

CORRELAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE PCR: RT-PCR e Cross Priming Amplification (PCR-CPA) para detecção da Covid-19 ¹

CORRELATION BETWEEN PCR TECHNIQUES: RT-PCR and Cross Priming Amplification (PCR-CPA for detection covid-19)

**Leonardo Lopes Vale²
Thiago Costa Linhares Silva²
Cândida Maria Soares de Mendonça³**

RESUMO

A covid-19 surpreendeu o mundo por ser uma doença de rápida transmissão e que pode evoluir para quadros clínicos delicados. O avanço da pandemia está intimamente ligado à sua alta transmissibilidade e identificar o paciente infectado nos primeiros dias da infecção parece ser a chave para conter o avanço das novas variantes, nesse sentido, o estudo tem como objetivo correlacionar as técnicas de PCR: RT-PCR e CROSS PRIMING AMPLIFICATION (PCR-CPA) através de uma revisão integrativa e visita técnica em laboratórios. Para isso realizou-se levantamentos bibliográficos, através de fontes secundárias existentes sobre o tema pesquisado e visita técnica em laboratórios distintos afim de relatar os procedimentos de RT-PCR e PCR-CPA. Foi possível verificar que a técnica da Reação Em Cadeia Da Polimerase em Tempo Real, mas conhecida com RT-PCR é a principal técnica para diagnóstico da doença e que aperfeiçoamentos da técnica, como PCR-CPA (Cross Prime Amplification) a torna mais rápida, pois imprime resultados até 20x mais rápidos e mais seguro, tendo em vista que elimina a fase inicial denominada de extração do RNA viral pelos Kits de extração por colunas (Spin-Column) o que diminui o contato do operador com o material a ser analisado.

Palavras-chave: Coronavirus; Diagnóstico; Testes Sorológicos; Microbiologia.

ABSTRACT

Covid-19 surprised the world as it is a rapidly transmitted disease that can evolve into delicate clinical conditions. The advance of the pandemic is closely linked to its high transmissibility and identifying the infected patient in the first days of infection seems to be the key to contain the advance of new variants, in this sense, the study aims to correlate PCR techniques: RT-PCR and CROSS PRIMING AMPLIFICATION (PCR-CPA) through an integrative review and technical visit in laboratories. For this, bibliographic surveys were carried out, through existing secondary sources on the researched topic and a technical visit in different laboratories in order to report the RT-PCR and PCR-CPA procedures. It was possible to verify that the Real Time Polymerase Chain Reaction technique, known as RT-PCR, is the main technique for diagnosing the disease and that technical improvements, such as PCR-CPA (Cross

¹ Artigo apresentado a Universidade Potiguar como parte dos requisitos para obtenção do Título de Bacharel em Farmácia, em 2021.

² Graduando em Farmácia pela Universidade Potiguar - E-mail: leonardodovale7@hotmail.com

² Graduando em Farmácia pela Universidade Potiguar - E-mail: thiago_linhares@yahoo.com

³ Professor-Orientador. Docente na Universidade Potiguar - E-mail: candida.m.mendonca@unp.br

Prime Amplification) make it faster, as it prints results up to 20x faster and safer, as it eliminates the initial phase called viral RNA extraction by column extraction kits (Spin-Column) which reduces operator contact with the material to be analyzed.

Keywords: Coronavirus; Diagnosis; Serological Tests; Microbiology.

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, os coronavírus (CoVs) foram associados a significativos surtos de doenças no Leste Asiático e no Oriente Médio, em 2002 e 2012 respectivamente surgiram a SARS (Síndrome Respiratória Aguda Grave) e MERS (Síndrome Respiratória do Oriente Médio).

Em 2019 surge uma nova síndrome respiratória aguda grave, responsável pela doença coronavírus 2019 (COVID-19), onde a organização mundial da saúde (OMS), foi alertada sobre vários casos de pneumonia na cidade de Wuhan, província de Hubei, na República Popular da China, a princípio o surto foi tratado como pneumonia, dias depois as autoridades chinesas confirmaram que haviam identificado um novo tipo de coronavírus.

No Brasil o primeiro caso da doença foi oficialmente declarado no dia 26 de fevereiro de 2020, ocasião em que um indivíduo residente da cidade de São Paulo retornando da Itália testou positivo para COVID-19, desde então houve uma grande preocupação diante de uma doença que se espalhava rapidamente em várias regiões do mundo, com diferentes impactos.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 18 de março de 2020, os casos confirmados da Covid-19 já haviam ultrapassado 214 mil em todo o mundo, não existiam planos estratégicos prontos para serem aplicados a tal pandemia, pois tudo era considerado novo, como ainda não existiam vacinas e protocolos de diagnósticos bem estabelecidos, foram adotadas medidas restritivas de fluxo de pessoas, bem como a utilização obrigatória de máscaras faciais e lockdown.

A primeira quinzena de março de 2020 foi marcado pela chegada dos primeiros testes de imunocromatografia oriundos da China, que juntamente com a investigação clínica, epidemiológica e exames de imagem se chegava a um diagnóstico, tais testes são ensaios imunológicos realizados em amostras de sangue, que pesquisam a presença de anticorpos produzidos contra o vírus, onde os anticorpos iniciam sua produção a partir do 7º dia de doença e tornam-se detectáveis na maioria dos

indivíduos, a partir do 21º dia de doença. Portanto, é indicado para diagnosticar doença prévia ou saber se houve contato prévio com o vírus.

A segunda linha de testes que entram em ação são os moleculares, velhos conhecidos da biologia molecular, mas foi na pandemia de covid – 19 que se tornaram padrão ouro na detecção do sar-cov2 no individuo possivelmente infectado, eles surgiram mediante limitações dos testes anteriores, relacionado ao período de incubação, e por serem mais precisamente a reação de polimerização em cadeia (PCR). A opção por teste molecular se justifica porque é um método capaz de identificar a presença do RNA viral nas amostras biológicas, tendo alta sensibilidade e especificidade.

Os exames tradicionais de polimerase reversa em cadeia são chamados de RT-PCR ou qPCR, sendo que atualmente a técnica de PCR Cross Priming Amplification (PCR-CPA) é considerada a mais moderna e avançada na linha dos testes moleculares por se tratar de uma técnica que dispensa a fase de extração de DNA e RNA.

No momento, o teste considerado padrão-ouro para o diagnóstico final da covid-19 é a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) que no modo tradicional, com a necessidade da desnaturação do DNA ou RNA (Fase pré-analítica) pode demorar até 24 horas para processar um exame.

Sendo a técnica de RT-PCR a mais difundida e utilizada na atualidade, o presente estudo tem como objetivo correlacionar as técnicas de PCR: RT-PCR e Cross Priming Amplification (PCR-CPA) através de revisão integrativa de literatura realizada a partir de fontes secundárias, por meio de levantamento bibliográfico, existentes sobre a temática em questão e visita técnica realizada em laboratório de biologia molecular afim de aprofundarmos o assunto em questão visto que trata-se de uma técnica inovadora, pouco encontrada em bases de dados.

Para o levantamento dos artigos na literatura, foram realizadas buscas nas seguintes bases de dados: Literatura LatinoAmericana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), Medical Literature Analysis and Retrieval Sistem on-line (Medline), Science Direct, Portal de Periódicos CAPES/MEC e SciELO (Scientific Electronic Library Online), Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), utilizando os descritores Covid-19 no mundo; Covid-19 no Brasil; Pandemia; SARS-CoV-2; Testes Covid-19; PCR; RT-PCR e PCR-CPA.

Foram utilizados como critérios de exclusão: Artigos que não abordassem a temática em questão; Artigos publicados há mais de cinco anos e artigos incompletos. Para inclusão foram selecionados: Artigos em português e inglês que atendessem a temática em questão e artigos dos últimos cinco anos.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Covid-19

Até o presente momento, mais de 580 mil brasileiros já perderam a vida para a covid-19 (GUERREIRO & ALMEIDA, 2021).

O Sars-cov-2 é um vírus da família Coronaviridae que apresenta RNA de fita simples positiva, envolto por uma capsula lipoproteica, contendo nesta estrutura uma proteína Spike ou proteína S. O vírus apresenta semelhanças com as infecções respiratórias causadas por SARS por volta de 2002 e com o MERS-CoV em 2012, fato que leva a crer que o Sars-cov2 possa ter características parecidas de transmissibilidade e origem evolutiva com estes vírus (NOGUEIRA, 2020).

Segundo Nogueira (2020) os estudos realizados comparando o genoma do Sars-cov2 com genoma de coronavírus de morcegos da espécie *Rhinolophus affinis* demonstraram que 96% deste vírus apresentam proximidade, uma evidência da seleção natural que este vírus possa ter passado é que, este apresenta semelhanças com coronavírus de pangolins *Manis javanica*.

A infecção por coronavírus em humanos é comumente associada a sintomas de doenças respiratórias, causando resfriado, febre alta, inflamação grave, tosse e disfunção pulmonar, que pode levar à óbito, sendo o modo de transmissão principal de pessoa para pessoa via contato direto, gotículas e aerossóis. Estudos recentes demonstraram que o vírus pode permanecer ativo por horas em aerossóis e até dias em superfícies.

Como uma doença infecciosa respiratória aguda emergente, a Covid-19 se espalha principalmente pelo trato respiratório, por gotículas, secreções respiratórias e contato direto. Entretanto, há relatos de que o Sars-CoV-2 tenha sido isolado de swabs fecais e de sangue, indicando a possibilidade de transmissão por múltiplas rotas (SENHORAS, 2020).

A tabela abaixo mostra os sintomas mais comuns encontrados em uma UTI de um hospital público localizado no oeste do Paraná, Brasil.

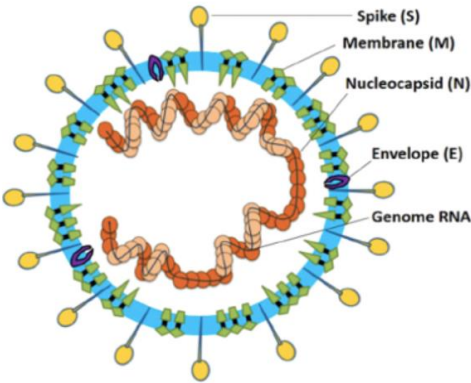
Figura 1 - Sintomas em pacientes com covid em hospital paranaense.

Sinais/Sintomas	
Febre (acima de 38,2 °C)	Dispneia referida
Tosse seca	Dispneia importante/uso de oxigênio
Tosse produtiva	Dispneia importante/Intubação Orotraqueal
Mialgia	Síndrome do olho vermelho
Adinamia	Hisposmia/Anosmia
Dor de garganta	Cefaleia
Diarreia	Déficit Neurológico
Dor abdominal	Erupção cutânea
Precordialgia	

Fonte: (GROTO, et al. 2021)

Segundo Sousa (2020) O SARS-CoV-2 apresenta lipídeos e glicoproteínas S no seu invólucro viral. A glicoproteína S é fundamental para a sua infectividade e virulência, além de direcionar onde e como o vírus entrará e ficará nas células humanas. Também é responsável pela ligação do vírus ao seu receptor celular e causa a fusão do envelope viral com a membrana celular, imprescindível para a penetração viral na célula hospedeira. Como mostra figura a seguir:

Figura 1 - Estrutura Viral do Covid-19.



Fonte: Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (2020)

O receptor da glicoproteína S é a enzima ECA II (enzima conversora de angiotensina II), que é encontrada com maior expressividade no pulmão, por isso um dos principais sintomas é respiratório (SOUSA, et al. 2020).

2.1.1 Glicoproteína S

A proteína S do coronavírus é uma proteína transmembrana viral de classe I grande e multifuncional. O tamanho desta proteína abundante varia de 1.160 aminoácidos (IBV, infeccioso vírus da bronquite, em aves) a 1.400 aminoácidos (FCoV, coronavírus felino). Sua forma é de um trímero na superfície do vírus, dando ao vírus uma coroa ou aparência de coroa. Funcionalmente, é necessário para a entrada das partículas infecciosas do vírus na célula por meio da interação com vários receptores celulares hospedeiros (PALMEIRA, 2021).

2.1.2 Proteína M

A proteína M é a proteína viral mais abundante presente na partícula do vírus, dando forma definida ao envelope viral, ligando-se ao nucleocapsídeo e atua como um organizador central da montagem do coronavírus. As proteínas do coronavírus M são altamente diversas no conteúdo de aminoácidos, mas mantêm a similaridade estrutural geral dentro de diferentes gêneros. A proteína M tem três domínios de transmembrana, flanqueados por um terminal amino curto fora do vírus e um terminal carboxi longo no interior do vírus. No geral, o arcabouço viral é mantido pela interação M-M, onde a proteína M do SARS-CoV-2 não tem uma substituição de aminoácido em comparação com a do SARS-CoV-3 (UZUNIAN, 2020).

2.1.3 Proteína E

A proteína E do coronavírus é a mais enigmática e menor das principais estruturas proteicas, desempenha um papel multifuncional na patogênese, montagem e liberação do vírus. É um pequeno polipeptídeo de membrana integral que atua como uma viroporina (UZUNIAN, 2020).

A inativação ou ausência desta proteína está relacionada à virulência alterada de coronavírus devido a alterações na morfologia e tropismo. Portanto, a proteína E consiste em três domínios, um terminal amino-hidrofílico curto, um domínio transmembranar hidrofóbico grande e um domínio C-terminal eficiente e revela uma constituição de aminoácido semelhante sem qualquer substituição.

2.1.4 Proteína N

Segundo Marrazes (2021) a proteína N do coronavírus é polivalente, dentre várias funções desempenha um papel na formação do complexo com o genoma viral, facilitando a interação da proteína M necessária durante a montagem do vírus e aumentando sua eficiência na transcrição do vírus.

A proteína N é composta por três domínios distintos e altamente conservados, um NTD, um Domínio de ligação de RNA ou uma região de ligação (LKR) e um CTD.

O NTD liga-se ao fim do genoma viral, provavelmente por meio de interações eletrostáticas, e é altamente divergente tanto em comprimento quanto em sequência.

2.2 Diagnóstico

Segundo Vieira et al (2020) uma pessoa infectada elimina gotículas com vírus do SARS-CoV-2 sendo inaladas por outras pessoas, onde o vírus encontra a mucosa nasal com células recobertas com receptores ACE2, ligando-se para penetrar e sequestrar o maquinário celular, afim de produzir outros vírus e infectar novas células.

Enquanto ocorre a multiplicação viral, o infectado elimina vírus em grande quantidade, especialmente na primeira semana, período que pode ser assintomático ou paucissintomático. Caso o sistema imune não seja capaz de interromper a infecção, o vírus progride pelo trato respiratório até os alvéolos pulmonares, ricos em receptores ACE2.

Nos alvéolos, ocorre a migração de leucócitos pela ação das citocinas, resultando em disrupção das trocas gasosas, com pneumonia, caracterizada por tosse produtiva, febre e dispneia.

Segundo a Sociedade Brasileira de Reumatologia a doença vem sendo detectada através de dois tipos de exames principais: Exame de detecção do vírus

por PCR (Reação em cadeia da Polimerase) e os testes sorológicos (anticorpos presente no sangue).

Segundo Oliveira (2016) o PCR ou qPCR é um método que surge da biologia molecular e consiste em amplificar e identificar o material genético do vírus. Para detectar a doença, é utilizada uma amostra de secreção nasal, de orofaringe (garganta) ou escarro, onde tal amostra pode positivar já nos primeiros dias após o início dos sintomas, mas tende a ser negativo com o passar dos dias da infecção (mais que sete dias).

Essa metodologia tem como objetivo final a amplificação exponencial de material genético coletado e processado, indicando a presença ou ausência de RNA do vírus que está sendo investigado. Se for positivo, é confirmada a suspeita de coronavírus, visto que esse é o exame padrão ouro para detecção da mesma.

Já o mecanismo de detecção por testes sorológicos dosa no sangue os anticorpos, substâncias produzidas pelo sistema imunitário para neutralizar o vírus.

Na COVID-19, os anticorpos aparecem por volta de sete dias após início dos sintomas, os anticorpos da classe IgM aparecem primeiro que os da classe IgG, que surgem após cerca de duas semanas do contágio (DIAS et al. 2020).

Segundo a Fundação Oswaldo Cruz (2020) os exames sorológicos mais comuns são denominados IgG (imunoglobulina G) e IgM (imunoglobulina M) onde o IgM positivo significa que a pessoa possui anticorpos do tipo imunoglobulina M, e daí se deduz que ela já foi exposta e está na fase ativa da infecção, havendo a possibilidade de o microrganismo estar circulando no paciente naquele momento, já o resultado positivo para IgG pode indicar que a pessoa está na fase crônica e/ou convalescente ou já teve contato com o vírus em algum momento da vida.

2.3 Testes moleculares

2.3.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Em 1983 Kary Mullis, funcionário da Cetus Corporation, e também vencedor do Prêmio Nobel de Química em 1993 em associação com seu colega Michael Smith, criou uma maneira fácil, barata e confiável de replicar repetidamente um segmento específico de DNA, um conceito aplicável a vários campos da biologia moderna e das ciências relacionadas.

A criação da PCR repercutiu positivamente, que o médico Michael Crichton, escritor de “Parque dos Dinossauros”, afirmou que teve a ideia de escrever este roteiro ao ler a descrição da técnica, fato que reforça a ideia da versatilidade do processo. Ainda sobre a repercussão da técnica, hoje existem grandes empresas e grupos de pesquisa tentando descobrir alternativas á PCR, sem grande expressão devido ao sucesso da criação do químico norte-americano Kary Mullis.

O PCR é provavelmente a técnica mais utilizada na biologia molecular, sendo utilizada na pesquisa biomédica, na forense criminal e na arqueologia molecular, onde vem destacando-se como alto padrão de detecção de patógenos em muitas doenças.

Multiplicar um trecho específico do DNA (gene ou parte dele, regiões super variáveis, Junk DNA, etc.) utilizando desoxinucleotídeos como monômeros até um ponto em que sua concentração em dada solução seja tão alta que possa ser facilmente detectável por métodos simples e clássicos de separação e identificação de substâncias. Portanto, Kary Mullis na verdade propôs uma técnica que consegue resolver um grande problema da análise de ácidos nucleicos: sua baixa quantidade na maioria dos tecidos vivos. Essa reação por si só gera apenas cópias de DNA existentes na amostra estudada, não apresenta resultado algum, são necessárias outras técnicas para amplificar e fazer a leitura dessas cópias de DNA que foram criadas *in vitro*. Uma reação completa de PCR consiste basicamente em extração de DNA, PCR e Eletroforese.

2.3.2 Fases da Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

De acordo com Fraga (2013) a amplificação do DNA na técnica de PCR envolve três etapas, cada uma repetida muitas vezes.

Desnaturação: É o primeiro evento regular dos ciclos e consiste em aquecer a câmara de reação a 94-98 °C por 20 a 30 segundos, fazendo com que a fusão do DNA, ou a desnaturação, do modelo de DNA de cadeia dupla rompa as ligações de hidrogênio entre bases complementares, produzindo duas moléculas de DNA de cadeia simples. Esse processo geralmente acontece no termociclador.

Anelamento: Para delimitar a região de interesse, são utilizados iniciadores específicos, chamados também de primers, a uma temperatura em torno de 40 °C, para que se liguem a fita previamente aberta e haja amplificação apenas da região delimitada pelos primers. Os Primes desenhados de acordo com a necessidade de

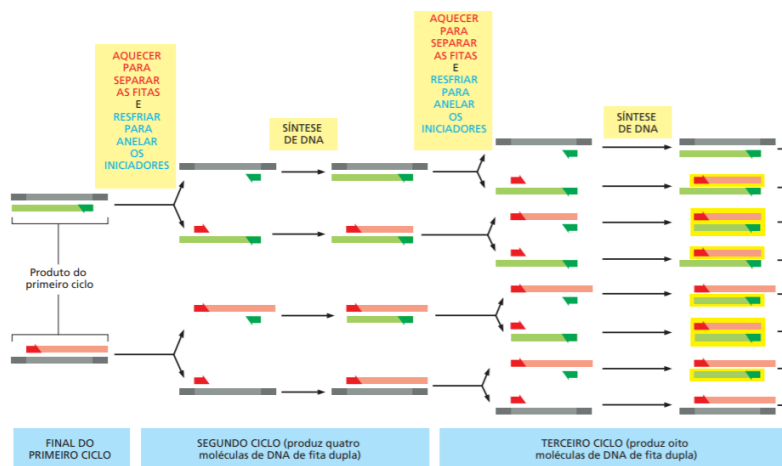
cada tipo de análise, eles funcionam como uma “tesoura” que “cortam” as partes específicas que a enzima vai amplificar.

Extensão/alongamento: A temperatura neste passo depende da enzima DNA polimerase utilizada, a temperatura de atividade ideal para a polimerase de DNA termoestável da polimerase Taq (*Thermus aquaticus*) é de aproximadamente 75-80 °C, embora uma temperatura de 72 °C seja comumente usada com esta enzima.

Neste passo, a DNA polimerase sintetiza uma nova cadeia de DNA complementar à cadeia de matriz de DNA por adição de dNTPs livres a partir da mistura de reação que são complementares ao modelo na direção 5' a 3', condensando o grupo 5'-fosfato dos dNTPs com o grupo 3'-hidroxi no final da cadeia de DNA nascente (alongada). O tempo preciso necessário para o alongamento depende tanto da polimerase de DNA utilizada quanto do comprimento da região alvo de DNA para amplificar.

Como regra geral, na sua temperatura ideal, a maioria das polimerases de DNA polimerizam mil bases por minuto, em condições ideais (isto é, se não houver limitações devido a substratos ou reagentes limitantes), em cada etapa de extensão/alongamento, o número de sequências alvo de DNA é duplicado, com cada ciclo sucessivo, os fios originais do modelo com todas as vertentes recém-geradas tornam-se fios de modelo para a próxima rodada de alongamento, levando à amplificação exponencial (geométrica) da região específica do alvo de DNA.

Figura 2 - ciclos de separação das fitas, hibridização e síntese para amplificar DNA.



Fonte: CARVALHO & SILVA, 2010).

A quantidade de DNA final segue uma função exponencial, onde:

$$N = N_0 \cdot 2^n$$

N = Número final de cadeias de DNA
N₀ = Número inicial de DNA molde (*template*)
n = Número de repetições do ciclo

Portanto, a concentração final do DNA molde na solução é muito maior (da ordem de 23⁵) do que a inicial, possibilitando a sua identificação.

2.3.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)

Os vírus de RNA (retrovírus) dos quais o SARS-COV2 faz parte, tem como material genético RNA ao invés de DNA. Logo o produto da polimerase retroviral não será uma molécula de DNA, será o um molde para construção de uma molécula de DNA.

Os relatos a seguir foram realizados através de visita técnica ocorrida no dia 10 de novembro de 2021 na capital do estado do Rio Grande do Norte em uma unidade médica e laboratorial do DNA CENTER, no setor de biologia molecular. A filial fica localizada na rua Major Laurentino n° 1220, no Bairro Tirol, a responsável pelo procedimento observado e descrito é a Dr^a em imunologia celular Andrea Fernandes, funcionária do laboratório

A realização da reação consiste na extração do material contendo o vírus, que normalmente é utilizado o swab nasofaríngeo. Após a coleta, o swab é imediatamente colocado em um tubo estéril contendo um meio de transporte viral.

Para detectar o vírus por PCR, as moléculas de RNA devem ser convertidas em sequências de DNA complementar através da transcriptase reversa. Desta forma, o DNA molde recém formado pode ser amplificado. Essa técnica é conhecida como reação da polimerase em cadeia em tempo real RT-PCT.

Essa técnica passa por uma fase preparatória, que acontece logo após a coleta que é a extração do material genético do vírus SARS-CoV-2, onde é colocado dentro de um Kit de purificação de RNA, após a amostra ser alocada em um tubo de micro centrifuga, adiciona-se uma solução tampão de lise, tal tampão é altamente desnaturante e geralmente constituído de fenol e isotiocianato de guanidina.

Uma vez que a amostra coletada passa pela etapa da lise, um procedimento de purificação é realizado utilizando os Kits de Coluna Tipo Spin.

Este procedimento consiste em uma extração em fase sólida, na qual a fase estacionária é composta por uma matriz de sílica. Sob condições ideais de sal e pH, as moléculas de RNA ligam-se à membrana de sílica em gel ao passo que as proteínas e outros contaminantes não são retidos. Embora o aparelho que vai fazer a amplificação do material genético comporte 96 amostras por vez, a extração por colunas subdivide esse trabalho em porções menores (16 amostras) que são mais fáceis de alocar na micro centrifuga.

Figura 5 - kit's de extração de DNA/RNA e capela onde é realizada a extração e purificação do DNA/RNA.



Fonte: Medical Expo.

Após centrifugação, a coluna do tipo spin é colocada em um tubo coletor limpo e o filtrado é descartado, então o tampão de lavagem é adicionado deixando apenas o RNA ligado a sílica. Uma vez que a amostra foi lavada, a coluna é alocada em um outro tubo de centrifuga e um tampão de eluição é adicionado.

Quando centrifugado novamente, o tampão de eluição retira o RNA viral da coluna tipo spin e está finalizado a etapa de extração do RNA viral e o procedimento segue o esquema de uma reação de PCR.

Essa etapa pode levar até 3 horas para isolar o RNA viral que seguirá para próxima etapa.

A próxima etapa é a preparação das misturas reacionais para amplificação, nesta etapa, uma solução Master Mix é utilizada e consiste em uma solução concentrada pré-misturada, contendo: tampão, enzima transcriptase reversa,

nucleotídeos, iniciador reverso (por se tratar de um retrovírus, sondas, DNA polimerase e por fim um molde de RNA).

Na sequência a mistura é alocada em uma placa de PCR que geralmente contem 96 poços, o que permite que muitas amostras sejam analisadas ao mesmo tempo como mostra figura a seguir:

Figura 6 - Placa de PCR



Fonte: equipal.com.br

Em seguida a placa é selada e colocada no equipamento de PCR, que consiste basicamente em um termociclador acoplado a um leitor de eletroforese.

Nesse equipamento ocorre diversos ciclos de temperatura que farão com que todas as reações necessárias ocorram e os dados referentes à amplificação genômica sejam encaminhados em tempo real para o aparelho que fará a leitura dos dados.

O Equipamento abaixo é o QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System, 96-well, laptop, muito usado em laboratórios de biologia molecular.

O mesmo está alocado em uma cede do DNA Center e é utilizado para rodar os testes de RT-PCR. Uma das grandes vantagens dessa técnica é que ele consegue rodar 96 amostras simultaneamente e podem ser necessários mais 2 horas nessa etapa do exame.

Figura 7 - QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System, 96-well, laptop.



Fonte: Laboratório CACIM.

2.3.5 PCR-CPA

O aprimoramento dessa técnica resulta no PCR Cross Priming Amplification (PCR – CPA) onde o CPA é uma classe de reações de amplificação isotérmica que é realizada por DNA polimerase de deslocamento de fita e não requer uma etapa inicial de desnaturação ou a adição de uma enzima de corte.

O Centro de Análises clínicas de Mossoró/CACIM, localizado na rua pedro velho, nº 654, Centro, é o unico da cidade que disponibiliza a técnica de PCR-CPA e o responsável por conduzir a testagem é o Farmacêutico/bioquímico Dr. Juaréz De Freitas Vale.

Como no procedimento de PCR convecional, o teste se inicia com a coleta de material viral do paciente via swab nasofaríngeo e a amostra é imediatamente colocada em um tubo de coleta contendo material desnaturante e estabilizante, em seguida é pipetada 500 µL de amostra e misturada com com 500 µL do extrator de RNA. A figura abaixo mostra o extrator da empresa USTAR BIOTECNOLOGIES usado para Covid-19.

Figura 8 - Solução extratora de RNA.



Logo em seguida 1ml dessa mistura é colocado no cartucho EasyNat, onde o mesmo é inserido na máquina Ustar modelo UC0108 e em 49 minutos as curvas de amplificação estão prontas e o resultado disponível.

Figura 9 - Cartucho EasyNat e máquina Ustar modelo UC0108



3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através do referido estudo compreendemos que a técnica tradicional de PCR, a RT-PCR é a mais difundida no Brasil e sua capacidade de operar com grandes quantidades de amostras é grande, porém a presença da fase pré-analítica de desnaturação e extração do RNA torna a técnica ainda relativamente demorada.

Atualmente a técnica de PCR Cross Priming Amplification (PCR-CPA) é considerada a mais moderna e avançada na linha dos testes moleculares, por se tratar de uma técnica que dispensa a fase de extração de DNA e RNA.

A ausência dessa etapa inicial de desnaturação é capaz de reduzir o tempo de realização de um exame em até 10 vezes, ou seja, o exame pode demorar menos de 1 hora para estar pronto. Além de reduzir drasticamente o contato do operador com o material de análise, fazendo com que o índice de contaminação relacionado ao manuseio do equipamento seja inferior comparado a técnica tradicional de PCR.

REFERÊNCIAS

BASTOS, Thayná Brenda Benicio Ferreira et al. **O impacto de uma era pandêmica e isolamento social na saúde mental: uma revisão integrativa.** 2021.

CECCATTO, Vânia Marilande. **Biologia Molecular.** 2015.

DIAS, VM de CH et al. **Testes sorológicos para COVID-19: Interpretação e aplicações práticas.** J Infect Control, p. 1-41, 2020.

FRAGA, Daniela Duarte de. **Deteção de Treponema pallidum em líquido cefalorraquidiano (LCR) pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em pacientes HIV positivos assintomáticos com diagnóstico de sífilis latente.** 2013.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **O que é IgG e IgM.** 2020.

GROTO, Anderson Dillmann et al. **Avaliação de exames laboratoriais e sintomatologia de pacientes com diagnóstico molecular positivo (RT-qPCR) para COVID-19 internados em Unidade de Terapia Intensiva em um município do Oeste do Paraná.** Research, Society and Development, v. 10, n. 9, p. e14110917477-e14110917477, 2021.

GUERREIRO, Clayton; ALMEIDA, Ronaldo de. **Negacionismo religioso: Bolsonaro e lideranças evangélicas na pandemia Covid-19.** Religião & Sociedade, v. 41, p. 49-74, 2021.

MARRAZES, João Miguel Simões. **Farmácia Vitória, Porto e Serviços Farmacêuticos do Centro Hospitalar Baixo Vouga, Aveiro.** 2021.

NOGUEIRA, José Vagner Delmiro. **CONHECENDO A ORIGEM DO SARS-COV-2 (COVID 19).** Revista Saúde e Meio Ambiente, v. 11, n. 2, p. 115-124, 2020.

OLIVEIRA, Anniely Carvalho Rebouças et al. **Investigação molecular de vírus respiratórios em população pediátrica em Goiânia, Goiás.** 2016.

PALMEIRA, Vanila Faber. **Estruturas de Proteínas de Ligação a RNA SARS-CoV-2 e Alvos Terapêuticos.** Instituto brasileiro de informação em ciências e tecnologia. 2021.

SENHORAS, Elói Martins. **COVID-19: Enfoques Preventivos.** EdUFRR, 2020.

SOUSA, Marcos Roberto Nascimento et al. **Patogênese e perspectivas de tratamento da Covid-19: uma revisão.** Research, Society and Development, v. 9, n. 7, p. e05973730-e05973730, 2020.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS. **Estrutura Viral do Covid-19.** 2020.

UZUNIAN, Armênio. **Coronavírus SARS-CoV-2 e Covid-19.** Scielo. 2020.

VIEIRA, Luisane Maria Falci et al. **COVID-19-Diagnóstico Laboratorial para Clínicos.** 2020.