

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 01/06/2024.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Lia Ayumi Umezawa

**Avaliação da carga viral do SARS-CoV-2 em swab
nasofaríngeo conservado em etanol 70%**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para a obtenção do título de
Mestre(a) em Pesquisa e Desenvolvimento
(Biotecnologia Médica).

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Rejane Maria
Tommasini Grotto

**Botucatu
2022**

Lia Ayumi Umezawa

Avaliação da carga viral do SARS-CoV-2 em
swab nasofaríngeo conservado em etanol 70%

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para a obtenção do título de
Mestre(a) em Pesquisa e Desenvolvimento
(Biotecnologia Médica).

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Rejane Maria
Tommasini Grotto

Botucatu
2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Umezawa, Lia Ayumi.

Avaliação da carga viral do SARS-CoV-2 em swab
nasofaríngeo conservado em etanol 70% / Lia Ayumi Umezawa.
- Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Rejane Maria Tommasini Grotto
Capes: 90400003

1. COVID-19. 2. SARS-CoV-2. 3. Carga viral. 4. Teste
para COVID-19. 5. Etanol.

Palavras-chave: COVID-19; Carga Viral; Etanol 70%;
SARS-CoV-2; Swab nasofaríngeo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus, por ouvir as minhas orações e permitir que eu chegasse até aqui.

Agradeço aos meus pais, à minha irmã e meus avós pelo apoio incondicional, pela torcida em todas as etapas da minha vida profissional. Por acreditarem na minha capacidade, mesmo quando nem eu mesmo acreditava.

Agradeço à minha orientadora Rejane Maria Tommasini Grotto pelos ensinamentos e paciência, aos funcionários da rotina da Biologia Molecular (Maércio, Regina e Gabriela), do LBA, da pesquisa (Fabiana, Leonardo e Flávia) e todos que diretamente ou indiretamente me ajudaram nas etapas de construção desse trabalho e torceram por mim.

Não foi fácil chegar até aqui, uma pandemia que nos tirou o lazer, o convívio social, nos trouxe medo e insegurança do futuro. Pensei em desistir, mas a terapia e amigos próximos não permitiram que eu desistisse, mesmo em meio ao caos emocional.

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.”

Martin Luther King

RESUMO

O SARS-CoV-2 (Síndrome Respiratória Aguda Severa Coronavírus 2), agente etiológico da COVID-19 (Doença Coronavírus 2019), é um vírus de grande relevância em saúde pública devido aos impactos ocasionados no mundo durante a pandemia, com danos sanitários, sociais e econômicos. A detecção de seu RNA por RT-qPCR em amostras de swab nasofaríngeo conservadas em solução fisiológica é considerada o padrão ouro para o diagnóstico da doença e, se tornou de grande importância no manejo da pandemia e no controle da disseminação do vírus. Durante a pandemia um dos grandes problemas enfrentados por muitos serviços de saúde foi o armazenamento das amostras, as quais precisavam ser mantidas de 2 a 8°C até o processamento das mesmas, o que deveria ocorrer em no máximo 72 horas devido à degradação do RNA. Se o material não fosse processado nesse período o mesmo deveria ser armazenado a -80°C para preservação do RNA, o que cria um outro problema de gestão pois a maioria dos serviços não dispõe de tal equipamento. Opções conhecidas para conservar o material viral são o etanol 70%, o TRIzol™ e o Beta-mercaptoetanol adicionados à solução fisiológica na qual o material biológico é coletado. Neste cenário, a finalidade do presente estudo foi avaliar comparativamente a carga viral do SARS-CoV-2 em Swab nasofaríngeo conservado em etanol 70% e em solução fisiológica em diferentes temperaturas de armazenamento e intervalos de tempo a fim de fornecer subsídios aos gestores de sistemas de saúde para tomada de decisões estratégicas no contexto de transporte e armazenamento de amostras. Secreção naso e orofaríngeas foram submetidas à diferentes condições de temperatura e, diferentes soluções preservantes de RNA. Seguiu-se a extração de RNA viral automatizada utilizando metodologia baseada em beads magnéticas. A Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR) foi realizada utilizando o kit Gene Finder™ 2019-nCoV Assay. Os resultados mostraram que o armazenamento das

amostras ao longo de 12 dias em solução fisiológica à temperatura ambiente não causou nenhum impacto na quantificação viral, mas prejudicou a eficiência na amplificação do controle interno. Isso não foi observado quando o armazenamento foi realizado em 2 a 8°C ou pela adição de etanol 70% na amostra. Os resultados mostraram também que o TRIzol™ e o Beta-mercaptoetanol atuaram de forma a proteger as partículas virais em decorrência de congelamento e descongelamento sucessivos. Sabendo que o transporte e o armazenamento das amostras podem influenciar na detecção do SARS-CoV-2, podemos concluir que os resultados encontrados poderão contribuir na otimização desta logística em locais onde estes aspectos são comprometidos por diversos motivos.

Palavras-chave: COVID-19; SARS-CoV-2; Carga Viral; Swab nasofaríngeo; Etanol 70%; Solução Fisiológica.

ABSTRACT

SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2), the etiological agent of COVID-19 (Coronavirus Disease 2019), is a virus of great importance in public health due to the impacts caused in the world during the pandemic, with health damage, social and economic. The detection of its RNA by RT-qPCR in nasopharyngeal swab samples preserved in saline solution is considered the gold standard for the diagnosis of the disease and has become of great importance in the management of the pandemic and in the control of the spread of the virus. During the pandemic, one of the major problems faced by many health services was the storage of samples, which had to be kept at 2 to 8°C until processing, which should take place within a maximum of 72 hours due to RNA degradation. If the material was not processed during this period, it would have to be stored at -80°C for RNA preservation, which creates another management problem as most services do not have such equipment. Known options for conserving viral material are 70% ethanol, TRIzol™ and Beta-mercaptoethanol added to the saline solution in which the biological material is collected. In this scenario, the purpose of the present study was to comparatively evaluate the viral load of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal swab conserved in 70% ethanol and in saline solution at different storage temperatures and time intervals in order to provide subsidies to managers of delivery systems. health for making strategic decisions in the context of transport and storage of samples. Naso and oropharyngeal secretions were subjected to different temperature conditions and different RNA preservative solutions. Automated viral RNA extraction using a methodology based on magnetic beads followed. Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) was performed using the Gene Finder™ 2019-nCoV Assay kit. The results showed that the storage of the samples over 12 days in saline solution at room temperature did not have any impact on viral quantification, but it impaired the efficiency in the amplification of the internal control. This was not observed when storage was

performed at 2 to 8°C or by adding 70% ethanol to the sample. The results also showed that TRIzol™ and Beta-mercaptoethanol acted to protect viral particles from successive freezing and thawing. Knowing that the transport and storage of samples can influence the detection of SARS-CoV-2, we can conclude that the results found may contribute to the optimization of this logistics in places where these aspects are compromised for several reasons.

Keywords: COVID-19; SARS-CoV-2; Viral load; Nasopharyngeal Swab; 70% Ethanol; Physiological solution.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do SARS-CoV-2.....	15
Figura 2: Esquema representativo do genoma do SARS-CoV-2.....	17
Figura 3: Esquema representativo da replicação do SARS-CoV-2	18
Figura 4: Esquema ilustrativo do experimento realizado com etanol 70% e solução fisiológica	24
Figura 5: Esquema ilustrativo do experimento realizado com TRIzol™ e Beta-mercaptoetanol.	27
Figura 6: Curva que correlaciona CT e quantificação do RNA do SARS-CoV-2 (Log) para amostras de concentrações conhecidas extraídas utilizando o protocolo in house com solidphase reversible immobilization - SPRI.....	29
Figura 7: Curva que correlaciona CT e quantificação do RNA do SARS-CoV-2 (Log) para amostras de concentrações conhecidas extraídas utilizando o protocolo automatizado com o EXTRACTA KIT FAST – DNA e RNA Viral MVXA-P096 FAST.....	30
Figura 8: Curva que correlaciona CT e quantificação do RNA do SARS-CoV-2 (Log) para amostras de concentrações conhecidas extraídas utilizando o protocolo Beta-Mercaptoetanol e TRIzol™ seguido da extração baseado em sílica utilizando o kit Bio Gene Extração de DNA	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Representação dos tubos do experimento com TRIzol™ e Beta-Mercaptoetanol.....	26
Tabela 2: Carga viral para amostras armazenadas em salina fisiológica por até 12 dias em temperatura ambiente em diferentes intervalos de CT. ...	31
Tabela 3: Carga viral para amostras conservadas em salina, com CT menor que 20, armazenadas por até 12 dias em temperatura ambiente e de geladeira (2-8°C).....	32
Tabela 4: Carga viral para amostras conservadas em salina, com CT entre 20 e 30, armazenadas por até 12 dias em temperatura ambiente e de geladeira (2-8°C).....	32
Tabela 5: Carga viral para amostras conservadas em salina, com CT maior que 30, armazenadas por até 12 dias em temperatura ambiente e de geladeira (2-8°C).....	32
Tabela 6: Carga viral para amostras conservadas em etanol, com CT menor que 20, armazenadas por até 12 dias em temperatura ambiente e de geladeira (2-8°C).....	33
Tabela 7: Carga viral para amostras conservadas em etanol, com CT entre 20 e 30, armazenadas por até 12 dias em temperatura ambiente e de geladeira (2-8°C).....	34
Tabela 8: Carga viral para amostras conservadas em etanol, com CT maior que 30, armazenadas por até 12 dias em temperatura ambiente e de geladeira (2-8°C).....	34
Tabela 9: Carga viral para amostras conservadas em salina, armazenadas por até 12 dias em temperatura ambiente em diferentes intervalos de CT, para método de extração “ <i>In house</i> ”	35
Tabela 10: Carga viral para amostras conservadas em salina, com CT menor que 20, armazenadas por até 12 dias em temperatura ambiente para métodos de extração Loccus e “ <i>In house</i> ”	36
Tabela 11: Carga viral para amostras conservadas em salina, com CT entre	

20-30, armazenadas por até 12 dias em temperatura ambiente para métodos de extração Loccus e “ <i>In house</i> ”	36
Tabela 12: Carga viral para amostras conservadas em salina, com CT maior que 30, armazenadas por até 12 dias em temperatura ambiente para métodos de extração Loccus e “ <i>In house</i> ”	36
Tabela 13: CTs do controle interno para amostras conservadas em salina e etanol, em temperatura ambiente ou de geladeira, para CTs do gene E (viral) menor que 20, armazenadas por até 12 dias. Método de extração comercial	38
Tabela 14: CTs do controle interno para amostras conservadas em salina e etanol, em temperatura ambiente ou de geladeira, para CTs do gene E (viral) entre 20-30, armazenadas por até 12 dias. Método de extração comercial	38
Tabela 15: CTs do controle interno para amostras conservadas em salina e etanol, em temperatura ambiente ou de geladeira, para CTs do gene E (viral) maior que 30, armazenadas por até 12 dias. Método de extração comercial	39
Tabela 16: Carga viral do SARS-CoV-2 obtida após descongelamento das amostras por até 4 vezes, conservadas em solução salina 0,9% e em trizol e beta-mercaptoetanol	40

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

+ssRNA	RNA de polaridade positiva
ACE2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CLIA	Quimioluminescência
COVID-19	Doença Coronavírus 2019
CT	Cycle Threshold
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
E	Envelope
ECLIA	Eletroquimioluminescência
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
M	Membrana
N	Nucleocapsídeo
NB2	Nível de Biossegurança 2
Nsp	Proteína não estrutural
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORFs	Quadro de leitura aberta
PBS	Phosphate Buffered Saline
PP1a	Poliproteína 1a
PP1ab	Poliproteína 1ab
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
RT-LAMP	Amplificação isotérmica de regiões genômicas do vírus mediada por loop com transcriptase reversa
RT-qPCR	PCR em tempo real quantitativa
S	Superfície
S1	Subunidade 1

S2	Subunidade 2
SARS-CoV-2	Síndrome Respiratória Aguda Severa Coronavírus 2
SPRI	Solidphase Reversible Immobilization
TM2	Domínio transmembranar 2
TMPRSS2	Serino Protease Transmembrana tipo 2
TRS	Sequências Regulatórias Transcricionais
UTR	Região não traduzida

SUMÁRIO

1. Introdução.....	14
2. Objetivos.....	22
3. Materiais e Métodos	23
3.1 Preparação das alíquotas de SARS-CoV-2	23
3.2 Extração do RNA viral do SARS-CoV-2.....	23
3.3 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR) .	24
3.4 Preparação das alíquotas de SARS-CoV-2	25
3.5 Extração do RNA viral do SARS-CoV-2.....	26
3.6 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR) .	26
3.7 Curva-padrão.....	27
4. Análise estatística.....	28
5. Resultados e Discussões.....	29
6. Conclusões	42
7. Referências.....	44

1. Introdução

A Doença Coronavírus 2019 (COVID-19) se tornou um desafio não só para os órgãos sanitários, mas também para laboratórios de diagnóstico molecular no sentido do estabelecimento de estratégias de conservação e processamento de amostras num momento em que existia uma carência de produtos no mercado nacional. Originada em Wuhan, na província de Hubei, China, a COVID-19 se tornou de grande importância em nível mundial por conduzir a casos quadros graves de pneumonia (1). A etiologia foi atribuída a um novo coronavírus, um vírus de RNA de polaridade positiva que pertence à família *Coronaviridae*, gênero *Betacoronavirus*, o SARS-CoV-2 (Síndrome Respiratória Aguda Severa Coronavírus 2) (2).

Devido à alta transmissibilidade, o SARS-CoV-2, disseminou-se rapidamente para todos os continentes, atingindo mais de 200 países em poucos meses. Em 11 de Março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) anunciou que o surto iniciado na China, havia se tornado uma pandemia (3).

Até o dia 26 de fevereiro de 2022 foram confirmados 434.247.399 casos de Covid-19 no mundo, sendo que o maior número de casos tinha sido registrado nos Estados Unidos (78.931.739), seguido pela Índia (42.916.117) e pelo Brasil com 28.744.050 casos. Foram confirmados 5.944.313 óbitos em todo o mundo. Os Estados Unidos foi o país com maior número de óbitos (948.215), seguido do Brasil (648.913), Índia (513.724), Rússia (343.178) e México (318.014) (4).

Estudos sugerem que eventos de recombinação entre os coronavírus deram origem ao SARS-CoV-2, linhagem que circula em morcegos há décadas (5).

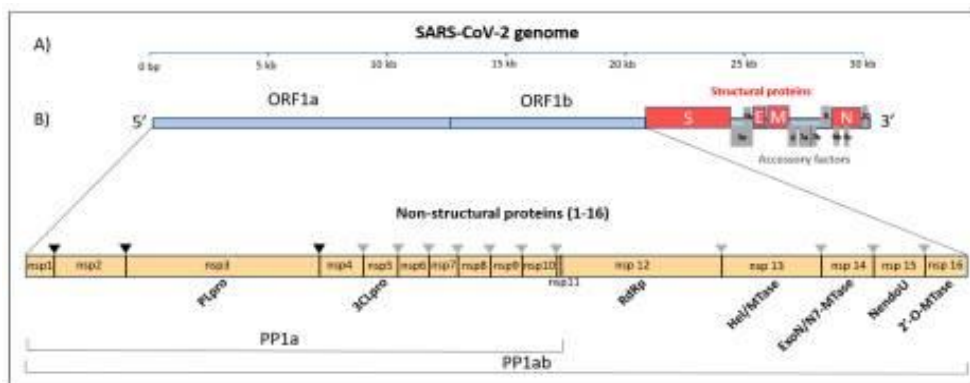
A estrutura da partícula viral (figura 1) é composta pelas proteínas *Spike* (S), Envelope (E), Nucleocapsídeo (N), Membrana (M) e pelo material genético do vírus, o RNA (Ácido Ribonucleico) (6).

A proteína do nucleocapsídeo (N) forma o capsídeo que é envolto

quatro proteínas estruturais (figura 2): S (*Spike*), E (Envelope), M (Membrana) e N (Nucleocapsídeo) e dezesseis proteínas não estruturais (Nsp 1-16). As proteínas não estruturais atuam em diferentes processos do ciclo viral, por exemplo, a Nsp1 inibe a tradução da proteína líder do hospedeiro e atua na mediação do processamento e a replicação do RNA. Já a Nsp2 modula a via de sinalização de sobrevivência da célula hospedeira. A Nsp3 funciona como uma protease que separa a poliproteína traduzida em suas proteínas distintas. A Nsp4 contém domínio transmembranar 2 (TM2) e modifica as membranas do Retículo Endoplasmático. Nsp5 participa do processo de poliproteína durante a replicação. Nsp6 desempenha um papel na indução inicial de autofagossomos do retículo endoplasmático do hospedeiro. Nsp7 é RNA polimerase dependente de RNA. Nsp8 é RNA polimerase multimérica, replicase. Nsp9 funciona como uma proteína de ligação ao ssRNA. A Nsp10 é crítica para a metilação cap de mRNAs virais. Nsp11 permanece de função desconhecida. Nsp12 contém a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), que é responsável pela replicação e transcrição do RNA do coronavírus. O Nsp13 liga-se ao ATP e o domínio de ligação do zinco e participa do processo de replicação e transcrição. Nsp14 é um domínio de exoribonuclease de revisão. Nsp15 tem atividade de endoribonuclease dependente de Mn (2+). Nsp16 é uma metiltransferase 2'-O-ribose (12).

Para infectar as células epiteliais brônquicas, pneumócitos e células do trato respiratório superior, a glicoproteína *spike* do SARS-CoV-2 se liga ao receptor celular Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ACE2) e à enzima Serino Protease Transmembrana tipo 2 (TMPRSS2) da superfície da célula-alvo, clivando e ativando a proteína *spike*, que permite a entrada na célula hospedeira por endocitose ou fusão direta do envelope viral (figura 3) (13). Há também uma porta de entrada alternativa, o receptor de neuropilina-1 no sistema nervosa (14–16).

Figura 2: Esquema representativo do genoma do SARS-CoV-2, evidenciando duas regiões abertas de leitura (em azul, ORF1a e ORF1b) que codifica proteínas não estruturais e, a região codificadora das proteínas estruturais (em vermelho S, E, M e N)

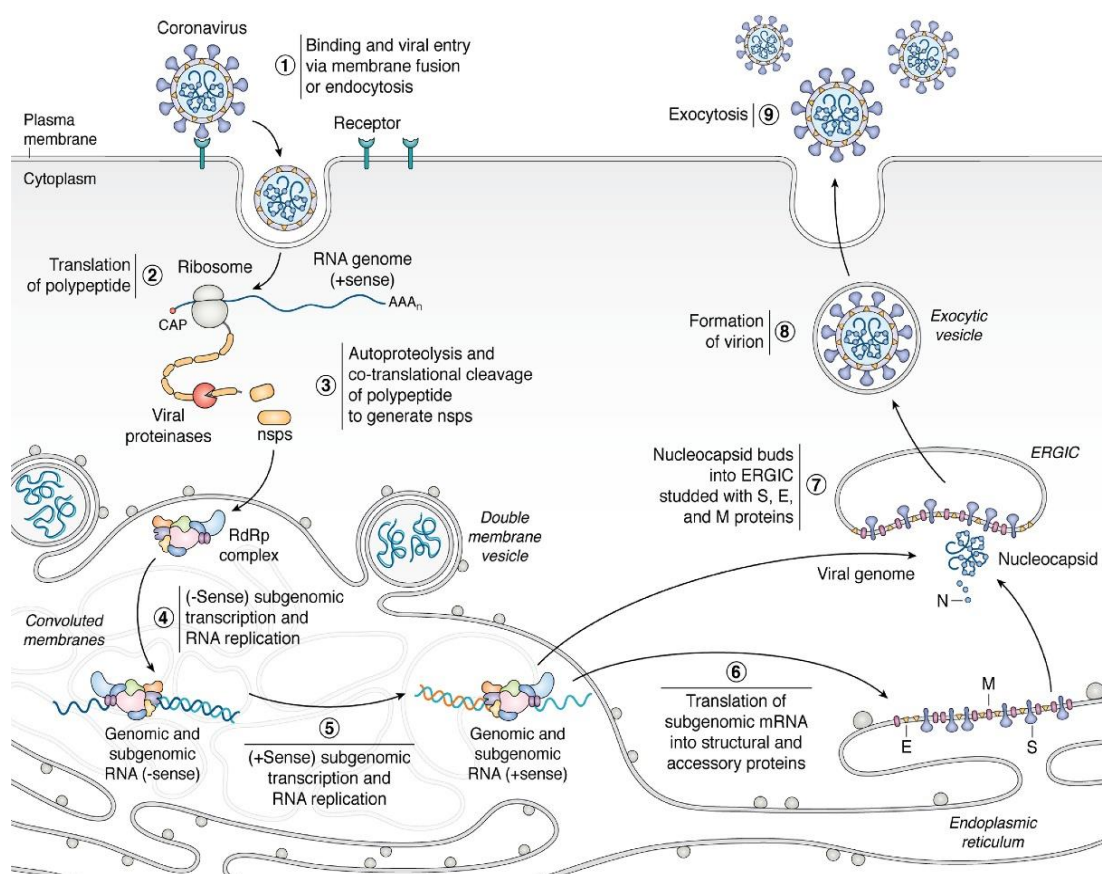


Fonte: ROMANO et al., 2020.

O RNA viral atua como um RNA mensageiro (RNAm) que é traduzido em enzimas replicativas. O genoma do vírus possui um *cap* na região 5' e uma cauda poli A na região 3', além disso há em ambas extremidades região não traduzida (UTR) que são responsáveis pela regulação da replicação e transcrição do RNA. O genoma viral contém 14 fases de leitura aberta (ORFs), sendo as duas principais unidades de transcrição, a ORF1a que codifica a poliproteína 1a (PP1a) da replicase e ORF1ab que codifica a poliproteína 1ab (PP1ab) que incorpora as proteínas não estruturais (Nsp1-16) que formam a maquinaria da replicase (figura 1). A extremidade 3' do genoma codifica as proteínas estruturais (*spike*, envelope, membrana e nucleocapsídeo) (Figura 2), há também nove ORFs intercaladas nas regiões estruturais para fatores acessórios. Um conjunto de RNAs subgenômicos irão originar, após tradução, proteínas estruturais e acessórias a partir de um RNA fita negativa o qual é regulado pelas Sequências Regulatórias Transcricionais (TRS) (Figura 3). A fita negativa também funciona de molde para sintetizar a fita positiva que será genoma de nova partícula viral. Os RNAs subgenômicos serão expressos no retículo endoplasmático rugoso (RER) formando as proteínas virais em sua membrana que migram para o complexo de Golgi e o RNA fita positiva, já

com o nucleocapsídeo vai ser encapsulado no Golgi, originando, assim, novas partículas virais (vírions) que serão exocitadas para o citoplasma (10,13,17).

Figura 3: Esquema representativo da replicação do SARS-CoV-2, evidenciando ligação e entrada do vírus por endocitose ou fusão de membranas (1), tradução do RNA de polaridade positiva (2), clivagem da poliproteína gerada e produção das proteínas não estruturais (3), formação do RNA subgenômico de polaridade negativa, transcrição e replicação do RNA (4), formação do RNA subgenômico de polaridade positiva, replicação e transcrição (5), tradução do RNA subgenômico de polaridade positiva e síntese das proteínas estruturais (6), formação do nucleocapsídeo (7), formação do virion, liberação dos vírions por exocitose (8)



Fonte: HARTENIAN et al., 2020.

Quando se considera os quadros clínicos as infecções por SARS-

CoV-2 podem variar de assintomático, a sintomas leves, moderados, graves ou críticos, podendo evoluir para óbito (18). Os sintomas podem ser febre, tosse, coriza, cansaço, dor de garganta, dor de cabeça, falta de ar, diarreia, vômitos, perda do paladar e/ou olfato (19,20). Sintomas inespecíficos também foram relatados (21).

O SARS-CoV-2 tem se adaptado bem ao hospedeiro, encontrando várias formas de escapar da resposta imune através de mutações ao longo das replicações. No decorrer da pandemia, algumas variantes foram consideradas de preocupação pela OMS por terem alta capacidade de transmissão ou virulência, redução na neutralização por anticorpos adquiridos por infecção natural ou vacinação, capacidade de evitar a detecção ou diminuição da eficácia terapêutica ou da vacinação, apresentando um impacto em saúde pública. As variantes que são consideradas de preocupação são: a Alfa (B.1.1.7) descoberta no Reino Unido, a Beta (B.1.351) na África do Sul, a Gamma (P.1) no Brasil, a Delta (B.1.617.2) na Índia, e, a Omicron (B.1.1.529) na África do Sul (22).

No presente momento, várias vacinas estão sendo aplicadas massivamente em todo o mundo e, como consequência quedas significativas no número de mortes, casos graves e sintomáticos estão sendo observados (23).

No contexto de diagnóstico do SARS-CoV-2, o vírus pode ser encontrado em diferentes tipos de amostras, como urina, sangue (baixa sensibilidade), aspirado brônquico, secreção anal, na secreção nasal e orofaríngea e na saliva. Apesar de ser encontrado na urina não causa sintomas no trato urinário (24,25).

Atualmente para o diagnóstico laboratorial são utilizadas diferentes técnicas: (a) baseadas na detecção do RNA do SARS-CoV-2 como a RT-qPCR (amplificação de regiões genômicas virais precedida de transcrição reversa), a RT-LAMP (amplificação isotérmica de regiões genômicas do vírus mediada por loop com transcriptase reversa), as quais são consideradas padrão ouro; (b) baseadas na detecção de anticorpos

formados contra proteínas virais, as quais detectam anticorpos IgM, IgA e/ou IgG, podendo diagnosticar doença ativa ou pregressa por metodologia de ensaio imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – ELISA) revelado por Quimioluminescência (CLIA) ou Eletroquimioluminescência (ECLIA); (c) baseadas em imunocromatografia de fluxo lateral que constituem os testes rápidos que detectam antígenos na fase aguda (26).

Com a alta transmissibilidade do SARS-CoV-2 e a necessidade de detecção do vírus na fase de replicação ou infecciosa, está indicado realizar o teste diagnóstico para a detecção do vírus sempre que houver casos suspeitos.

Durante a pandemia a demanda por testes diagnósticos que detectassem o RNA viral por RT-qPCR se elevou acima da capacidade laboratorial existente no país naquele momento. A grande limitação consiste na necessidade de laboratórios de nível de segurança NB2 com toda infraestrutura física e de equipamentos necessários à execução do exame instalados e certificados além de recursos humanos especializados na área de Biologia Molecular Diagnóstica capazes de executar e interpretar os resultados individualmente.

Embora ao longo da pandemia tenha ocorrido uma elevação gradativa do número de laboratórios capazes de executar o exame, esse número sempre se manteve inferior à necessidade real existente. A isso soma-se o fato de que o vírus atingiu todas as regiões do país, muitas das quais afastadas dos grandes centros de diagnóstico.

Assim, criou-se a necessidade de armazenar e transportar a amostra para laboratórios credenciados e habilitados na realização dos ensaios moleculares para detecção do vírus. Para realização da RT-qPCR é necessário que a amostra seja conservada a 2-8°C e processada em 72h após a coleta. Essas recomendações do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) criaram um problema logístico principalmente considerando a extensão do

território nacional que fazia com que o transporte nestas condições em tão pouco tempo fosse extremamente difícil (27). A isso soma-se o fato que muitos centros de coleta de amostras não dispõem de refrigerador para conservação da amostra até o momento da coleta (28).

Considerando todas essas dificuldades enfrentadas para viabilizar o diagnóstico do SARS-CoV-2, a utilização de outro meio para conservação do material genético do vírus torna-se fundamental na viabilização do diagnóstico de SARS-CoV-2.

Alguns poucos estudos avaliaram a ação de preservantes de RNA com o objetivo de resolução dessas questões. Um estudo avaliou a capacidade do DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), PBS (Phosphate Buffered Saline), solução salina (NaCl) 0,9% e etanol absoluto como forma de preservar o RNA viral pelo período de 72 horas e concluiu que o etanol absoluto foi o que melhor preservou o vírus, mantendo os níveis de RNA viral por mais de 72 horas (29). Um outro estudo demonstrou que o RNA humano e o SARS-CoV-2 foram preservados em etanol 95% mesmo na presença de RNaseA, uma enzima que degrada RNA (30).

No entanto, o estudo de GARNETT *et al.* 2020 utilizou vírus oriundo de cultura celular, condição muito distante da situação fisiológica real de um vírus em uma amostra biológica oriunda do paciente infectado e MINICH *et al.* 2020, por sua vez, não avaliaram a capacidade do etanol para preservar a amostra em temperatura ambiente, o que seria extremamente relevante considerando que a maioria dos centros de coleta dispõe de refrigeradores ou câmaras frias para preservar a amostra até o momento do transporte.

Considerando a carência de estudos que tragam informações sobre a preservação da amostra na condição fisiológica real a proposta deste estudo foi avaliar a capacidade do etanol para preservar amostras de secreção naso e orofaríngea coletadas por *swab* de pacientes por diferentes intervalos de tempo, armazenadas a temperatura ambiente.

6. Conclusões

- ✓ A opção mais adequada para a detecção do RNA do SARS-CoV-2 é realizar a conservação em salina fisiológica em temperatura ambiente.
- ✓ A adição de TRIzol™ e Beta-mercaptoetanol amenizam os impactos na quantificação viral acarretados pelo congelamento e descongelamento da amostra, podendo ser utilizado quando se fizer necessário ciclos de congelamento-descongelamento de amostras.
- ✓ O método “*in house*” desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu se mostrou equivalente ao comercial para análises qualitativas.

Em termos gerais, este estudo pode levar a modificações importantes nas condutas de transporte e armazenamento de amostras de secreção naso-orofaríngea para o diagnóstico de SARS-CoV-2 por meio de PCR em tempo real, contribuindo para a otimização desta logística em locais onde estes aspectos são comprometidos por diversos motivos.

7. Referências

1. Lu H, Stratton CW, Tang YW. Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: The mystery and the miracle. *Journal of Medical Virology*. 2020.
2. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020;
3. Cucinotta D, Vanelli M. WHO declares COVID-19 a pandemic. *Acta Biomedica*. 2020.
4. Saúde MDA. Boletim epidemiológico especial. 2022;
5. Boni MF, Lemey P, Jiang X, Lam TT-Y, Perry BW, Castoe TA, et al. Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic. *Nat Microbiol* [Internet]. 2020;5(11):1408–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32724171>
6. Pereira A, Tomé da Cruz KA, Sousa Lima P. PRINCIPAIS ASPECTOS DO NOVO CORONAVÍRUS SARS-CoV-2: UMA AMPLA REVISÃO. *Arq do Mudi* [Internet]. 2021 Apr 16;25(1):73–90. Available from: <https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ArqMudi/article/view/55455>
7. Wang M-Y, Zhao R, Gao L-J, Gao X-F, Wang D-P, Cao J-M. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2020;10:587269. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33324574>
8. Hussain A, Kaler J, Tabrez E, Tabrez S, Tabrez SSM. Novel COVID-19: A Comprehensive Review of Transmission, Manifestation, and Pathogenesis. *Cureus*. 2020;
9. Lima LNGC, Sousa MS de, Lima KVB. As descobertas genômicas do SARS-CoV-2 e suas implicações na pandemia de COVID-19 TT - The genomic discoveries of SARS-CoV-2 and their implications for the COVID-19 pandemic. *J Heal Biol Sci*. 2020;
10. Hartenian E, Nandakumar D, Lari A, Ly M, Tucker JM, Glaunsinger BA. The molecular virology of coronaviruses. *J Biol Chem* [Internet]. 2020;295(37):12910–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32661197>

11. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020;
12. Naqvi AAT, Fatima K, Mohammad T, Fatima U, Singh IK, Singh A, et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2020.
13. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2021;19(3):155–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33116300>
14. Cantuti-Castelvetri L, Ojha R, Pedro LD, Djannatian M, Franz J, Kuivanen S, et al. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science* [Internet]. 2020;370(6518):856–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33082293>
15. Daly JL, Simonetti B, Klein K, Chen K-E, Williamson MK, Antón-Plágaro C, et al. Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. *Science* [Internet]. 2020;370(6518):861–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33082294>
16. Mayi BS, Leibowitz JA, Woods AT, Ammon KA, Liu AE, Raja A. The role of Neuropilin-1 in COVID-19. *PLoS Pathog* [Internet]. 2021;17(1):e1009153. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33395426>
17. Romano M, Ruggiero A, Squeglia F, Maga G, Berisio R. A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping. *Cells* [Internet]. 2020;9(5). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32443810>
18. Wang Y, Wang Y, Chen Y, Qin Q. Unique epidemiological and clinical features of the emerging 2019 novel coronavirus pneumonia (COVID-19) implicate special control measures. *Journal of Medical Virology*. 2020.
19. Gu J, Han B, Wang J. COVID-19: Gastrointestinal Manifestations and Potential Fecal–Oral Transmission. *Gastroenterology*. 2020.
20. Lai CC, Shih TP, Ko WC, Tang HJ, Hsueh PR. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges.

International Journal of Antimicrobial Agents. 2020.

21. BRASIL. Protocolo de Manejo Clínico da Covid-19 na Atenção Especializada. Ministério da Saúde. 2020. 48 p.
22. Aleem A, Akbar Samad AB, Slenker AK. Emerging Variants of SARS-CoV-2 And Novel Therapeutics Against Coronavirus (COVID-19) [Internet]. StatPearls. 2022. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34033342>
23. Liu Q, Qin C, Liu M, Liu J. Effectiveness and safety of SARS-CoV-2 vaccine in real-world studies: a systematic review and meta-analysis. Infect Dis poverty [Internet]. 2021 Nov 14;10(1):132. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34776011>
24. Peng L, Liu J, Xu W, Luo Q, Chen D, Lei Z, et al. SARS-CoV-2 can be detected in urine, blood, anal swabs, and oropharyngeal swabs specimens. J Med Virol. 2020;
25. Chen L, Zhao J, Peng J, Li X, Deng X, Geng Z, et al. Detection of SARS-CoV-2 in saliva and characterization of oral symptoms in COVID-19 patients. Cell Prolif. 2020;
26. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica: Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional pela COVID-19 [Internet]. Vol. 1. 2022. 1–131 p. Available from: www.saude.gov.br
27. Centers for Disease Control and Prevention. Interim Guidelines for Collecting and Handling of Clinical Specimens for COVID-19 Testing [Internet]. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>
28. Summer S, Schmidt R, Herdina AN, Krickl I, Madner J, Greiner G, et al. Detection of SARS-CoV-2 by real-time PCR under challenging pre-analytical conditions reveals independence of swab media and cooling chain. Sci Rep [Internet]. 2021;11(1):13592. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34193912>
29. Garnett L, Bello A, Tran KN, Audet J, Leung A, Schiffman Z, et al. Comparison analysis of different swabs and transport mediums suitable for SARS-CoV-2 testing following shortages. J Virol Methods. 2020;
30. Minich JJ, Ali F, Marotz C, Belda-Ferre P, Chiang L, Shaffer JP, et al. Feasibility of using alternative swabs and storage solutions for

paired SARS-CoV-2 detection and microbiome analysis in the hospital environment. medRxiv. 2020.

31. Xiling G, Yin C, Ling W, Xiaosong W, Jingjing F, Fang L, et al. In vitro inactivation of SARS-CoV-2 by commonly used disinfection products and methods. *Sci Rep* [Internet]. 2021;11(1):2418. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33510320>
32. Takeda Y, Jamsransuren D, Makita Y, Kaneko A, Matsuda S, Ogawa H, et al. Inactivation Activities of Ozonated Water, Slightly Acidic Electrolyzed Water and Ethanol against SARS-CoV-2. *Molecules* [Internet]. 2021 Sep 8;26(18). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34576934>
33. Krafft AE, Russell KL, Hawksworth AW, McCall S, Irvine M, Daum LT, et al. Evaluation of PCR testing of ethanol-fixed nasal swab specimens as an augmented surveillance strategy for influenza virus and adenovirus identification. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2005 Apr;43(4):1768–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15814997>
34. Marchionatti A, Rodrigues FVF, Damasceno APK, ... Parâmetros para transporte e armazenamento de amostras para detecção de SARS-CoV-2 por RT-PCR. *Rev da AMRIGS* [Internet]. 2021;65(1):52–7. Available from: <https://www.amrigs.org.br/assets/images/upload/pdf/jornal/1625675724.pdf#page=54>
35. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* [Internet]. 1987 Apr;162(1):156–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2440339>
36. Mommaerts K, Sanchez I, Betsou F, Mathieson W. Replacing β -mercaptoethanol in RNA extractions. *Anal Biochem* [Internet]. 2015 Jun 15;479:51–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25841674>