



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Revisão sistemática: Comparação de protocolos de RT-PCR no diagnóstico da Covid-19

Autores

Vitória Próspero de Figueiredo

Rodrigo Pires Dallacqua

Resumo

Descoberta no final de 2019, a COVID-19 se espalhou rapidamente pelo mundo. Um dos desafios para impedir a disseminação do vírus é o diagnóstico e isolamento precoce das pessoas infectadas. Neste sentido, a técnica de RT-PCR vem sendo a mais utilizada e é considerada o “padrão ouro” para diagnóstico da doença, mesmo diante de algumas limitações que podem gerar resultados falsos negativos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi analisar os relatos da literatura sobre os protocolos mais adequados de RT-PCR no diagnóstico da COVID-19. Utilizamos a base de dados do PubMed para busca com as palavras-chave “RT-PCR” e “SARS-CoV-2”, sem restrições de idioma. Após a aplicação dos filtros para exclusão, selecionamos 15 trabalhos de revisão bibliográfica que compararam os tipos de amostra, a carga viral em diferentes fases da infecção, qualidade da RT-PCR e os melhores genes marcadores para identificação do vírus SARS-CoV-2. Considerando a facilidade de coleta e fase da infecção pelo vírus, as amostras da nasofaringe e saliva apresentaram uma taxa de detecção elevada e são as matrizes de escolha mais indicadas para o diagnóstico. Alternativamente, amostras de fezes e do trato respiratório inferior podem ser utilizadas e são mais adequadas para detecção após períodos mais avançados da doença. Por fim, os genes apresentaram taxas de detecção semelhantes entre si, mas encontramos a prevalência do gene N (nucleocapsídeo) como o mais usado pelos trabalhos analisados. Este gene deve ser utilizado em conjunto com outros marcadores para resultados mais robustos e com menor índice de falsos negativos. Dessa forma, identificamos que o teste de RT-PCR continua sendo o padrão ouro e que este possui uma boa sensibilidade para detecção do SARS-CoV-2.

Palavras-chave: detecção de SARS-CoV-2, teste molecular, pandemia

[1] ana.andreazzi@ufms.br - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

[2] rodrigo.dallacqua@ufms.br - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Comparison of RT-PCR protocols in the diagnosis of Covid-19: a systematic review

Abstract

Discovered at the end of 2019, the COVID-19 has rapidly irradiated around the world. One of the challenges to preventing virus dispersal is the early diagnosis and isolation of infected people. In this sense, the RT-PCR technique has been the most used and is considered the “gold standard” for diagnosis, despite some limitations that can generate false-negative results. Therefore, the aim of this study was to analyze the literature reports on the most appropriate RT-PCR protocols for the COVID-19 diagnosis. We screened the PubMed database with the keywords “RT-PCR” and “SARS-CoV-2”, without language restrictions. After applying the exclusion filters, we selected 15 literature review papers that compared sample types, viral load at different stages of infection, RT-PCR quality and the best marker genes to identify the SARS-CoV-2 virus. By considering easiness sample collection and the stage of infection, nasopharyngeal and saliva samples showed high detection rates and are the matrices-of-choice for diagnosis. Alternatively, faeces and lower respiratory tract samples can also be used and are better suited for virus detection after advanced infection. Finally, gene marker detection rates were similar, but the gene N is the most indicated in most papers. However, gene N (nucleocapsid) should be used with at least one additional marker for more robust results and a lower rate of false negatives. Thus, it identifies that the RT-PCR test remains the gold standard and that it has good sensitivity for detecting SARS-CoV-2.

Keywords: SARS-CoV-2 detection, molecular test, pandemic

Introdução

Surgimento da Covid-19

Descoberta em dezembro de 2019, na província chinesa de Hubei, a COVID-19 foi relatada como uma série de surtos de pneumonia de origem desconhecida, que foi posteriormente identificada como gerada por um novo tipo de coronavírus, o SARS-CoV-2. Este vírus, pertencente à família Coronaviridae, do mesmo subgênero do vírus causador de SARS (Síndrome Respiratória Aguda Grave) em 2002, e da MERS (Síndrome Respiratória do Oriente-Médio) em 2012 (ZHOU et al., 2020).

Segundo Udagama e colaboradores (2020), o novo patógeno apresenta entre 80% a 96% de semelhança com o MERS-CoV, além de ter sido observado que o novo patógeno também acessa as células através de um receptor de superfície celular, a enzima angiotensina 2 (ACE-2) (ZHOU et al., 2020).

O SARS-CoV-2 provoca uma síndrome respiratória aguda, que varia de quadros com sintomas leves a casos mais graves, e que se disseminou rapidamente pelo mundo desde seu primeiro registro (UDUGAMA et al., 2020). Para que se tenha uma ideia desta velocidade, a doença causou 2.794 infecções atestadas e 80 mortes na China até 26 de janeiro de 2020. No dia 11 de março de 2020, o diretor geral da Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou que a COVID-19 se tratava de uma pandemia (MINISTERIO DA SAUDE, 2020). ZHOU e colaboradores (2020), alertaram que a melhor maneira de barrar o avanço da doença na população seria diminuindo a taxa de transmissão e aumentando os testes de detecção COVID -19. De maneira complementar, GARG e colaboradores (2021) enfatizaram a necessidade de medidas de isolamento das pessoas infectadas.

Caracterização do SARS-CoV-2

O vírus possui seu material genético na forma de RNA de fita simples positivo, que se assemelha com um RNA mensageiro, e que pode ser traduzido pelos componentes da célula hospedeira (UDUGAMA et al., 2020; UZUNIAN, 2020). O genoma do SARS-CoV-2 tem tamanho de aproximadamente de 30.000 bases de nucleotídeos (UDUGAMA et al., 2020; WU et al., 2020), nas quais estão codificadas proteínas estruturais da cápsula viral, sendo estas: a glicoproteína de superfície S (*Spike*), que se liga aos receptores da célula do hospedeiro e medeia o processo de infecção; a proteína de envelope E; a proteína da matriz M; e a proteína do nucleocapsídeo N, responsável por regular a replicação viral (UDUGAMA et al. 2020; WU et al., 2020).

Formas de diagnóstico da doença

O diagnóstico da doença é um dos pontos mais importantes no enfrentamento da pandemia, pois se trata de uma maneira de estabelecer medidas de controle para frear a contaminação. Mediante o aparecimento dos sintomas respiratórios ou a suspeita de contato com pessoas acometidas pela doença, torna-se urgente a necessidade da rápida detecção de SARS-CoV-2 através de exames laboratoriais, em conjunto com a análise das características clínicas apresentadas pelo paciente.

Após o sequenciamento e disponibilização do genoma de SARS-CoV-2, foi possível desenhar *primers* específicos para isolamento e amplificação dos genes virais, utilizados em um protocolo de RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real) (BARRIO et al., 2021).

Além da RT-PCR, existem alguns outros tipos de teste para diagnóstico da COVID -19, como os de detecção de antígenos e os sorológicos (para detecção de anticorpos). Os testes de antígenos detectam uma proteína do vírus das amostras coletadas dos pacientes infectados, esta por sua vez deve ser feita durante os estágios iniciais, pois é onde se tem as maiores cargas virais, seu processo é de fácil execução fornecendo resultados rápidos e são mais baratos. Porém, ela possui sensibilidade e especificidade normalmente inferiores aos testes moleculares. Os sorológicos detectam os anticorpos IgM e IgG, que são produzidos pela resposta imunológica, mas este pode ser identificado quando a doença está progredindo, pois somente após algum tempo de infecção o organismo produz os anticorpos, sendo o mais indicado após o 10º dia do início dos sintomas, mas estes também possuem baixa sensibilidade e especificidade comparado aos testes moleculares (SOUSA et al., 2020). Os diferentes tipos de testes até então desenvolvidos e utilizados apresentam eficiência variável, devido sobretudo a fatores como o tempo de coleta e a limitações da técnica utilizada.

A RT-PCR vem sendo a técnica laboratorial mais utilizada e é considerada como o “padrão ouro” no diagnóstico da Covid-19 (SOUSA et al., 2020), pois apresenta uma rápida detecção e elevada sensibilidade e especificidade (SHEN et al., 2020). Ela se baseia na amplificação do(s) gene(s) alvo e controles escolhidos, por meio de *primers* específicos e enzimas DNA polimerase (SHARMA et al., 2021). Para tanto, o RNA viral, caso presente nas amostras dos pacientes testados, é reversamente transcrito em um DNA complementar de fita simples (cDNA), seguido da amplificação dos marcadores pela ação da Taq DNA polimerase, na presença de nucleotídeos livres, *primers* e sondas TaqMan

específicas, estas últimas marcadas com pigmentos fluorescentes. A reação é montada com o RNA total extraído da amostra e, para o protocolo de amplificação, são empregados kits comerciais que permitem a cópia a partir do molde de RNA para o DNA (GREEN et al., 2020). À medida em que avançam os ciclos de amplificação, é possível verificar o aumento exponencial do número de cópias em um gráfico gerado em tempo real.

A RT-PCR oferece vantagem na etapa da amplificação do material genético e em análises simultâneas realizadas em um ambiente fechado, impedindo possíveis contaminações e reduzindo as taxas de falsos-negativos (SHARMA et al., 2021). Mesmo sendo considerada uma técnica eficaz, a RT-PCR pode fornecer resultados inconclusivos ou mesmo falsos-negativos em algumas situações, dependendo de fatores como a qualidade da amostra, a fase da infecção em que esta foi coletada, o manuseio inadequado do RNA e até mesmo o kit escolhido para extração do ácido nucleico do vírus (SOUSA et al. 2020).

Em vista do acima exposto, o presente trabalho de revisão foi concebido com o intuito de avaliar os relatos em literatura sobre os protocolos de RT-PCR mais eficazes no diagnóstico da Covid-19.

Metodologia

Este trabalho é uma revisão sistemática da literatura, realizada na base de dados PubMed do NCBI (National Center for Biotechnology Information - <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). A estratégia de busca dos trabalhos limitou as palavras-chave “RT-PCR” e “SARS-CoV-2”, no período de 2019 a 2021 e sem restrições quanto ao idioma de publicação. Para reduzir os resultados alcançados e excluir trabalhos não relacionados, foi utilizado o filtro “*diagnosis*”,

do próprio PubMed. Em seguida, selecionamos os trabalhos pesquisados em “*meta-analysis*” e “*systematic review*”. Por fim, foi feita uma rápida leitura dos títulos e resumos de cada um dos trabalhos restantes, dentre os quais 15 estudos foram selecionados e serão discutidos abaixo. As exclusões feitas se direcionam aos trabalhos que não contemplavam a técnica de RT-PCR como foco principal.

Resultados e Discussão

A busca inicial, somente com as palavras-chave e sem aplicação dos filtros de exclusão, retornou um total de 5.006 estudos. Com base na escolha dos filtros e a seleção do tipo de trabalho buscado, foram excluíram 4.908 estudos, reduzindo o número para 98 trabalhos a serem analisados. Após a leitura do título e resumo, foram selecionados 15 trabalhos (Tabela 1), que foram lidos e serão discutidos abaixo.

Tabela 1- Lista dos artigos selecionados para revisão.

Título do Artigo	Revista	Data da publicação
Detection profile of SARS-CoV-2 using RT-PCR in different types of clinical specimens: A systematic review and meta-analysis.	Journal of Medical Virology Wiley	2 de Agosto de 2020
Molecular diagnosis of COVID-19 in different biologic matrix, their diagnostic validity and clinical relevance: A systematic review.	Life Sciences	1 de Outubro de 2020
At what times during infection is SARS-CoV-2 detectable and no longer detectable using RT-PCR-based tests? A systematic review of individual participant data.	BCM Medicine	4 de Novembro de 2020
Nucleic acid amplification tests on respiratory samples for the diagnosis of coronavirus infections: a systematic review and meta-analysis.	Clinical Microbiology and Infection	11 de Novembro de 2020
Population-based prevalence surveys during the Covid-19 pandemic: A systematic review.	Reviews in Medical Virology Wiley	4 de Dezembro de 2020
False-negative results of initial RT-PCR assays for COVID-19: A systematic review.	PLOS ONE	10 de Dezembro de 2020
Recent advances in the diagnosis of COVID-19: a bird's eye view.	Taylor & Francis	1 de Março de 2021
Diagnostic performance of different sampling approaches for SARS-CoV-2 RT-PCR testing: a systematic review and meta-analysis.	Lancet Infect Dis.	12 de Abril de 2021
Role of Chest Computed Tomography versus Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis	Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases	28 de Maio de 2021
Reverse Transcriptase Loop Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) for COVID-19 diagnosis: a systematic review and meta-analysis.	Pathogens and Global Health Taylor & Francis	4 de Junho de 2021
COVID diagnostics by molecular methods: A systematic review of nucleic acid based testing systems.	Indian Journal of Medical Microbiology	10 de Junho de 2021
Screening for SARS-CoV-2 by RT-PCR: Saliva or nasopharyngeal swab? Rapid review and meta-analysis.	PLOS ONE	10 de Junho de 2021
The Spike of SARS-CoV-2: Uniqueness and Applications.	Frontiers in Immunology	8 de julho de 2021

Título do artigo	Revista	Data de publicação
Detection of three pandemic causing coronaviruses from non-respiratory samples: systematic review and meta-analysis.	Scientific Reports Nature	09 de Agosto de 2021
Clinical Symptoms and Types of Samples Are Critical Factors for the Molecular Diagnosis of Symptomatic COVID-19 Patients: A Systematic Literature Review	International Journal of Microbiology	6 de Setembro de 2021

Os trabalhos foram analisados em ordem cronológica, desde agosto de 2020 a setembro de 2021, no intuito de se realizar uma comparação entre os métodos encontrados e discutidos, conforme novas pesquisas foram sendo publicadas. Para melhor compreensão, separamos as sessões em subtópicos, que descrevem os pontos cruciais da técnica de RT-PCR, segundo os protocolos revisados para o diagnóstico de SARS-CoV-2.

Por que utilizar o RT-PCR?

A despeito da existência e desenvolvimento de diversos novos métodos de diagnóstico, todas as revisões analisadas indicaram que o RT-PCR continua sendo o “padrão-ouro” para o diagnóstico da COVID-19, por apresentar alta sensibilidade e especificidade. Seu emprego tem mostrado um resultado mais preciso do que outros tipos de testes moleculares ou de anticorpos. Entretanto, mesmo produzindo uma baixa taxa de falsos negativos, os testes de RT-PCR têm custo elevado e envolvem uma série de passos críticos e relativamente demorados (MAHENDIRATTA et al., 2020; FRANCESCHI et al., 2020).

As evidências levantadas também mostraram que outros fatores podem influenciar seu resultado, como o tipo de amostra e o estágio da infecção durante

a coleta, o que pode acabar produzindo resultados inconclusivos ou falsos-negativos. Desta forma, um diagnóstico impreciso atrapalhará o controle da pandemia (MAHENDIRATTA et al., 2020; HELLOU et al., 2021; RODRIGUEZ et al., 2020; SHARMA et al., 2021; ALI et al., 2021).

Tempo de diagnóstico e precisão

O SARS-CoV-2 é um vírus que apresenta tropismo pelo sistema respiratório, pois este apresenta diversos receptores da enzima conversora de angiotensina II (ECAII) para penetrar nas células hospedeiras, mas ele pode ser encontrado em outras regiões do corpo, por causa da ECA II que se encontra nos demais tecidos como endotélio vascular, sendo considerado um vírus multissistêmico (MISHRA et al., 2021; ZARRILLI et al., 2021). Para se obter um diagnóstico rápido e precoce, em geral, utilizam-se amostras coletadas nas vias aéreas superiores, cuja coleta deve ser realizada até os 10 primeiros dias de aparecimento dos sintomas. Todavia, o prazo ideal para o diagnóstico por RT-PCR é até o 4º dia após o surgimento dos sintomas (MALLETT et al., 2020; SHARMA et al., 2021), período em que a carga viral está mais alta nesta região, aumentando a chance de um resultado positivo verdadeiro, visto que testes feitos durante o período de incubação do vírus as chances de resultados falsos-negativos são alta, cerca de 68%, e após o início dos sintomas esta taxa diminui para 20% (Rocha, 2021). Após esse prazo, o recomendável é que sejam utilizados outros tipos de amostras ou mesmo testes complementares, não moleculares.

Os estudos de Bwire e colaboradores (2020), de Mallett e colaboradores (2020) e de Hellou e colaboradores (2021), apontaram uma maior permanência do vírus no trato respiratório inferior, sendo este eliminado mais tardiamente do que no trato respiratório superior, o que está relacionado diretamente com taxa de detecção do SARS-CoV-2.

Tipos de amostra

A maioria dos trabalhos, doze ao todo, comparou os tipos de amostras coletadas quanto a sua sensibilidade, especificidade e porcentagem de resultados positivos para a detecção do SARS-CoV-2, nos protocolos de amplificação por RT-PCR (Tabela 2). Entre elas estão o *swab* nasofaríngeo, *swab* de orofaringe, fezes, saliva, esfregaços nasais, sangue, expectoração, fluido broncoalveolar, garganta e soro. Além destes, também encontramos relatos do esfregaço de conjuntiva, sêmen, esfregaço vaginal, placenta, líquido amniótico e plasma, porém menos discutidos.

Tabela 2 - Lista dos artigos com suas respectivas amostras abordadas.

Título do Artigo	Tipos de Amostras
Detection profile of SARS-CoV-2 using RT-PCR in different types of clinical specimens: A systematic review and meta-analysis. (BWIRE et al., 2020)	<i>Swab</i> nasofaríngeo, esfregaços nasais, garganta, fezes, sangue, urina, <i>swab</i> orofaríngeo, soro, plasma e expectoração e fluido broncoalveolar
Molecular diagnosis of COVID-19 in different biologic matrix, their diagnostic validity and clinical relevance: A systematic review. (MAHENDIRATTA et al., 2020)	<i>Swab</i> nasofaríngeo, garganta, esfregaços nasais, fezes, sangue, expectoração e linguais.
At what times during infection is SARS-CoV-2 detectable and no longer detectable using RT-PCR-based tests? A systematic review of individual participant data. (MALLETT et al., 2020)	<i>Swab</i> nasofaríngeo, <i>swab</i> orofaríngeo, garganta, esfregaços nasais, fezes, sangue, urina, expectoração, sêmen, esfregaço de conjuntiva e saliva.

Título do Artigo	Tipos de Amostras
Nucleic acid amplification tests on respiratory samples for the diagnosis of coronavirus infections: a systematic review and meta-analysis. (MUSTAFA HELLOU et al., 2020)	<i>Swab</i> nasofaríngeo, trato respiratório inferior e vias aéreas superiores.
Population-based prevalence surveys during the Covid-19 pandemic: A systematic review. (FRANCESCHI et al., 2021)	<i>Swab</i> nasofaríngeo e sangue e soro.
False-negative results of initial RT-PCR assays for COVID-19: A systematic review. (AREVALO-RODRIGUEZ et al., 2020)	<i>Swab</i> nasofaríngeo e <i>swab</i> orofaríngeo
Recent advances in the diagnosis of COVID-19: a bird's eye view. (SHARMA et al., 2021)	<i>Swab</i> nasofaríngeo, <i>swab</i> orofaríngeo, expectoração e fluido broncoalveolar.
Diagnostic performance of different sampling approaches for SARS-CoV-2 RT-PCR testing: a systematic review and meta-analysis. (TSANG et al., 2021)	<i>Swab</i> de nasofaríngeo, esfregaços nasais, garganta e saliva.
Screening for SARS-CoV-2 by RT-PCR: Saliva or nasopharyngeal swab? Rapid review and meta-analysis. (IBRAHIMI et al., 2021)	<i>Swab</i> nasofaríngeo, <i>swab</i> orofaríngeo e saliva.
The Spike of SARS-CoV-2: Uniqueness and Applications. (KUMAVATH et al., 2021)	<i>Swab</i> nasofaríngeo, esfregaços nasais e saliva.
Detection of three pandemic causing coronaviruses from non-respiratory samples: systematic review and meta-analysis. (MISHRA et al., 2021)	<i>Swab</i> nasofaríngeo, fezes, saliva, sangue, urina, soro, plasma, sêmen, esfregaço vaginal, esfregaço de conjuntiva, placenta e líquido amniótico.
Clinical Symptoms and Types of Samples Are Critical Factors for the Molecular Diagnosis of Symptomatic COVID-19 Patients: A Systematic Literature Review. (ZANDI et al., 2021)	<i>Swab</i> nasofaríngeo, <i>swab</i> de orofaríngeo, garganta, fezes, urina, expectoração, lavado broncoalveolar, esfregaço de conjuntiva e saliva.

As amostras coletadas com os *swabs* nasofaríngeos, foram as mais citadas e representam a principal escolha para os testes por profissionais habilitados. No entanto, o trato respiratório superior (TRS) apresenta uma menor taxa de resultados positivos para o vírus (BWIRE et al., 2020; MALLETT et al., 2020; HELLOU et al., 2021). A taxa de positividade nestas amostras foi variada, sendo considerada de alta a moderada, variando de 38,13% a 97%, em alguns

trabalhos (MALLETT et al., 2020; RODRIGUEZ et al., 2020; SHARMA et al., 2021; TSANG et al., 2021; IBRAHIMI et al., 2021). Por outro lado, também foi verificada uma taxa de detecção apenas moderada, em torno de 38,13%, em outros (BWIRE et al., 2020; MAHENDIRATTA et al., 2020; HELLOU et al., 2021; KUMAVATH et al., 2021; MISHRA et al. 2021).

MAHENDIRATTA e colaboradores (2020) e MALLETT e colaboradores (2020) verificaram a permanência por mais tempo, em torno de 28 dias após o começo dos sintomas, do SARS-CoV-2 no trato respiratório inferior e em fezes, apontando o uso de amostras respiratórias e fecais em conjunto para aumentar a precisão do diagnóstico, pois o patógeno pode estar presente em uma amostra fecal e não na respiratória (MISHRA et al., 2021). Portanto, a data de coleta, em função do aparecimento dos sintomas, é fundamental para se definir o tipo de amostra para detecção do RNA viral.

A principal crítica quanto à amostragem para diagnóstico reside no procedimento de coleta. Por exemplo, a obtenção de células da nasofaringe acaba sendo invasiva e pode provocar a emissão de gotículas contaminadas pelo paciente, aumentando o risco de transmissão ao profissional de saúde (IBRAHIMI et al., 2021; TSANG et al., 2021). A análise das amostras oriundas de *swabs* da garganta representam uma alternativa aos *swabs* nasofaríngeos, por não serem tão invasivos ao enfermo e terem efetividade alta a moderada na detecção de SARS-CoV-2 (MAHENDIRATTA et al., 2020; MALLETT et al., 2020; TSANG et al., 2021).

No entanto, as amostras coletadas no trato respiratório inferior (TRI) se mostraram melhores para o diagnóstico do SARS-CoV-2, que é facilmente detectado por sua prevalência nesta região (MALLETT et al., 2020). O fluido

bronco-alveolar e o escarro, por exemplo, apresentaram uma boa taxa de detecção dos vírus, aproximadamente 91% e 70% respectivamente apontando uma grande chance de se identificar o SARS-CoV-2. O problema do primeiro, novamente, reside nos procedimentos de coleta, visto que a broncoscopia pode produzir aerossóis, que podem expor o enfermo e a equipe de saúde. Já o escarro, que é relativamente simples de se coletar, mas cuja coleta depende do tipo de sintoma que é apresentado pelo paciente, sendo utilizado em casos de pessoas com sintomas mais graves (BWIRE et al., 2020; MALLETT et al., 2020; SHARMA et al., 2021).

Segundo Mallet e colaboradores (2020), os pacientes que foram positivos para a Covid-19 por meio da análise de amostras do TRS passaram a ser indetectáveis a partir de 12 dias, já os que foram detectados por meio de TRI passaram a ficar indetectáveis somente depois de 28 dias após o surgimento dos sintomas. Mustafa e colaboradores (2020) observaram uma maior taxa de positivos em amostras de TRI, em comparação aos esfregaços nasofaríngeos (MALLETT et al., 2020; HELLOU et al., 2021).

As amostras fecais, também mostram uma boa capacidade de detecção do SARS-CoV-2, em virtude da sua eliminação tardia em relação ao trato respiratório, bem como nos fluidos corporais. A coleta desta matriz pode ser considerada uma medida alternativa para o diagnóstico e o acompanhamento da evolução da infecção (BWIRE et al., 2020; MAHENDIRATTA et al., 2020; MALLETT et al., 2020; MISHRA et al., 2021; ZANDI et al., 2021).

Além destas, as amostras de sangue, soro, plasma, sêmen, placenta, urina e conjuntivas podem ser utilizadas no monitoramento da infecção no

paciente, apesar de terem apresentado baixa capacidade de detecção, sobretudo dependendo da etapa da doença (MISHRA et al., 2021).

As revisões mais recentes apontaram a saliva e amostras combinadas, uso em conjunto das amostras de saliva com amostras de outras regiões, entre às que possuem resultados de boa confiabilidade, com alta taxa de positivos (TSANG et al., 2021; IBRAHIMI et al., 2021; KUMAVATH et al., 2021; MISHRA et al., 2021; ZANDI et al., 2021). Elas apresentaram números semelhantes de positividade aos dos *swabs* nasofaríngeos, oferecendo uma alternativa clínica que não cause estresse no paciente, sem grandes exigências no treinamento de profissionais e fáceis de coletar.

Interessante observar que a maioria dos estudos analisados, por se tratar de revisões, não abordaram a questão da eficiência dos diferentes kits de extração, praticamente ignorando a etapa crucial de purificação do RNA. O foco destas revisões estava em outros pontos críticos do protocolo do teste (tipo de amostra, genes alvo para amplificação e comparações entre a RT-PCR com outros tipos de métodos moleculares) ou mesmo na comparação do RT-PCR com métodos não moleculares.

Somente Das e colaboradores (2021) realizaram uma revisão comparando os protocolos de extração de RNA viral com relação à sua rapidez em produzir resultados robustos nas análises por RT-PCR. Eles analisaram os sistemas CBNAAT, sistemas que integram a extração, amplificação e a detecção de ácido nucleico, são testes de amplificação de ácido nucleico baseado em cartucho, sem a necessidade da extração do RNA separadamente sistema automatizado. Dentre os doze kits de teste comparados, apenas o Cobas SARS-CoV-2 da Roche Molecular apresentou um rendimento alto, o restante

apresentou resultados que variaram de moderados à baixo rendimento. Outra comparação feita por Das e colaboradores (2021) foi entre kits de PCR produzidos na Índia, o *Mylab Discovery Solutions (PathoDectect)* e o *BlackBio Biotech (True-PCR)*, sendo este último citado o mais indicado por levar menos tempo para produzir resultados, pois trata-se de um kit multiplex, ou seja, permite realizar a análise conjunta de mais de um marcador em um só tubo de amostra. Diferente o *Mylad Discovery Solutions*, que processa apenas 30 amostras em uma placa de 96 poços, elevando a carga de trabalho e o seu tempo de processo (DAS et al., 2021).

Genes utilizados na RT-PCR

Quanto aos genes alvos para amplificação utilizados nos diferentes protocolos de RT-PCR, destacam-se os genes virais que codificam proteínas estruturais: E (do envelope), para a glicoproteína S (*Spike*), a proteína N (do nucleocapsídeo). Além desses, também foram avaliados genes como a helicase e uma RdRp (RNA polimerase dependente de RNA), ambas localizadas dentro da ORF1ab, uma região codificadora de poliproteínas.

Tabela 3- Número de acesso das sequências dos genes alvos.

Gene-alvo	Número de acesso no GenBank
Envelope (E)	NC_045512.2
Spike (S)	NC_045512.2
Nucleocapsídeo (N)	NC_045512.2
ORF1ab	NC_045512.2

Segundo Mahendiratta e colaboradores (2020), os estudos analisados demonstraram a proteína E como principal alvo para identificar o vírus, acompanhado da análise conjunta do RdRp para a confirmação do diagnóstico, sendo estes dois genes os mais sensíveis na detecção do vírus em comparação com o uso do gene N de maneira isolada.

De acordo com Hellou e colaboradores (2020), os testes direcionados a mais de um gene são aqueles que possuem a maior taxa de sensibilidade, precisão no diagnóstico, mais precisamente os testes que utilizam os genes N e S.

Sharma e colaboradores (2021) declararam que dentre o método molecular baseado em RT-PCR, a sequência codificadora Hel/RdRp (helicase/RNA polimerase dependente de RNA), que está localizada dentro da ORF1ab, possui maior especificidade e sensibilidade na detecção da COVID-19. Além disso, os autores destacam que devemos utilizar o gene RdRp para confirmação da identidade viral do SARS-CoV-2, após a detecção do gene E no teste, o que foi reforçado por Mahendiratta e colaboradores (2020).

Segundo Subalie & Wiyono (2021), os genes alvos utilizados nos ensaios de RT-PCR foram os genes N, E, S e RdRp mostraram-se bons marcadores, pois apresentaram perfil de amplificação semelhante e com grande sensibilidade na detecção do vírus, tendo sido aprovados e recomendados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e as agências americanas CDC e FDA.

Kumavath e colaboradores (2021) afirmaram que o uso conjunto dos genes RdRp, N, E e S não apresentaram resultados falsos positivos. Ainda, os

autores reforçam que o gene S demonstrou um alvo promissor por conta de seus resultados.

Zandi e colaboradores (2021), analisando trabalhos realizados com mais de 12 mil pacientes com sintomas clínicos da Covid-19, verificou que a taxa de detecção de SARS-CoV-2 por testes moleculares de RT-PCR foi de 100%. Para tanto, é importante destacar o uso de diferentes genes alvo no protocolo de amplificação por RT-PCR, sobretudo os localizados na ORF1b, encontrada em nove estudos, e a ORF4, relatada em apenas um estudo.

De maneira geral, os genes apresentaram taxa de detecção semelhantes entre si, mas foi observado a prevalência do gene N nas revisões, citado em cinco das sete revisões que abordavam sobre o assunto, indicando que este deve ser utilizado, mas em conjunto com outros marcadores para resultados mais concretos e com menor taxa de resultados falsos negativos.

A maior dificuldade de se analisar criticamente estes resultados sobre os marcadores moleculares mais adequados, para aplicação nos testes em larga escala, refere-se justamente à falta de padronização entre os métodos de coleta e preservação de amostras, bem como nas etapas iniciais de processamento. Por exemplo, acreditamos que os protocolos de extração e purificação do RNA, bem como de seu armazenamento, podem apresentar questões limitantes e que não foram discutidas.

Conclusões

Esta revisão sistemática confirmou que a RT-PCR é ainda o método mais adequado e confiável para o diagnóstico laboratorial da COVID-19. As análises comparativas de protocolos testados com diferentes amostras biológicas, dependendo do estado clínico do paciente e fase do processo infeccioso, bem como a utilização conjunta de bons marcadores para detecção do vírus, reforçam que o método é robusto e apresenta alta confiabilidade. A leitura dos 15 estudos selecionados apontou que as amostras coletadas da nasofaringe ainda representam a escolha dos laboratórios, mas desde que coletadas até 10 dias depois dos sintomas começarem. Outro ponto observado é a potencialidade da amostra de saliva, tão sensível quanto a de nasofaringe, podendo ser considerada uma alternativa mais prática e confortável ao paciente e mais segura para o profissional da saúde. As amostras de trato respiratório inferior, amostras combinadas e fezes são consideradas alternativas para ser utilizadas em estágios distintos do processo infeccioso, visando a confirmação do diagnóstico. Quanto aos genes, o mais citado com uma maior sensibilidade foi o gene N, mas os demais genes também possuem uma boa taxa de sensibilidade, sendo indicado o uso de dois genes ou mais na amplificação para uma maior precisão do resultado.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e por ter me dado saúde e força para chegar até aqui superando as dificuldades encontradas nesta caminhada. Agradeço aos meus pais Lélis e Márcio e meu irmão, Daniel, pelo amor, dedicação, apoio e incentivo que proporcionaram durante minha graduação. Agradeço aos meus amigos pela amizade, incentivo e companheirismo. Agradeço ao professor Rodrigo Pires Dallacqua, pela orientação e disponibilidade de seu tempo escasso para me ajudar na elaboração deste trabalho, e também, a todos os professores que contribuíram com a minha trajetória e pela transmissão de seus conhecimentos. Sou grata à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pela oportunidade de realizar o curso de ciências biológicas durante esses anos. De maneira geral, agradeço a todos que de forma direta e indireta contribuíram na minha trajetória acadêmica.

Literatura citada

ALI, D. M., ZAKE, L. G., & EL KADY, N. K. Role of Chest Computed Tomography versus Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 8798575. 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/8798575>

AREVALO, R. I., BUITRAGO, G. D., SIMANCAS, R. D., ZAMBRANO, A. P., DEL, C. R., CIAPPONI, A., SUED, O., MARTINEZ, G. L., RUTJES, A. W., LOW, N., BOSSUYT, P. M., PEREZ, M. J. A., & ZAMORA, J. False-negative results of initial RT-PCR assays for COVID-19: A systematic review. *PloS one*, 15(12), e0242958. 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242958>

BARRIO, P. A., FERNÁNDEZ, R., MARTÍN, P., FERNÁNDEZ, C., FERNÁNDEZ, L., & ALONSO, A. Forensic evaluation of two nucleic acid extraction systems and validation of a RT-PCR protocol for identification of SARS-CoV-2 in post-mortem nasopharyngeal swabs. *Ciência forense internacional*, vol. 323 110775. 2 de abril de 2021, doi: 10.1016 / j.forsciint.2021.110775. BWIRE, G. M., MAJIGO, M. V., NJIRO, B. J., & MAWAZO, A. Detection profile of SARS-CoV-2 using RT-PCR in different types of clinical specimens: A systematic review and meta-analysis. *Journal of medical virology*, 93(2), 719–725. 2020. <https://doi.org/10.1002/jmv.26349>

DAS, P., MONDAL, S., PAL, S., ROY, S., VIDYADHARAN, A., DADWAL, R., BHATTACHARYA, S., MISHRA, D. K., & CHANDY, M. COVID diagnostics by molecular methods: A systematic review of nucleic acid based testing systems. *Indian journal of medical microbiology*, 39(3), 271–278. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijmmb.2021.05.012>

FRANCESCHI, V. B., SANTOS, A. S., GLAESER, A. B., PAIZ, J. C., CALDANA, G. D., MACHADO LESSA, C. L., DE MENEZES MAYER, A., KÜCHLE, J. G., GAZZOLA ZEN, P. R., VIGO, A., WINCK, A. T., ROTTA, L. N., & THOMPSON, C. E. Population-based prevalence surveys during the Covid-1 pandemic: A systematic review. *Reviews in medical virology*, 31(4), e2200. 2020. <https://doi.org/10.1002/rmv.2200>

GARG, A., GHOSHAL, U., PATEL, S. S., SINGH, D. V., ARYA, A. K., VASANTH, S., PANDEY A., & SRIVASTAVA, N. Evaluation of seven comercial RT-PCR kits for COVID-19 testing in pooped clinical specimens. *Journal of medical virology* vol. 93,4 2021: 2281-2286. doi: 10.1002 / jmv.26691

GREEN, K., WINTER, A., DICKINSON, R., GRAZIADIO, S., WOLFF, R., MALLET, S., & ALLEN, A. J. What tests could potentially be used for the screening, disgnosis and monitoring of covid-19 and what are their advantages and disadvantages? *CEBM*. 2020, v.13 2020.

IBRAHIMI, N., DELAUNAY-MOISAN, A., HILL, C., LE TEUFF, G., RUPPRECHT, J. F., THURET, J. Y., CHALTIEL, D., & POTIER, M. C. Screening for SARS-CoV-2 by RT-PCR: Saliva or nasopharyngeal swab? Rapid review and meta-analysis. *PloS one*, 16(6), e0253007. 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253007>

KUMAVATH, R., BARH, D., ANDRADE, B. S., IMCHEN, M., ABURJAILE, F. F., CH, A., RODRIGUES, D., TIWARI, S., ALZHRANI, K. J., GÓES-NETO, A., WEENER, M. E., GHOSH, P., & AZEVEDO, V. The Spike of SARS-CoV-2: Uniqueness and Applications. *Frontiers in immunology*, 12, 663912. 2021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.663912>

MAHENDIRATTA, S., BATRA, G., SARMA, P., KUMAR, H., BANSAL, S., KUMAR, S., PRAKASH, A., SEHGAL, R., & MEDHI, B. Molecular diagnosis of COVID-19 in different biologic matrix, their diagnostic validity and clinical relevance: A systematic review. *Life sciences*, 258, 118207. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118207>

MALLET, S., ALLEN, A. J., GRAZIADIO, S., TAYLOR, S. A., SAKAI, N. S., GREEN, K., SUKLAN, J., HYDE, C., SHINKINS, B., ZHELEV, Z., PETERS, J., TURNER, P. J., ROBERTS, N. W., DI RUFFANO, L. F., WOLFF, R., WHITING, P., WINTER, A., BHATNAGAR, G., NICHOLSON, B. D., & HALLIGAN, S. At what times during infection is SARS-CoV-2 detectable and no longer detectable using RT-PCR-based tests? A systematic review of individual participant data. *BMC medicine*, 18(1), 346. 2020. <https://doi.org/10.1186/s12916-020-01810-8>

MINISTERIO DA SAUDE. Brasil Protocolo de manejo clínico do coronavírus (Covid-19) na Atenção Primária à Saúde. Ministério da Saúde, 2020. Disponível em: <<https://www.unasus.gov.br/noticia/organizacao-mundial-de-saude-declara-pandemia-de-coronavirus>>. Acesso em: 11/05/2021.

MISHRA, C., MEENA, S., MEENA, J.K., TWIWAARI, S. & MATHUR P. Detection of three pandemic causing coronaviruses from non-respiratory samples: systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 11, 16131 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95329-4>

MUSTAFA HELLOU, M., GÓRSKA, A., MAZZAFERRI, F., CREMONINI, E., GENTILOTTI, E., DE NARDO, P., PORAN, I., LEEFLANG, M. M., TACCONELLI, E., & PAUL, M. Nucleic acid amplification tests on respiratory samples for the diagnosis of coronavirus infections: a systematic review and meta-analysis. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 27(3), 341–351. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.11.002>

ROCHA, M. A. Covid-19: Pesquisador da Fiocruz tira dúvidas sobre testes de Covid-19. Fiocruz, Rio de Janeiro, 15 de Janeiro de 2021. Disponível em <<https://portal.fiocruz.br/noticia/covid-19-pesquisador-da-fiocruz-tira-duvidas-sobre-testes-de-covid-19>>. Acesso em: 07/12/2021

SHARMA, B., SHAHANSHAH, M., GUPTA, S., & GUPTA, V. Recent advances in the diagnosis of COVID-19: a bird's eye view. *Expert review of molecular*

diagnostics, 21(5), 475–491. 2021.
<https://doi.org/10.1080/14737159.2021.1874354>

SHEN , M., ZHOU, Y., YE, J., MASKRI, A. A. A. A., KANG, Y., ZENG, S., & CAI, S. Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus. *Journal of pharmaceutical analysis*, v. 10, n. 2, p. 97-101, 2020.

SOUSA , G. C., OLIVEIRA, A. C. P., FONTENELE, D. D., PINHO, S. S., SILVA, K. C., OLIVEIRA, A. P., LOPES, A. L. F., & PACHECO, G. Mapeamento científico dos testes moleculares para o diagnóstico de coronavírus, com ênfase na covid-19: uma análise de literatura. Editora Atena p. 1-388–416. 2020.

SUBALI, A. D., & WIYONO, L. Reverse Transcriptase Loop Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) for COVID-19 diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *Pathogens and global health*, 115(5), 281–291. 2021
<https://doi.org/10.1080/20477724.2021.1933335>

TSANG, N., SO, H. C., NG, K. Y., COWLING, B. J., LEUNG, G. M., & IP, D. Diagnostic performance of different sampling approaches for SARS-CoV-2 RT-PCR testing: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Infectious diseases*, 21(9), 1233–1245. 2021. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00146-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00146-8)

UDUGAMA, B., KADHIRESAN, P., KOZLOWSKI, H. N., MALEKJAHANI, A., OSBORNE, M, LI, V. Y. C., CHEN, H., MUBAREKA, S., GUBBAY, J. B., & CHAN, W. C. W. Diagnosing COVID-19: the disease and tools for detection. *ACS Nano* ; 14 (4): 3822-3835. 2020. doi: 10.1021 / acsnano.0c02624

UZUNIAN A . Coronavírus SARS-CoV-2 e Covid-19. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*0;0(0) 2020.

WU, A., PENG, Y., HUANG, B., DING, X., WANG, X., NIU, P., MENG, J., ZHU, Z., ZHANG, Z., WANG, J., SHENG, J., QUAN, L., XIA, Z., TAN, W., CHENG, G., & JIANG, T. Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. *Cell Host Microbe* . 27 (3): 325-328. 2020. doi: 10.1016 / j.chom.2020.02.001

ZANDI, M., FARAHANI, A., ZAKERI, A., AKHAVAN REZAYAT, S., MOHAMMADI, R., DAS, U., DIMMOCK, J. R., AFZALI, S., NAKHAEI, M. A., DOROUDI, A., ERFANI, Y., & SOLTANI, S. Clinical Symptoms and Types of Samples Are Critical Factors for the Molecular Diagnosis of Symptomatic COVID-19 Patients: A Systematic Literature Review. *International journal of microbiology*, 5528786. 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5528786>

ZARRILLI, G., ANGERILLI, V., BUSINELLO, G., SBARAGLIA, M., TRAVERSO, G., FORTAREZZA, F., RIZZO, S., DE GASPARI, M., BASSO, C., CALABRESE, F., DEI TOS, A. P., & FASSAN, M. The Immunopathologic and Histological Landscape of COVID-19-Mediated Lung Injury. *International journal of molecular sciences* , 22 (2), 974. 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22020974>.

ZHOU , P., YANG , X. L., WANG, X. G., HU, B., ZHANG, L., ZHANG, W., SI, H. R., ZHU, Y., BEI, L., HUANG, C. L., CHEN, H. D., CHEN, J., LUO, Y., GUO, H., JIANG, R. D., LIU, M. Q., CHEN, Y., SHEN, X. R., WANG, XI, 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* 579, 270–273. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>