

DIAGNÓSTICO DE COVID-19

ASSUNÇÃO, Joana⁽¹⁾; CORREIA, Marta⁽¹⁾; FIGUEIREDO, Diogo⁽¹⁾; GUERREIRO, Maria⁽¹⁾; PACHECO, Margarida⁽¹⁾; RIBEIRO, Mónica⁽¹⁾; GOMES, Gabriela⁽²⁾; JUSTINO, MARTA⁽²⁾

⁽¹⁾12ºB (2021/2022), Escola Básica e Secundária Alfredo da Silva, Praça de Bento Jesus Caraça, 2830-322 Barreiro, Portugal
⁽²⁾Escola Superior de Tecnologia do Barreiro, Instituto Politécnico de Setúbal, Rua Américo da Silva Marinho, 2839-001 Lavradio, Portugal



Agradecimento especial a toda a equipa do IPS-Covid-Lab

INTRODUÇÃO

O SARS-CoV-2 (**fig. 1**) é um vírus da família Coronaviridae de β -CoVs associado à infeção Covid-19 [1]. Trata-se de um organismo acelular de pequenas dimensões, sendo um parasita intracelular obrigatório [2]. Apresenta o seu genoma em cadeia simples de RNA desenvolvida no sentido positivo, podendo este atuar como mRNA, sendo diretamente traduzido em proteínas virais pelos ribossomas dos hospedeiros [1]. Tem efeitos prejudiciais à saúde humana, destacando-se uma série de problemas a nível respiratório, intestinal, hepático e ainda neurológico [3].

Dadas as características genómicas do vírus, é necessário incluir a técnica do DNA complementar (cDNA), com recurso à transcriptase reversa, para a síntese de DNA a partir de mRNA [4]. Assim, justifica-se a utilização dessa técnica, em simultâneo com a técnica de amplificação de cDNA (cDNA) em cadeia, com a técnica de PCR [5], para inferir a existência ou ausência de partículas virais numa amostra.

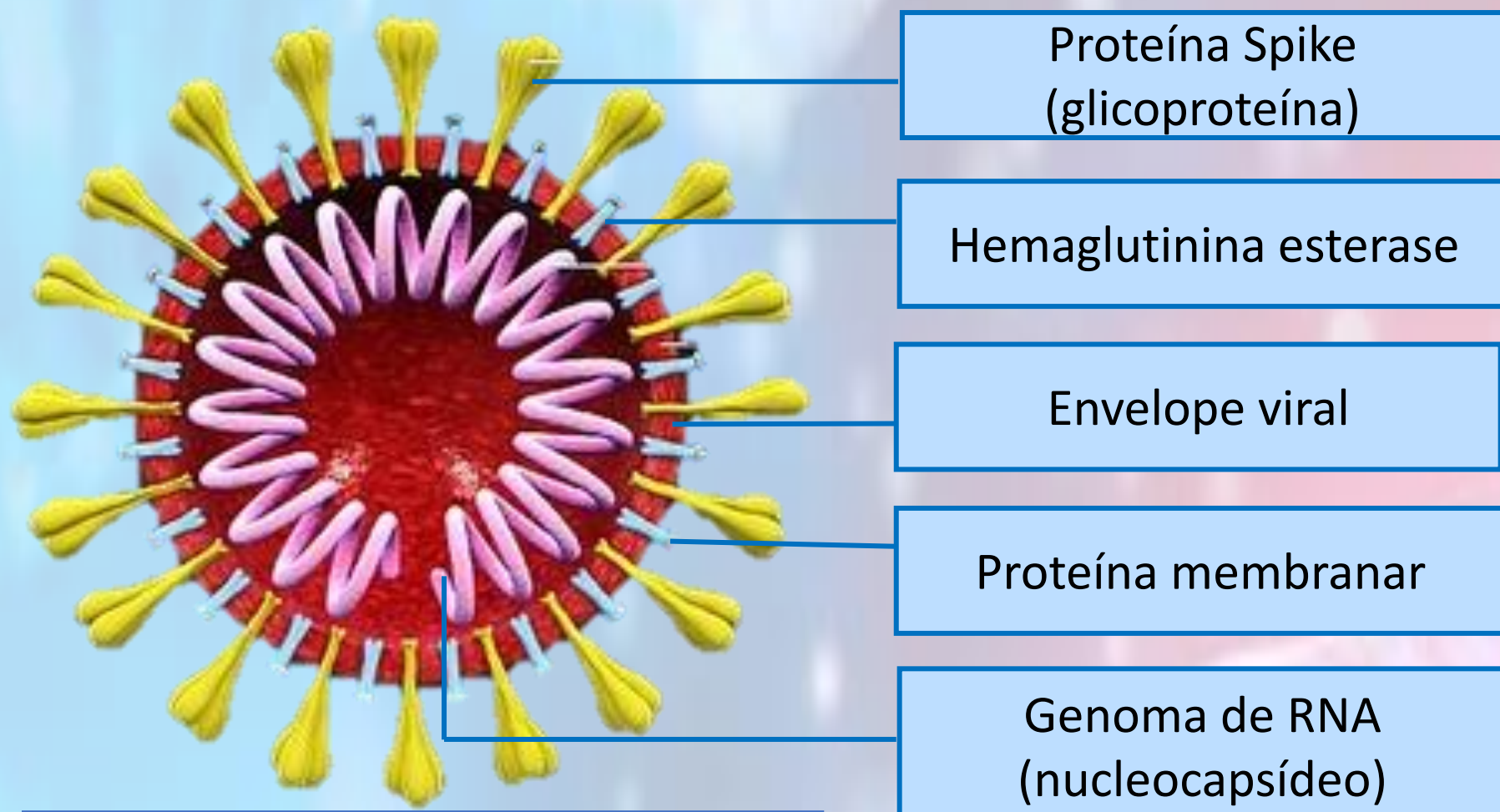


Fig. 1 – Constituição do vírus SARS-CoV-2; Adaptado de [1]

OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo a compreensão e replicação da prática laboratorial realizada para efeitos de diagnóstico de Covid-19 no IPS Covid LAB.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram replicados, em laboratório, métodos tais como: a extração e purificação de RNA de amostras nasofaríngeas de zangaratos; conversão de RNA a cDNA com a transcriptase reversa; amplificação em tempo real do DNA por RT- qPCR (Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction- RT qPCR), com o propósito de amplificar as cadeias de cDNA, possibilitando uma análise qualitativa e quantitativa).

Sala de check-out e RT-qPCR (**fig. 3**)

Câmara de mistura:

- 6- Descongelamento de alíquotas de primers e sondas;
- 7- Aquecimento do DNA de salmão;
- 8- Adição dos reagentes aos tubos(água sem nucleases, one-step RT-qPCR master mix 2X, DNA de salmão e o mix de primers e sondas);
- 9- Preparação do mix reacional e aplicação de spin para misturar;
- 10- Transferência da master mix para a câmara de amostras.

Câmara de amostras:

- 11- Descongelamento dos controlos (positivo, humano e viral);
- 12- Transferência com a pipeta multicanal (**fig. 4**) - das amostras e dos controlos, nos respetivos poços;
- 13- Higienização do espaço e descontaminação do local;
- 14- Colocação da placa no Real Time PCR (termociclador) (**fig. 5**) e iniciação do programa.



Fig. 4 – Pipeta multicanal



Fig. 5 – Real time PCR



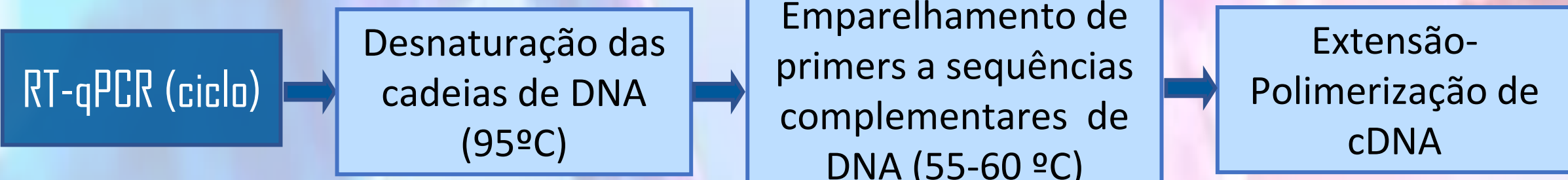
Fig. 3 – Sala de check-out e de RT-qPCR do IPS-Covid-Lab

Sala de check-in, inativação de vírus e extração de RNA (**fig. 2**)

- 1- Colocação do equipamento de proteção individual;
- 2-Desinfecção do equipamento (tubos de meio de transporte inativante) e do espaço de trabalho, com etanol a 99,5%(v/v) e recurso a dietil pirocarbonato e Spray RNase Cleaner (para inativar RNAses);
- 3- Repouso das amostras nasofaríngeas em meio inativante (30 minutos);
- 4- Inativação térmica (utilizando-se termo blocos a -4°C, por 15 minutos)
- 5- Extração e purificação de amostras de RNA recorrendo ao kit NZYViral RNA Extraction, a micropipetas e a uma microcentrifuga.



Fig. 2 – Sala de check-in, inativação de vírus e extração de RNA do IPS-Covid-Lab



RESULTADOS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de existirem várias opções válidas para a organização das salas laboratoriais [6], no IPS Covid-Lab, optou-se pela instalação de uma sala de check-in e outra de check-out. Em termos dos materiais a utilizar no diagnóstico do COVID-19, estes podem variar. No IPS-Covid-Lab, recorre-se ao Kit NZY Viral RNA Extraction, que permite a obtenção de RNA de elevada qualidade, reduzindo o tempo de protocolo total e utilizando tecnologia de membranas de sílica para purificação do RNA [7]. O uso do DNA de salmão é utilizado para conferir maior especificidade às reações de hibridação, pois reduz ligações inespecíficas entre a sonda, os primers e o gene N2 do vírus[8].

Existem duas possibilidades de resultados após a reação de RT-qPCR: positivo (**fig. 6**) e negativo (**fig. 7**). Um resultado é positivo para a COVID-19 quando existe amplificação do gene de controlo, RP (humano) e dos genes virais, N1 e N2, sendo negativo quando não existe amplificação dos genes virais, havendo, ainda assim, amplificação do gene RP (humano). Um teste pode eventualmente ser inconclusivo no caso de ausência de amplificação do gene RP, ou numa situação em que existe amplificação de apenas um gene viral.

Salienta-se que, por motivos éticos, não foram utilizadas amostras reais, pelo que os resultados apresentados correspondem a amostras não manuseadas pelo grupo (**fig. 8**).

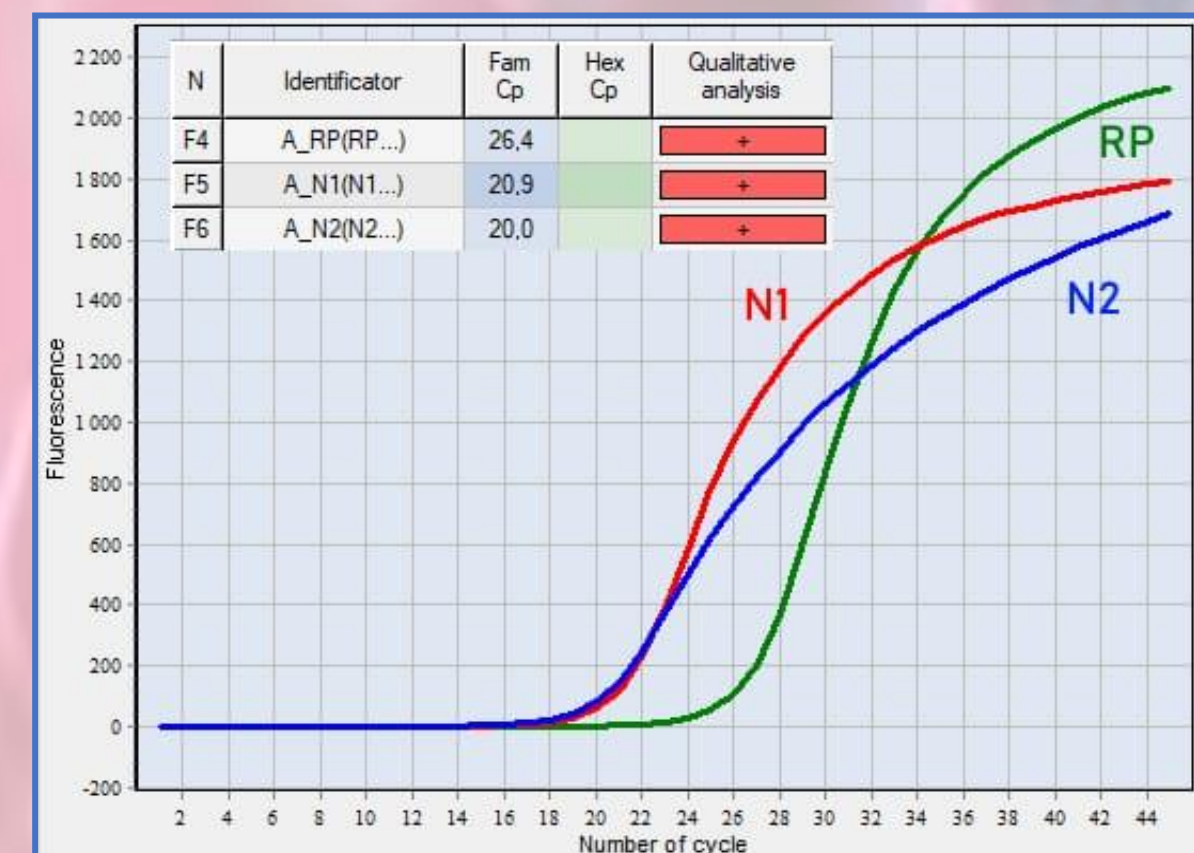


Fig. 6 – Resultado positivo para Covid-19

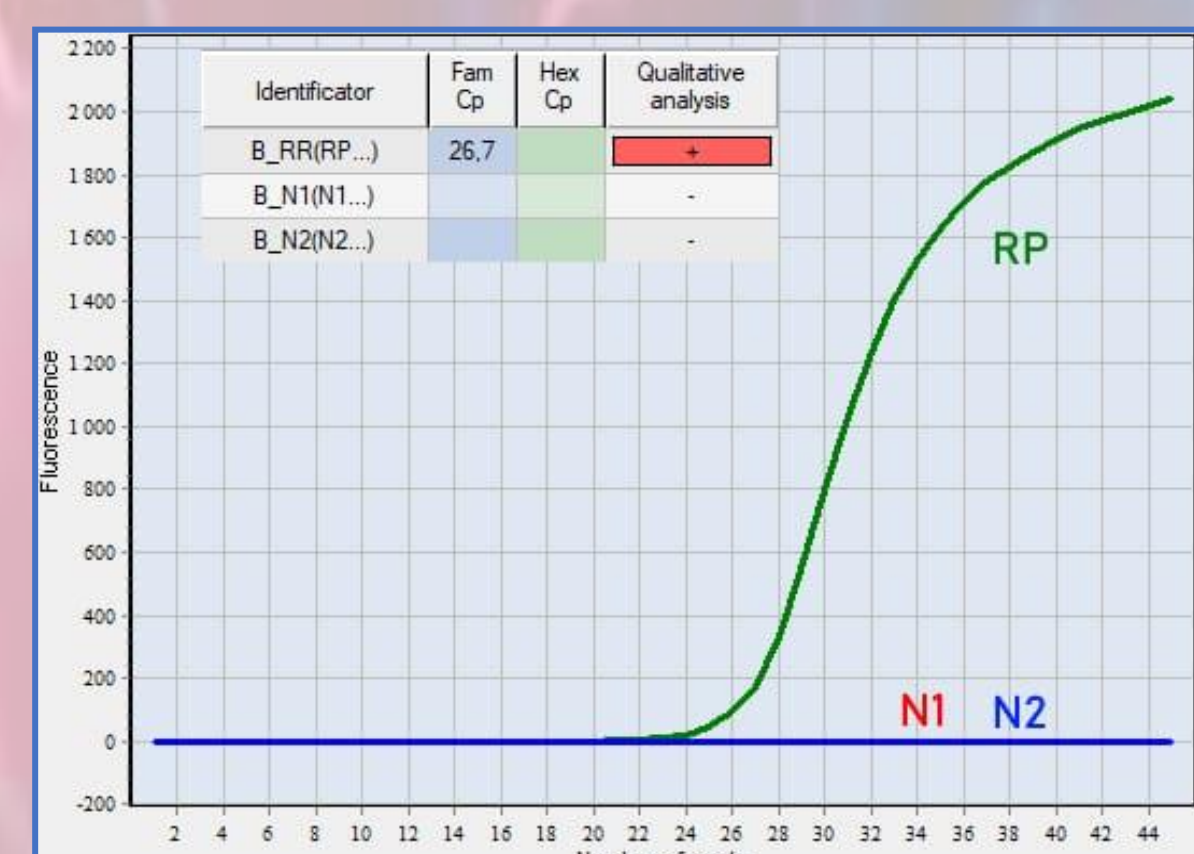


Fig. 7 – Resultado negativo para a Covid-19



Fig. 8 – Trabalho no IPS-Covid-Lab

Bibliografia:

- [1] Jin, Y.; Yang, H.; Ji, W.; Wu, W.; Chen, S.; Zhang, W. & Duan, G. (2020) - Virology, Epidemiology, Pathogenesis, and Control of COVID-19. *Viruses*. 12. 372. <https://doi.org/10.3390/v12040372>
- [2] W.C. Summers, W.C. (2009) - Virus Infection. in *Encyclopedia of Microbiology*. (Schaechter, M. Ed.), Third Edition, Academic Press: 546-552
- [3] Wang, W.; Xu, Y.; Gao, R.; Lu, R.; Han, K.; Wu, G. & Tan, W. (2020) - Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA*. 323(18): 1843–1844.
- [4] Carrajola, C.; Castro, M.J. & Hilário, T. (2009) - *Planeta com vida. Biologia 12º ano*. Santillana, Constância ed. Carnaxide. 415 pp.
- [5] Gomes, Gabriela; Justino, Marta (2019/2020) - A técnica de PCR e aplicações.
- [6] Prudêncio, Miguel; Zuzarte, Luís, Vanessa & Costa, Judite (2020) - *iMM Covid19 Diagnostic. Standard Operating Procedure and Risk Assessment*. IMM/ FML/ CHLN, EPE. Lisboa. 122pp.
- [7] Carvalho-Correia, E.; Calçada, C.; Branca, F.; Estévez-Gómez, N.; Chiara, L.; Varela, N.; Gallego-García, P.; Posada, D.; Sousa, H.; Sousa, J.; Veiga, M.I. & Osório, N.S. (2021) - OmnisARS2: A Highly Sensitive and Specific RT-qPCR-Based COVID-19 Diagnostic Method Designed to Withstand SARS-CoV-2 Lineage Evolution. *Biomedicine*. 9 (10): 1314. <https://doi.org/10.3390/biomedicine9101314>
- [8] Green, M.R. & Sambrook, J., 2012, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4ª edição, Capítulos 6, 7, 9 e 13, Protocolos de RNA e RT-qPCR, Cold Spring Harbor Laboratory Press.ISBN:978-1-936113-42-2