



Desenvolvimento e implantação de teste molecular para COVID-19



José Eduardo Levi

Virologista
Especialista em Biologia Molecular – Dasa



Luciano Scarpelli

Biólogo
Coordenador de Produção
Biologia Molecular –Dasa

art. 05

Desenvolvimento e implantação de teste molecular para COVID-19

José Eduardo Levi
Luciano Scarpelli

Em janeiro de 2020, nos mobilizamos frente à necessidade de dispor de métodos diagnósticos a serem oferecidos à comunidade atendida pela Dasa no contexto da pandemia. Assim como nas epidemias de zika em 2015/2016 e de febre amarela em 2017/2018, a alternativa de desenvolvimento possível foram os testes moleculares, mais precisamente a reação de polimerização em cadeia (PCR).

A opção por teste molecular se justifica porque é um método capaz de identificar a presença do RNA viral nas amostras biológicas, tendo alta sensibilidade e especificidade. Além disso, a Dasa tem know-how em testes moleculares desenvolvidos em nosso setor de biologia molecular e realizados de rotina no núcleo técnico-operacional (NTO) de Alphaville/SP. Estes testes são denominados “in-house ou lab-developed tests” (LDTs) e possuem uma regulamentação própria na legislação sanitária brasileira (RDC 302, Art. 5.5.5.1). Na Dasa, seguem os requisitos de qualidade e validação dos programas de acreditação do CAP (College of American Pathologists) e do brasileiro PALC (Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos).

Nesse contexto, os testes moleculares se valeram da infraestrutura e de reagentes comuns disponíveis adicionando apenas os reagentes específicos para o agente infeccioso em questão, os oligonucleotídeos essenciais ao método de PCR, denominados primers e probes.

Esses reagentes são pequenas sequências de DNA de cerca de 20 nucleotídeos sintetizados quimicamente por empresas terceiras. As sequências de DNA que informam a síntese desses reagentes são necessariamente derivadas do genoma do agente em questão, o novo coronavírus.

De forma extremamente rápida, em 12 de janeiro o primeiro genoma completo do agente foi disponibilizado⁽¹⁾ e, posteriormente, o vírus foi denominado⁽²⁾ SARS-CoV-2, dada a sua alta homologia (cerca de 90%) com outros identificados em morcegos e roedores, distinguindo-o do SARS-CoV, que causou uma epidemia semelhante em 2002/2003, também na China⁽³⁾.

Uma semana depois, a OMS divulgou em seu site um primeiro protocolo de PCR para detecção do SARS-CoV-2, desenvolvido pelo grupo do Prof. Dr. Christian Drosten da Universidade Charité de Berlim⁽⁴⁾. Imediatamente solicitamos a síntese dos primers e probes sugeridos. Enquanto na Europa e nos EUA esses reagentes são entregues em 24 horas, aqui no Brasil pode demorar de 15 a 30 dias, visto que são importados.

A validação de testes “in-house” é mais rigorosa do que para os kits comerciais com registro na Anvisa, e parte fundamental da validação é comprovar a sensibilidade do teste com amostras sabidamente positivas.

PROTAGONISMO DASA FRENTE À PANDEMIA

Naquele momento, não havia casos notificados no Brasil e muito poucos fora da China. Em substituição às amostras clínicas, empregamos material de referência fornecido pelo European Virus Archive GLOBAL (EVA-G). Esse material de referência foi adicionado a amostras de **swabs** de oro/nasofaringe simulando amostras positivas, e assim pudemos verificar a eficácia do método, estimar a sensibilidade analítica e validar o processo. Ao mesmo tempo, usamos amostras negativas e outras com positividade para outros vírus respiratórios, incluindo alfa (HCoV NL63 e HCoV 229E) e betacoronavírus (HCoV HKU1 e HCoV OC43) humano para avaliar a especificidade.

O protocolo proposto pelo Charité consiste em um par de primers e probe tendo como alvo o gene E do envelope viral usado para **screening**. Amostras positivas devem ser confirmadas com um segundo conjunto de primers e probe tendo como alvo o gene do RNA polimerase e o RNA-dependente viral (RdRp), conforme a Figura 1.

Figura 1.

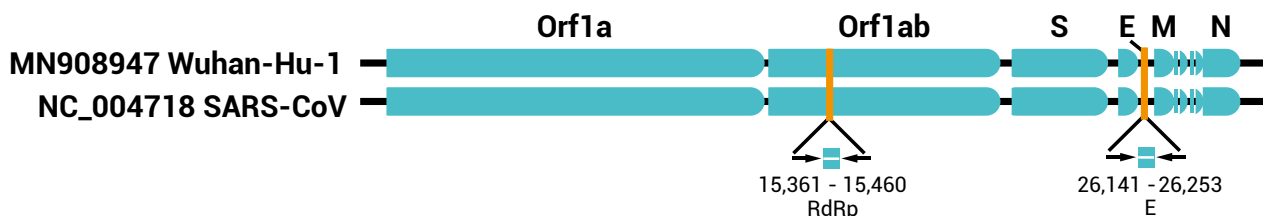


Figura 1: Alinhamento dos genomas isolados do SARS-CoV-2 (antes denominado nCoV 2019 Wuhan-Hu-1) e da SARS (SARS-CoV) com as regiões dos primers e probes sugeridas para diagnóstico do SARS-CoV-2 ressaltadas e com as coordenadas gênicas conforme GenBank para o isolado SARS-CoV NC_004718.

Este algoritmo de testagem se justificava porque o ensaio do gene E não é específico para o SARS-CoV-2, mas genérico para o subgrupo denominado Sarbecovírus, que inclui o novo coronavírus, mas também o SARS-CoV e outros coronavírus de morcegos. De posse dos reagentes apropriados e com resultados adequados na validação, porém sem amostras clínicas reais, lançamos nosso teste em 22 de fevereiro. Quatro dias depois, em São Paulo, foi identificado, por outro laboratório, o primeiro caso da América Latina em um indivíduo que havia retornado da Itália. Nesse momento sabíamos que a detecção do primeiro caso em nosso laboratório seria apenas uma questão de tempo, o que ocorreu no dia 6 de março, em um indivíduo assintomático do Rio de Janeiro, que também havia recém voltado da Itália.

DASA E O DESENVOLVIMENTO DA COVID-19 NO BRASIL: LIDERANÇA E COMPROMISSO

A partir de março, o percentual de amostras positivas cresceu progressivamente, variando de acordo com a proporção diária de amostras de coleta domiciliar, com predominância de indivíduos assintomáticos e oligossintomáticos (com baixa prevalência) e pacientes hospitalizados (com alta prevalência). Até o início de maio já haviam sido realizados mais de 60 mil testes de PCR com positividade média de 33%, correspondendo a cerca de 20 mil amostras com RNA viral detectado. O número de pacientes infectados é menor que 20 mil porque alguns realizaram mais de um teste no decorrer do quadro clínico, contribuindo com mais de uma amostra neste universo de 60 mil.

Com o aumento do volume e da incidência, observamos alguns poucos casos em que nossos resultados negativos não condiziam com a clínica ou mesmo com os exames realizados paralelamente, em outro local. Tais casos, em sua maioria, eram de amostras que apresentaram uma amplificação tardia do gene E, com valores de Cycle Threshold superiores a 30 e que, ao serem submetidas ao PCR confirmatório do gene RdRp, específico do SARS-CoV-2, não apresentavam qualquer amplificação. Essas observações também foram feitas por outros laboratórios⁽⁵⁾⁽⁶⁾, e a partir de 23 de março passamos a relatar diretamente como "detectado" amostras com Cts até 33 no gene E. As de zona cinza (Ct 33.1-34.5) são repetidas desde a amostra primária, mas submetidas a um outro PCR confirmatório, tendo como alvo o gene do nucleocapsídeo N. Essas mudanças e adequações são naturais no estabelecimento do diagnóstico de um agente emergente e novo.

Os testes de primeira geração, sejam moleculares, sejam sorológicos, vão sendo aprimorados à medida que se caracteriza melhor a variabilidade genômica e a capacidade antigênica do agente. Por este motivo, coexistem hoje diversos sistemas de PCR para SARS-CoV-2, diferindo não apenas pela região gênica elegida como alvo, mas também pelo seu número. O CDC americano, por exemplo, trabalha com dois alvos no gene N; o CDC chinês optou pela ORF 1a e o gene N (dois alvos); o protocolo Charité foca no gene E. Existem kits contendo até três alvos de regiões gênicas distintas.

"O sequenciamento de um número significativo de genomas completos permitirá a identificação das regiões virais mais conservadas, onde logicamente deverão ser ancorados os primers e probes cujo desempenho não deverá ser afetado pela variabilidade viral presente e futura. Felizmente o gene E, usado por nós, se mostrou uma das regiões mais conservadas em estudos preliminares."

AGIR NO PRESENTE PARA TRANSFORMAR O FUTURO

Em contraste aos sistemas "in-house" utilizados pela maioria dos laboratórios particulares e pela rede pública brasileira, já existem kits utilizados em plataformas 100% automatizadas e apropriados para grandes volumes. Infelizmente, tais sistemas só estão disponíveis na escala apropriada nos Estados Unidos e em alguns países da Europa, devendo chegar em quantidade significativa no Brasil apenas em agosto de 2020.

A disponibilização de testes moleculares em grande escala é o pilar das estratégias de retorno à seminormalidade empregadas nos países até agora com melhor desempenho no controle da pandemia: Alemanha, China e Coreia do Sul.

A demanda imediata e gigantesca de reagentes utilizados nos testes moleculares foi impossível de ser suprida em tempo hábil. Sendo assim, países sem capacidade produtiva, como o Brasil, se viram infelizmente à mercê de fornecimentos irregulares e imprevisíveis desses reagentes, principal fator limitante para a execução dos testes em larga escala.

Dentre os dois processos que compõem qualquer teste molecular de amplificação (extração + amplificação/detecção), o principal gargalo são as plataformas e reagentes da etapa de extração do material genético viral da amostra. Dada essa escassez, alguns grupos têm demonstrado a possibilidade da realização da PCR diretamente da amostra primária, evitando etapas de extração⁽⁹⁾.

"Os resultados são preliminares e claramente inferiores ao processo completo; porém, no cenário de pandemia podem constituir uma possibilidade para atender a enorme necessidade de testagem em larga escala. Seguimos avaliando."





REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 579 (7798), 265-269 (2020).
2. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Alexander E. Gorbalenya, Susan C. Baker, Ralph S. Baric, Raoul J. de Groot, Christian Drosten. The species Severe acute respiratory syndrome related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* 4:536-544 (2020).
3. Peiris JSM, Lai ST, Poon LLM, Guan Y, Yam LYC. et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 361, 1319–1325 (2003).
4. Corman Victor M, Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* (3) 2020. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
5. Chantal B.F. Vogels, Anderson F. Brito, Anne L. Wyllie, Joseph R. Fauver, Isabel M. Ott , Chaney C. Kalinich, Mary E. Petrone, Marie L. Landry , Ellen F. Foxman, Nathan D. Grubaugh. Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-COV-2 qRT-PCR assays. medRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.30.20048108>
6. Jaegyun Lim, Choon-Mee Kim, KyungHee Lee, Jun-Won Seo, Na-Ra Yun, You Mi Lee, Wang JunLee, Moon Jung Kim, Yu Min Kang, Young Gyu Kang, Dong-ki Lee, Baekseung Lee, Soyoun Kim, Dong-Min Kim. Insufficient sensitivity of RNA dependent RNA polymerase Gene of SARS-CoV-2 viral genome as Confirmatory Test using Korean COVID-19 cases. doi:10.20944/preprints202002.0424.v1
7. Chu DKW, Pan Y, Cheng SMS, Hui KPY, Krishnan P, Liu Y, Ng DYM, Wan CKC, Yang P, Wang Q, Peiris M, Poon LLM. 2020. Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019- nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. *Clin Chem* 2020, 66:549-555.
8. Nalla AK, Casto AM, Huang MW, Perchetti GA, Sampoleo R, Shrestha L, Wei Y, Zhu H, Jerome KR, Greninger AL. Comparative Performance of SARS-CoV-2 Detection Assays using Seven Different Primer/ Probe Sets and One Assay Kit. *J Clin Microbiol.* 2020. pii: JCM.00557-20. doi: 10.1128/JCM.00557-20. [Epub ahead of print].
9. Sanjay Srivatsan, Peter D. Han, Katrina van Raay, Caitlin R. Wolf, Denise J. McCulloch et al. Preliminary support for a “dry swab, extraction free” protocol for SARS-CoV-2 testing via RT-qPCR. bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.22.056283>