praticidade e ao menor tempo de execução, e após a melhoria na sensibilidade, o RT LAMP poderá se tornar adequado para a investigação da presença de SARS-CoV-2 em grandes grupos de pessoas. Para a investigação de amostras vindas de pacientes com suspeita clínica ou pacientes que apresentem vínculo epidemiológico com indivíduos diagnosticados, o RT-PCR permanece como a técnica mais recomendada (padrão ouro).

Conclusão

Na aula de hoje, você conheceu detalhes acerca dos dois testes de biologia molecular disponíveis no momento para diagnóstico laboratorial de Covid-19. O RT-PCR é o teste recomendado para o diagnóstico e monitoração de indivíduos com

infecções ativas. Algumas limitações são observadas para a ampla utilização do teste RT-PCR, dentre elas a escassez de materiais e de infraestrutura. O RT LAMP ganhou destaque durante o curso da pandemia de Covid-19, pois além de sua natureza isotérmica, o que elimina a necessidade de instrumentos complexos como termocicladores necessários, a saliva é o material utilizado para este tipo de teste, o que facilita a coleta e ajuda a evitar os inconvenientes inerentes ao Swab de naso e orofaríngeo, utilizado no RT-PCR.

Referências

BULA kit In vitro diagnostic medical device Allplex™ 2019-nCoV Assay – Seegene Inc.

BULA kit in vitro diagnostic Xpert® Xpress SARS-CoV-2 . Cepheid®.

BULA kit in vitro diagnostic Abbott RealTime SARS-CoV-2. Abbott Laboratories.

Alisson, Elton. Agências Fapesp. **Pesquisadores da USP desenvolvem teste de diagnóstico de COVID-19 pela saliva.** Disponível em: <<https://agencia.fapesp.br/pesquisadores-da-usp-desenvolvem-teste-de-diagnostico-de-covid-19-pela-saliva/33998/>>. Acesso em: 22 mar. 2021.