



A importância da Biologia Molecular no diagnóstico do SARS-CoV-2

The importance of Biology Molecular on diagnosis of SARS-CoV-2



VELOZO, Ana Clara Costa¹
PEIXOTO, Fernanda Gabriela de Souza²

Resumo

A pandemia causada pelo agente etiológico SARS-CoV-2, teve início do ano de 2020 e gerou um grande desafio na comunidade científica de todo o mundo. Seus sintomas podem variar de manifestações leves à quadros severos de pneumonia. Estudos estão buscando elucidar maneiras de prevenção, diagnóstico e tratamento da doença. Diante o cenário pandêmico, e o agravamento no número de casos e óbitos pela doença, a busca por um diagnóstico preciso é imprescindível. Portanto, o objetivo deste estudo é demonstrar a importância da utilização da biologia molecular através da técnica de *Real Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (Real Time RT-PCR), para a detecção do material genético do SARS-CoV-2 a partir de dados encontrados na literatura. Após análise crítica da literatura, foi possível confirmar a importância e eficiência da utilização da técnica de *Real Time RT-PCR* no diagnóstico da infecção, uma vez que essa técnica possibilita um bom desempenho na detecção do material genético viral, garantindo alto índice de acerto ao diferenciar um paciente infectado do não-infectado. Concluindo que até o momento esta técnica é considerada como o principal método diagnóstico para a doença, permanecendo assim como “padrão ouro”.

Palavras-Chave: Biologia Molecular, SARS-CoV-2, Corona Vírus, Diagnóstico, *Real Time RT-PCR*

Abstract

The pandemic caused by the etiologic agent SARS-CoV-2, started at the beginning of 2020. And create a big challenge in the scientific community from all around the world. The symptoms can variate of levels manifestation to severs cases of pneumonia. Studies are seeking ways of prevention, diagnosis and treatment of the disease. In view of the pandemic scenario and the worsening number of cases and deaths due to the disease, the search for an accurate diagnosis is essential. Therefore, the aim of this study is demonstrating the importance of using molecular biology through the technique of Real Time Transcriptase Reverse Polymerase Chain Reaction (Real Time RT-PCR), for the detection of the genetic material of SARS-CoV-2 from data found in the literature. After a critical analysis of the literature, it was possible to confirm the importance and efficiency of using the Real Time RT-PCR technique in the diagnosis of infection, since this technique allows a good performance in the detection of viral genetic material, guaranteeing a high success rate when differentiating an infected patient from the non-infected. Concluding that until now this technique is considered as the main diagnostic method for the disease, remaining as a “gold standard”.

Keywords: Molecular Biology, SARS-CoV-2, Corona Virus, Diagnoses, Real Time RT-PCR.

¹ Graduação em Biomedicina. Centro Universitário de Belo Horizonte – UNIBH. Minas Gerais, Brasil. anaclaravelozo@outlook.com.

² Graduada em Biomedicina. Centro Universitário de Belo Horizonte – UNIBH. Minas Gerais, Brasil. peixotofernanda@outlook.com.



1 Introdução

No início do ano de 2020, pesquisadores chineses identificaram um novo coronavírus, após um surto de doenças respiratórias que ocorreu na cidade de Wuhan, na China. Este novo vírus identificado recebeu o nome de *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (Síndrome Respiratória Aguda Grave de Coronavírus 2). Nome dado devido a sua semelhança com o vírus SARS-CoV, que surgiu também na china e matou cerca de 700 pessoas.

Diferentemente do surto epidêmico do primeiro coronavírus, o SARS-CoV-2 se disseminou por todo planeta, o que deu início a uma pandemia que até o presente momento causou cerca de 2.300.000 mortes no mundo (OPAS, 2021).

Perante ao cenário pandêmico causado pelo SARS-Cov-2 diversos desafios surgiram para compreensão da doença nomeada de Coronavirus Disease 2019. Tais como prevenção, diagnóstico e tratamento. Desde então, cientistas de todo o mundo buscam respostas para estes questionamentos. Com pesquisas de novos testes para detecção, buscas por tratamentos e vacinas.

Até o presente momento a técnica considerada padrão ouro para a detecção do agente etiológico da COVID-19 é a técnica de biologia molecular, chamada de *Real Time Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction*). Técnica a qual amplifica o material genético do vírus presente na amostra do paciente infectado.

Diante o exposto, o presente estudo tem como objetivo demonstrar a importância da utilização da biologia molecular através da técnica de Real Time RT-PCR, para a detecção do material genético do SARS-CoV-2 através de uma revisão da literatura. Para a construção do trabalho foi realizada uma pesquisa bibliográfica nas bases de dados Eletronic Library Online (SCIELO), Ministério da Saúde e Revistas Eletrônicas.

2 Fundamentação teórica

2.1 O Coronavírus

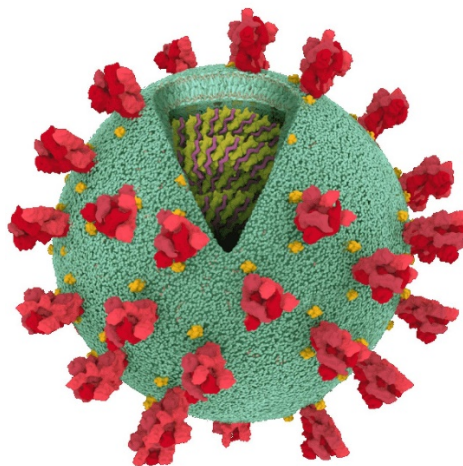
Os coronavírus são uma grande família de vírus comuns em muitas espécies diferentes de animais, incluindo camelos, gado, gatos e morcegos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). A COVID-19 é uma doença causada pelo coronavírus, denominado SARS-CoV-2, vírus pertencente à família *Coronaviridae*. Estes, podem causar uma variedade de doenças no homem e nos animais, especialmente no trato respiratório (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).



Trata-se de um vírus de RNA + de fita simples, e partículas esféricas com cerca de 125 nm de diâmetro, revestidas por um envelope fosfolipídico. Suas partículas apresentam projeções formadas por trímeros da proteína S (*spike protein*), dando-lhes o formato de espículas, também conhecido como coroa (USP, 2020).



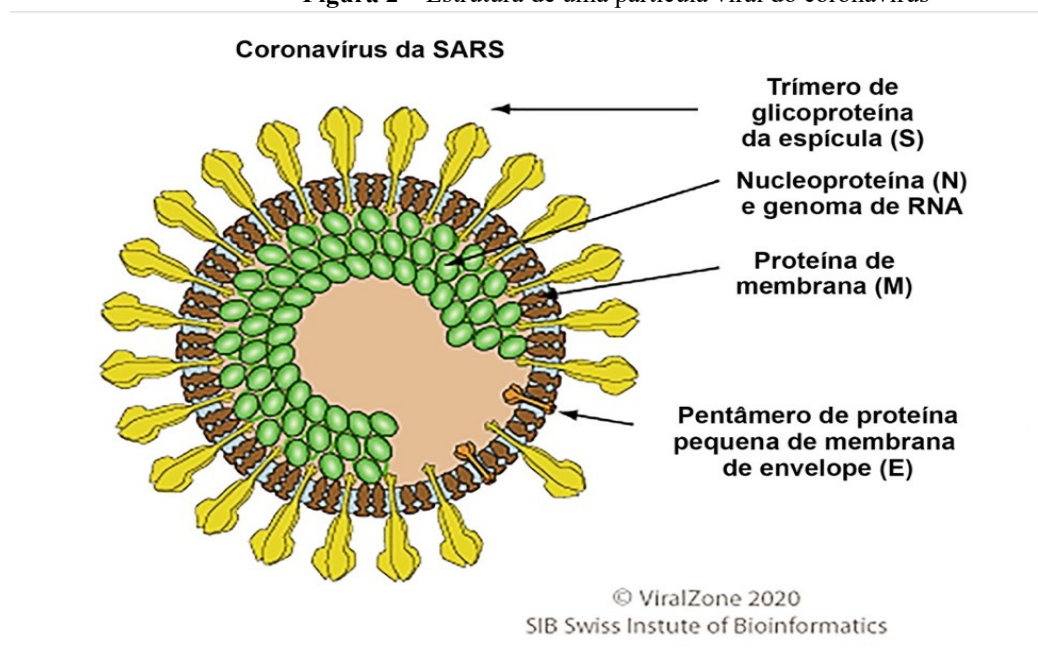
Figura 1 – Estrutura viral do coronavírus



Fonte: UZUNIAN, 2020.

O vírus se liga a células do hospedeiro através da proteína S, a qual interage com os receptores proteicos e a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) presente principalmente nas células pulmonares (USP, 2020).

Figura 2 – Estrutura de uma partícula viral do coronavírus

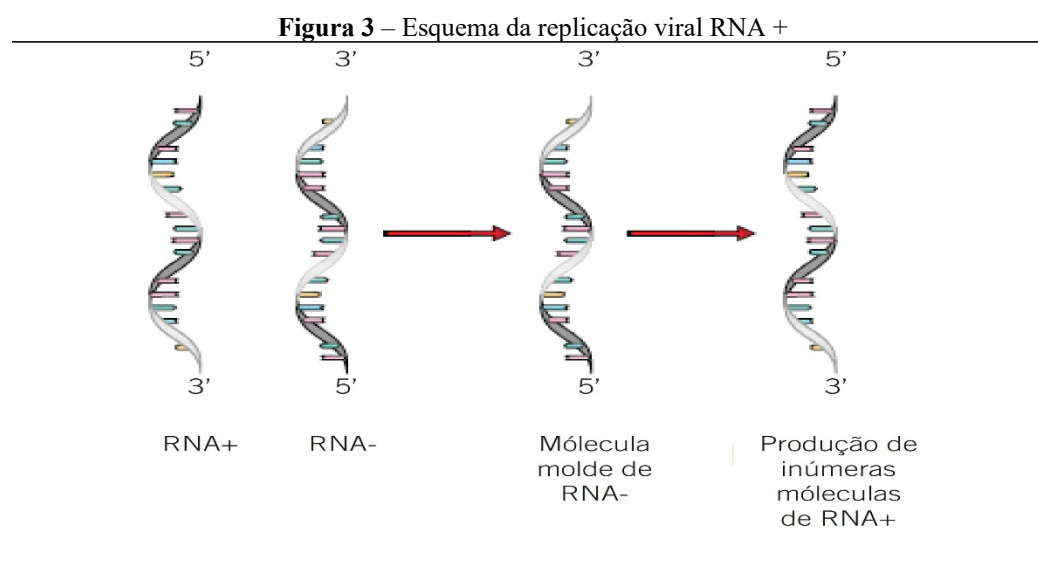


Fonte: <https://viralzone.expasy.org/30>



Após a introdução do material genético no interior da célula, uma vesícula celular é formada e em seu interior (endossomos) o vírus é retido e multiplicado. Posteriormente, as moléculas de RNA⁺ produzidas dentro dos endossomos são liberadas, e a síntese das proteínas virais acontece (UZUNIAN, 2020).

4



Fonte: UZUNIAN, 2020.

As manifestações clínicas causadas pelo vírus são muito amplas, podendo variar de sintomas leves como um resfriado, febre, tosse, dificuldades para respirar, até um quadro de pneumonia severa. Dados atuais demonstram a necessidade de investigação e tempo para caracterizar os aspectos clínicos da infecção pelo novo coronavírus (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

No que tange ao diagnóstico clínico e laboratorial, recomenda-se que ocorra uma investigação clínico – epidemiológica, exame físico, seguido do diagnóstico por meio das técnicas de *Real Time RT-PCR* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

2.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em Cadeia Polimerase (PCR), foi desenvolvida nos anos 80 por Kary Mullis, um bioquímico estadunidense que ganhou o prêmio Nobel de química em 1993 pela sua descoberta, que revolucionou o mundo da pesquisa científica (MELLO, 2005).

A PCR é uma técnica da Biologia Molecular que através de enzimas consegue amplificar de maneira exponencial uma sequência específica de DNA *in vitro* através de



múltiplos ciclos de desnaturação, anelamento e ligação do primer na sequência específica para amplificação do DNA que é feita pela enzima Taq DNA polimerase (SANTOS *et. al.* 2004).

5 Para a realização da técnica utiliza-se um equipamento chamado termociclador que varia de temperatura de acordo com a atividade de cada componente. A reação utiliza os deoxinucleotídeos (dNTPS), que são as bases nitrogenadas A-T-C-G, um par de primers, ou seja; uma sequência específica inicial que se ligará na região de interesse para amplificação, a enzima Taq DNA polimerase que é uma enzima termoestável, a amostra de interesse a ser amplificada. O cloreto de magnésio (MgCl₂), que funciona como um cofator da enzima polimerase e uma solução tampão de cloreto de potássio (KCl), para manter pH adequado (HAAS, 2016).

A análise da amplificação realizada pela PCR é feita através de um método chamado eletroforese em gel. Este gel pode ser de acrilamida ou agarose e será definido de acordo com cada protocolo e do tamanho do amplicon a ser revelado. A eletroforese irá separar os fragmentos de material genético de acordo com o seu tamanho, na presença de um campo elétrico. Desta forma é possível fazer a análise do material amplificado na PCR. A amostra amplificada é colocada no polo negativo e devido o DNA ser uma molécula de carga negativa o mesmo irá migrar para o polo positivo, desta forma separando os fragmentos do material genético de acordo com o peso, as moléculas de peso molecular menor irão migrar com maior facilidade. Ao final da corrida são analisadas as bandas e comparadas com o padrão.

2.3 Reação em cadeia da polimerase utilizando transcriptase reversa (RT-PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), possui diversas variações. Uma delas é a RT-PCR (*Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction*). Esta variação da PCR é utilizada para a detecção de material genético RNA (ribonucleic acid).

Para que a PCR seja realizada é preciso que o material genético RNA seja transcrito para DNA. Esta transcrição é chamada de transcrição reversa, e utiliza uma enzima chamada transcriptase reversa, pois em geral a ordem de transcrição no organismo é: DNA → RNA.

A RT-PCR tem como molde não o DNA e sim o RNA, Portanto antes de ocorrer propriamente a PCR é feito a conversão em cDNA ou DNA complementar. Esta conversão é feita pela enzima transcriptase reversa. A reação RT utiliza primers inespecíficos, e não em pares que são oligonucleotídeos compostos de várias timinas que irão anelar às regiões Poly-A



do RNA, que são ricas em adeninas. A partir de então se obtém o cDNA que será utilizado na PCR (SANTOS *et. al.* 2004).

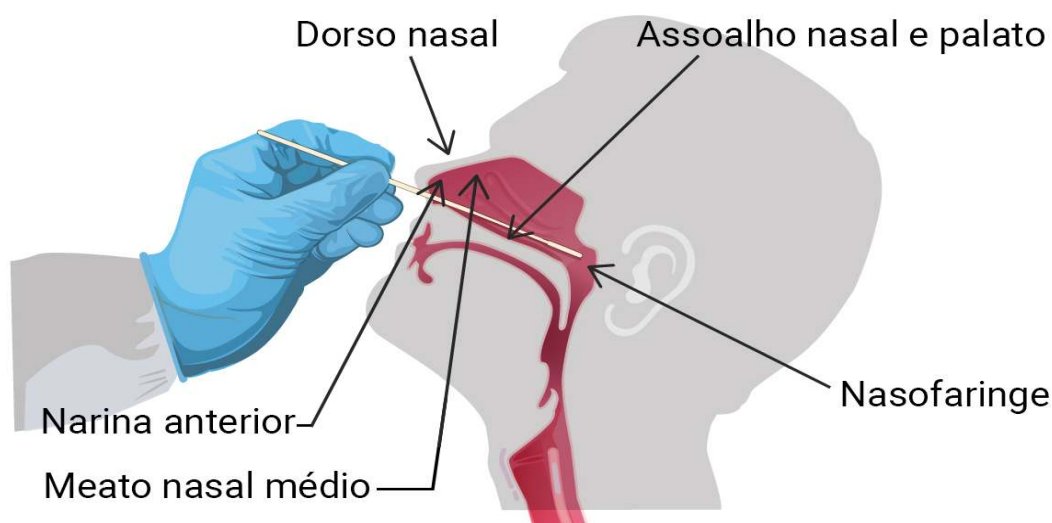


2.4 Real time RT-PCR para diagnóstico de Sars-Cov-2

Algumas viroses, como o SARS-Cov-2 contém somente RNA como o material genético, portanto é necessário a realização da conversão do RNA em DNA (IAEA, 2020). O diagnóstico do novo coronavírus é feito através da técnica de biologia molecular Real Time - RTPCR, um método derivado da PCR convencional. Utilizando, além dos componentes da PCR convencional, a enzima transcriptase reversa um marcador radioisótopo que gera fluorescência durante os ciclos da PCR. Este método permite que os cientistas vejam o resultado quase instantaneamente a ocorrência do procedimento através da análise da fluorescência em um computador que rastreia a quantidade de fluorescência a cada ciclo. Já a RT-PCR convencional só permitiria a visualização só resultado ao final da amplificação através da Eletroforese (IAEA, 2020).

A técnica de *Real Time RT-PCR* é uma técnica com alta sensibilidade e especificidade, com resultado em cerca de três horas. (IAEA, 2020). A amostra é colhida através de um swab nasal e nasofaríngeo. Para realizar a detecção viral, é necessário fazer a amplificação do material genético do vírus presente na amostra do paciente, através da *Real Time RT-PCR*. (SES, 2021).

Figura 4 – Esquema coleta de secreção em nasofaringe.



Fonte: <https://www.nupad.medicina.ufmg.br/doencas-infecciosas/instrucoes-coleta-covid-19/>



O diagnóstico através da técnica de *Real Time RT-PCR* é indicado, entre o 3º e 4º dia da doença, podendo se estender até o 10º dia. Seu objetivo é obter uma amostra das secreções respiratórias, identificando posteriormente a presença do vírus.

7

O *Real Time RT-PCR* é um exame qualitativo de excelente sensibilidade, com alta capacidade de diferenciar um paciente infectado do não-infectado. Sendo então considerado o exame ideal para diagnóstico de covid-19 (SES, 2021).

Considerações finais

Perante o que foi encontrado na literatura durante a construção do trabalho, é possível afirmar que as técnicas de Biologia Molecular são consideradas padrão ouro ou referência para detecção de agentes infecciosos. Confirmando a importância da Biologia Molecular no diagnóstico do SARS-CoV-2, através da técnica de *Real Time RT-PCR*.

Portanto, é possível afirmar que a utilização desta técnica molecular tem sido, até o presente momento o principal e mais seguro método para o diagnóstico da doença causada pelo agente etiológico SARS-Cov-2, a COVID19.

Referências

HAAS, D. J; TORRES, A, C, D. Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais. **Revista Científica De Medicina Veterinária**. n.26. Belo Horizonte, 2016. Disponível em:

http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/5D3Iu05EHeEnqPI_2017-1-12-8-29-47.pdf. Acesso em: 02 mar. 2021.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **How is the COVID-19 virus detected using real time RT-PCR?** Estados Unidos, 2020. Disponível em:

<https://www.iaea.org/bulletin/infectious-diseases/how-is-the-covid-19-virus-detected-using-real-time-rt-pcr>. Acesso em: 03 mar. 2021.

MELLO, F. C; COSTA, J. F. The utility of molecular biology in the diagnosis of tuberculosis. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v.31.n.03. Brasil, 2005. Disponível em:

<http://www.jbp.org.br/details/1429/en-US/a-utilidade-da-biologia-molecular-no-diagnostico-da-tuberculose>. Acesso em: 03 mar. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo de tratamento do Novo Coronavírus**. Brasília 2020.

Disponível em: <https://portaldeboaspraticas.iff.fiocruz.br/wp-content/uploads/2020/03/Protocolo-de-manejo-clinico-para-o-novo-coronavirus-2019-ncov.pdf>. Acesso em: 02 mar. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Sobre a doença- Coronavírus**. Brasil, 2021. Disponível em:

<https://coronavirus.saude.gov.br/sobre-a-doenca>. Acesso em: 02 mar. 2021.



ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). Folha informativa COVID-19. **Escritório das OPAS e da OMS no Brasil**. Brasil, 2021. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/covid19>. Acesso em: 02 mar. 2021



PORTAL DA USP. **Covid-19: o que se sabe sobre a origem da doença**. Ribeirão Preto, 2020. Disponível em: <https://jornal.usp.br/artigos/covid2-o-que-se-sabe-sobre-a-origem-da-doenca/>. Acesso em: 02 mar. 2021.

SANTOS, C, F. *et. al.* Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry. **Journal of Applied Oral Science**. v.12. n.1. Bauru, 2004. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-77572004000100002. Acesso em: 03 mar. 2021.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE MINAS GERAIS (SES). **Quando deve ser feito o pcr-rt para coronavírus?** Minas Gerias, 2021. Disponível em: <https://coronavirus.saude.mg.gov.br/blog/70-pcr-rt-para-coronavirus>. Acesso em: 03 mar. 2021.

UZUNIAN, A. Coronavírus SARS-CoV-2 e Covid-19. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v.56. Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1676-24442020000100051&script=sci_arttext&tlng=pt. Acesso em: 02 mar. 2021.