



ANÁLISE PAREADA DAS METODOLOGIAS RT-PCR E LAMP NA DETECÇÃO DE SARS-COV-2 EM SWABS NASOFARÍNGEOS DE INDIVÍDUOS SINTOMÁTICOS E ASSINTOMÁTICOS

Palavras-Chave: [COVID-19], [Diagnóstico], [Biologia Molecular].

Autores:

MAYARA LARA BRABO, Discente do curso de Medicina, FCM - UNICAMP
PROF. DR. PLÍNIO TRABASSO (Orientador), Laboratório de Epidemiologia Molecular e Doenças Infecciosas (LEMDI) - Departamento de Clínica Médica - FCM/UNICAMP.

INTRODUÇÃO:

Em 31 de dezembro de 2019, 27 casos de pneumonia de etiologia desconhecida foram identificados na cidade de Wuhan, província chinesa com população superior a 11 milhões de habitantes. O agente causal foi identificado a partir de amostras de swabs orofaríngeos conduzidas pelo Centro Chinês de Controle e Prevenção de Doenças (CCDC) em 7 de janeiro de 2020 e, subsequentemente, foi nomeado Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2). A doença causada por esse vírus foi nomeada COVID-19 pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (1).

A COVID-19 é causada por um betacoronavírus denominado SARS-CoV-2 que afeta o trato respiratório inferior e se manifesta como pneumonia em humanos. É constituído por uma estrutura de ácido ribonucleico de fita simples RNA que pertence à subfamília *Coronavirinae*, parte da família *Coronaviridae*, sendo, assim, aparentado da síndrome respiratória aguda grave (SARS) e da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS) (1,2).

A maioria dos pacientes infectados com SARS-CoV-2 desenvolve sintomas leves como tosse seca, febre e fadiga. Todavia, alguns desenvolveram várias complicações fatais, incluindo falência múltipla de órgãos, choque séptico, edema pulmonar, pneumonia grave e Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA). Um certo padrão foi notado no que se refere a uma maior probabilidade de agravamento da doença, em que boa parte da população infectada que necessitava de apoio em terapia intensiva eram mais idosos e apresentavam múltiplas comorbidades, como, por exemplo, doenças cardiovasculares, cerebrovasculares, endócrinas, digestivas e respiratórias. O atual conhecimento sobre as formas de transmissão interpessoal é que são transmitidos de um ser humano para outro através de aerossóis e gotículas respiratórias (1, 2, 3).

Com objetivo de melhor detectar os betacoronavírus, incluindo o SARS-CoV-2, recomenda-se a coleta de amostras de trato respiratório superior e inferior como swabs de naso e orofaringe, escarro, e lavado broncoalveolar, a fim de submetê-las ao atual padrão ouro para o diagnóstico etiológico, a reação



em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real (RT-PCR) (4,5).

Os estudos clínicos sobre a detecção do SARS-CoV-2 utilizam, majoritariamente, como métodos de amplificação de RNA alvo o RT-PCR e a amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP). Este é um método alternativo de baixo custo que detecta o vírus da COVID-19 de forma rápida e com poucos equipamentos, além de possibilitar um resultado colorimétrico de fácil visibilidade nos ambientes mais diversos. Embora o RT-LAMP não possua a alta sensibilidade diagnóstica do RT-PCR, sua capacidade de resposta rápida com reduzido gasto é reconhecidamente importante para justificar seu uso a fim de reduzir a taxa de transmissão do SARS-CoV-2. Portanto, o RT-LAMP é um método promissor, com concordância acima de 90% em estudos de referência, com probabilidade de identificar pacientes disseminadores do vírus com redução expressiva de custo, de tempo, de reagentes e de equipamentos em relação a amostras de swabs nasofaríngeos analisadas por RT-PCR (6, 7).

Este projeto visa verificar a equivalência entre os testes moleculares de RT-LAMP para detecção do patógeno da COVID-19 e os testes moleculares de RT-PCR em amostras de swabs nasofaríngeos para a detecção deste mesmo vírus em indivíduos sintomáticos e assintomáticos.

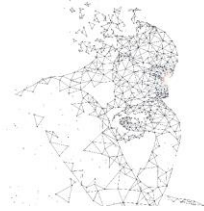
METODOLOGIA:

Este estudo é uma análise retrospectiva de 356 amostras de *swabs* nasofaríngeos analisados para infecção por SARS-CoV-2. A população desta pesquisa são 356 pacientes, sintomáticos e assintomáticos, hospitalizados ou não, testados para infecção por SARS-CoV-2 no período entre abril e dezembro de 2020.

Conjectura-se como hipótese desse estudo que os testes analisados pelas técnicas conhecidas como LAMP (*Loop-Mediated Isothermal Amplification*) e RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) possuam equivalência entre si para detecção de SARS-CoV-2.

As amostras de swabs nasofaríngeos foram processadas do mesmo modo que os demais espécimes clínicos no Laboratório de Microbiologia da Divisão de Patologia Clínica do HC/UNICAMP. A extração de RNA dos espécimes clínicos para diagnóstico laboratorial de SARS-CoV-2 foi realizada com o Extrator e purificador de DNA e RNA EXTRACTA 96 (Loccus, Brasil), um sistema automatizado que realiza a extração utilizando esférulas magnéticas juntamente com o Kit EXTRACTA 96 (Loccus, Brasil). O procedimento demanda cerca de 40 minutos para a extração de 96 amostras e rende até 200 microlitros de RNA purificado de cada amostra, através das etapas de lise, ligação nas esférulas, lavagem e eluição. (8)

Um total de 356 amostras foram incluídas na análise final, avaliadas simultaneamente para detecção do SARS-CoV-2 por RT-PCR e por LAMP. Assim, a análise estatística foi realizada por uma comparação pareada entre ambas as técnicas, sendo o RT-PCR o padrão-ouro para todos os resultados. Deste modo, foram calculadas sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e a acurácia para o LAMP.



O quadro abaixo demonstra a organização dos dados e, logo após, o método de cálculo das medidas supracitadas.

Quadro 1 – Organização de dados das tabelas a seguir.

| | | RT-PCR | |
|------|-----------|-----------|-----------|
| | | POSITIVOS | NEGATIVOS |
| LAMP | POSITIVOS | VP | FN |
| | NEGATIVOS | FP | VN |

OBS: VP = Verdadeiros positivos, FN = Falsos negativos, FP = Falsos positivos e VN = Verdadeiros negativos.

A sensibilidade (**S**), probabilidade de um indivíduo doente ter seu teste positivo, foi calculada com base na equação a seguir:

$$S = VP / (VP + FN)$$

Quanto a especificidade (**E**), probabilidade de um indivíduo saudável ter seu teste negativo, o cálculo foi realizado baseado na equação abaixo:

$$E = VN / (VN + FP)$$

Já o valor preditivo positivo (**VPP**) é a possibilidade de um indivíduo com resultado positivo estar de fato com a doença em questão:

$$VPP = VP / (VP + FP)$$

Enquanto o valor preditivo negativo (**VPN**) é a possibilidade de um indivíduo com resultado negativo ser verdadeiramente saudável:

$$VPN = VN / (VN + FN)$$

Por último, a acurácia, medida que avalia a precisão geral de um modelo ao comparar suas previsões com os valores observados, foi apurada pela equação abaixo:

$$\text{Acurácia} = (VP + VN) / (VN + FN + VP + FP)$$

RESULTADOS:

Os resultados obtidos dos swabs nasofaríngeos pelos métodos supracitados são demonstrados a seguir na tabela 1.

Tabela 1 – Resultados quantitativos dos testes realizados pelas técnicas de RT-PCR e RT-LAMP para diagnóstico de SARS-CoV-2

| | | RT-LAMP | | |
|--------|-----------|-----------|-----------|-------|
| | | POSITIVOS | NEGATIVOS | TOTAL |
| RT-PCR | POSITIVOS | 305 | 24 | 329 |
| | NEGATIVOS | 0 | 27 | 27 |
| | TOTAL | 305 | 51 | 356 |



Logo, por meio dos cálculos já citados, os resultados da análise estatística realizadas com base nos dados da tabela 1 constam na tabela 2:

Tabela 2 – Resultados da análise estatística.

| | VALOR ABSOLUTO | VALOR PERCENTUAL |
|-----------------------|----------------|------------------|
| SENSIBILIDADE | 0,9270516717 | 92,71% |
| ESPECIFICIDADE | 1 | 100% |
| VPP | 1 | 100% |
| VPN | 0,5294117647 | 52,94% |
| ACURÁCIA | 0,9325842697 | 93,26% |

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Em vista dos resultados obtidos através da comparação dos testes e da análise de seus resultados, pode-se concluir que a sensibilidade da RT-PCR e do LAMP foi avaliada e demonstrou ser de 92,71%, indicando que ambas as técnicas possuem uma alta capacidade de detectar corretamente os casos positivos.

A detecção viral em testes moleculares como o RT-PCR e o LAMP é fundamentada na amplificação de genes específicos. No RT-PCR, são avaliados os genes E (envelope), N (nucleocapsídeo) e R (genoma viral). Entretanto, no LAMP, a detecção pode ser afetada pela sensibilidade e carga viral presente nas amostras de swabs nasofaríngeos. Assim, é importante ressaltar que os resultados falso-negativos observados apresentaram características semelhantes nos dois métodos, já que foram associados a um alto valor de Ct na RT-PCR e a um tempo prolongado de detecção no LAMP, sugerindo uma baixa carga viral nos espécimes testados.

Além disso, é essencial avaliar que os resultados falsos negativos foram observados no LAMP quando apenas o gene E foi detectado pelo RT-PCR com valores de Ct acima de 30 minutos. Esses valores elevados de Ct indicam uma baixa carga viral nas amostras e, concomitantemente, revelam uma baixa sensibilidade do LAMP para o gene E. Esse resultado sugere que o LAMP pode não ser tão eficiente quanto o RT-PCR na detecção do gene E em amostras com baixa carga viral.

Quanto aos resultados verdadeiros positivos, em sua maioria, apresentaram a detecção dos três genes pelo RT-PCR. Todavia, é importante destacar que algumas amostras que apresentaram apenas a detecção do gene N pelo RT-PCR também foram positivas no LAMP, sugerindo, então, que o LAMP pode ser mais sensível na detecção do gene N em comparação com os outros genes.

Por fim, considerando esses resultados, podemos afirmar que, embora o LAMP seja tão específico quanto a PCR, ou seja, apresente resultados negativos corretamente para os indivíduos não infectados, ele demonstra uma leve queda na sensibilidade em relação à RT-PCR. A sensibilidade do LAMP, embora



seja relativamente alta (92%), ainda pode resultar na não detecção de alguns casos positivos. Apesar dessa limitação, a alta sensibilidade relativa do LAMP (92%) é considerada satisfatória, especialmente quando levamos em consideração os benefícios em termos de custo e tempo de análise. Portanto, o uso da técnica de LAMP é vantajosa para a detecção do SARS-CoV-2, especialmente em configurações onde recursos e infraestrutura laboratorial podem ser limitados.

BIBLIOGRAFIA:

- 1) SOHRABI, Catrin *et al.* World Health Organization declares global emergency: a review of the 2019 novel coronavirus (covid-19). **International Journal Of Surgery**, v. 76, p. 71-76, abr. 2020. Elsevier BV.
- 2) CHAN, Jasper Fuk-Woo *et al.* Improved Molecular Diagnosis of COVID-19 by the Novel, Highly Sensitive and Specific COVID-19-RdRp/Hel Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay Validated In Vitro and with Clinical Specimens. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 58, n. 5, mar. 2020. American Society for Microbiology. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7180250/>.
- 3) BOUROUIBA, Lydia. Turbulent Gas Clouds and Respiratory Pathogen Emissions: potential implications for reducing transmission of covid-19. **JAMA**, v. 323, n. 18, p. 1837-1838. 12 mar. 2020.
- 4) LOEFFELHOLZ, Michael J.; TANG, Yi-Wei. Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections – the state of the art. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 747-756, 1 jan. 2020. Informa UK Limited.
- 5) LIPPI, Giuseppe; SIMUNDIC, Ana-Maria; PLEBANI, Mario. Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Clinical Chemistry And Laboratory Medicine (Cclm)**, v. 58, n. 7, p. 1070-1076, 25 jun. 2020.
- 6) DUDLEY, Dawn M.; NEWMAN, Christina M.; WEILER, Andrea M.; *et al.* Optimizing direct RT-LAMP to detect transmissible SARS-CoV-2 from primary nasopharyngeal swab samples. **Public Library of Science One**, v. 15, n. 12, 31 dez. 2020.
- 7) OSCORBIN, Igor P.; SHEVELEV, Georgiy Yu.; PRONYAEVA, Ksenia A.; STEPANOV, Andrey A.; SHAMOVSKAYA, Darya V.; MISHUKOVA, Olga V.; PYSHNYI, Dmitrii V.; FILIPENKO, Maksim L.. Detection of SARS-CoV-2 RNA by a Multiplex Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Coupled with Melting Curves Analysis. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, p. 5743, 27 maio 2021.
- 8) Extrator e purificador de DNA e RNA EXTRACTA 96 (Loccus, Brasil) - Instruções de Uso. Disponível em: <https://loccus.com.br/produto/extrator-e-purificador-de-dna-e-rna-extracta-96/>. Acesso em 05/07/2020