

DESENVOLVIMENTO DE UM ENSAIO MULTIPLEX RT-QPCR ONE STEP QUANTITATIVO PARA DETECÇÃO DE SARS-COV-2 EM MATRIZ BIOLÓGICA

I Simpósio de Microbiologia de Rondônia: Saúde, Ambiente e Inovação., 1ª edição, de 23/03/2021 a 25/03/2021
ISBN dos Anais: 978-65-86861-91-4

QUEIROZ; JACKSON ALVES DA SILVA ¹, RAMPAZZO; RITA DE CÁSSIA PONTELLO ², FILHO; EDIVÁ BASÍLIO DA SILVA ³, OLIVEIRA; GABRIELLA SGORLON ⁴, SOUZA; LUAN FELIPO BOTELHO ⁵, PEREIRA; SORAYA DOS SANTOS ⁶, RODRIGUES; MORENO MAGALHÃES DE SOUZA ⁷, SANTOS; ALCIONE DE OLIVEIRA DOS ⁸, SALCEDO; JUAN MIGUEL VILLALOBOS ⁹, DALL'ACQUA; DEUSILENE SOUZA VIEIRA ¹⁰

RESUMO

Introdução: A COVID-19 é uma doença causada pelo Vírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2), que surgiu na China no final de 2019. A rápida disseminação viral tornou a doença uma emergência de saúde pública de preocupação mundial. O padrão ouro para o diagnóstico de SARS-CoV-2 é a transcrição reversa seguida por reação em cadeia da polimerase em tempo real qualitativa (RT-qPCR). Este método é capaz de detectar a infecção, porém não permite mensurar a carga viral do indivíduo. Neste cenário de emergência global, a escassez de métodos quantitativos disponíveis é um fator limitante no desenvolvimento de estudos que objetivam investigar a relação entre carga viral e certas características da doença, do patógeno e a evolução de ambos. **Objetivo:** Frente a esta necessidade, o objetivo deste estudo foi desenvolver uma reação multiplex RT-qPCR one step quantitativa de alta precisão, baseada na detecção simultânea do alvo viral e de um controle endógeno humano, para monitorar a qualidade da reação. **Métodos:** A padronização do ensaio envolveu a construção de uma curva de quantificação, baseado no método de quantificação absoluta. Para isto, foi confeccionado um plasmídeo recombinante contendo uma região do gene da nucleoproteína viral (gene N), específica para SARS-CoV-2. O plasmídeo foi diluído de forma seriada em uma matriz biológica, constituída de RNA total extraído de soro humano, para construção da curva padrão e determinação dos limites de quantificação e detecção. Para análise da sensibilidade e especificidade diagnóstica, 244 amostras com diagnóstico prévio realizado pelo LACEN/RO, utilizando um ensaio de RT-qPCR qualitativo registrado pela Anvisa, foram selecionadas e submetidas ao método quantitativo em questão. **Resultados:** Os resultados demonstraram que o ensaio desenvolvido possui 99,99% de eficiência, com a possibilidade de quantificar a carga viral em até 2,5 cópias/reação, além de um Limite Óptico de Detecção (LOD_{95%}) de até 1,41 cópias/reação. Os resultados da análise de carga viral das 244 amostras com resultados conhecidos, revelaram concordância de 100% com o ensaio qualitativo RT-qPCR registrado pela Anvisa. Nessa população, foi possível quantificar os pacientes com 2,59 a 3,5x10⁷ cópias por reação e os pacientes previamente detectados como negativos continuaram apresentando o mesmo resultado. **Conclusão:** Este ensaio pode ser uma ferramenta útil

¹ Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ Rondônia, queiroz.jas@gmail.com

² Instituto de Biologia Molecular do Paraná - IBMP, rcprampazzo@gmail.com

³ Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ Rondônia, ediva.basilio@gmail.com

⁴ Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ Rondônia, gabriellasgorlon@gmail.com

⁵ Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Rondônia - LACEN/RO, luan_botelho@hotmail.com

⁶ Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ Rondônia, sorayasant@hotmail.com

⁷ Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ Rondônia, rodriguesmsb@gmail.com

⁸ Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ Rondônia, alcione.m@hotmail.com

⁹ Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ Rondônia, juan.villalobos@fiocruz.br

¹⁰ Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ Rondônia, deusylenebio@hotmail.com

para o manejo adequado dos pacientes, uma vez que o nível e a duração da replicação viral são fatores importantes para avaliar o risco de transmissão e orientar decisões quanto ao isolamento e liberação de pacientes. Desta forma, um diagnóstico preciso é fundamental enquanto a atual pandemia de COVID-19 representar o maior problema de saúde global.

PALAVRAS-CHAVE: Multiplex, RT-qPCR quantitativo, SARS-CoV-2.

¹ Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ Rondônia, queiroz.jas@gmail.com
² Instituto de Biologia Molecular do Paraná - IBMP, rcprampazzo@gmail.com
³ Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ Rondônia, ediva.basilio@gmail.com
⁴ Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ Rondônia, gabriellasgorlon@gmail.com
⁵ Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Rondônia - LACEN/RO, luan_botelho@hotmail.com
⁶ Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ Rondônia, sorayasant@hotmail.com
⁷ Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ Rondônia, rodriguesmsb@gmail.com
⁸ Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ Rondônia, alcione.m@hotmail.com
⁹ Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ Rondônia, juan.villalobos@fiocruz.br
¹⁰ Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ Rondônia, deusylenebio@hotmail.com