

ANÁLISE DO EFEITO DAS NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA MESOPOROSA SBA-15 E SBA-16 NA DETECÇÃO DE SARS-CoV-2 POR RT-qPCR

Palavras-Chave: RT-qPCR, SARS-CoV-2, COVID-19

Autores/as:

Cynthia Mara Pereira Bezerra

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Lancellotti

INTRODUÇÃO:

Em janeiro de 2020 a OMS declarou emergência de saúde pública internacional, causada pelo vírus SARS-CoV-2. A infecção por esse vírus resulta em doença respiratória grave como pneumonia e insuficiência pulmonar, além de manifestações digestivas e sistêmicas, consistindo em febre, tosse, congestão nasal, fadiga e outros sinais de infecções do trato respiratório superior [1].

O diagnóstico é atualmente baseado principalmente em RT - PCR em tempo real (RT-qPCR) usando amostras de swabs nasais ou garganta, esse teste molecular possui alta sensibilidade e especificidade analítica. São realizados milhões de testes RT-qPCR a fim de identificar e isolar os indivíduos infectados, interrompendo assim as cadeias de transmissão e também fornecendo um tratamento para a doença o quanto antes. Com um número tão grande de testes diagnósticos feitos todos os dias é de extrema importância garantir um alto nível de qualidade nos laboratórios de teste para garantir uma precisão diagnóstica ideal e confiável [1,2]. No entanto, o teste molecular possui uma menor sensibilidade durante a fase de incubação viral. Nesse período, a taxa de falso negativos pode chegar a cerca de 68%. Após o início dos sintomas, a taxa de falso negativos cai significativamente, variando muito pouco entre o dia 1 (38%) e o ideal para o teste, dia 3 (20%) [5]. Sendo assim o ideal é que o teste seja feito na fase aguda da doença entre o primeiro ao oitavo dia do surgimento dos sintomas, visto que após esse período ocorre o aumento da produção de anticorpos e a consequente diminuição da carga viral [2].

Alguns dos fatores que podem acarretar um falso negativo são: erros laboratoriais, escolha inadequada do período de realização do teste, extração inadequada de ácido nucleico, contaminação de primers, e a insuficiência de material celular para a detecção do vírus [2,4,5,8].

Neste trabalho nosso objetivo é contornar o problema relatado acima, referente a insuficiência de material celular na detecção do vírus, para isso vamos utilizar nanopartículas de sílica mesoporosa SBA-15 e SBA-16.

As nanopartículas, SBA-15 e SBA-16 são compostos de SiO₂. O SBA-15 tem como características, presença de canais dispostos em uma estrutura hexagonal bidimensional e

morfologia macroscópica semelhante ao trigo com tamanhos médios em escala que consistem em muitos agregados semelhantes a cordas. Já o SBA-16 é um exemplo de sílica mesoporosa ordenada com uma estrutura de gaiola cúbica tridimensional com conectividade de canal tridimensional. Além disso, no SBA-16, os arranjos de poros ordenados e uniformes podem ser observados para os quais cada partícula esférica é um único cristal disposto em estrutura cúbica [9].

O uso dessas nanopartículas já foi descrito em estudos de detecção de *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae*, obtendo resultados significativos na detecção de amostras com baixa concentração bacteriana e viral [10].

Portanto, visto a necessidade de resultados confiáveis para infecção por SARS-CoV-2, principalmente em casos onde a infecção se encontra com baixa concentração viral, seja por tempo de exposição ou uso de medicamentos, esperamos contribuir com esse estudo, a fim de melhorar a confiabilidade dos testes por RT-qPCR.

METODOLOGIA:

Para iniciar as atividades laboratoriais, começamos com o ensaio de validação e padronização de qPCR para detecção de SARS-CoV-2, foi usado uma amostra de cDNA positiva para COVID-19, cedida pelo Laboratório de Estudos de Vírus Emergentes (LEVE) - IB UNICAMP, e foram usados primers para uma região de codificação do gene E, que é responsável pela proteína do envelope.

Tabela 1: Protocolo de RT-qPCR utilizado.

qPCR Master	10 μ L
RT-Mix*	0,4 μ L
Primer 1	0,08 μ L
Primer 2	0,08 μ L
CXR	0,33 μ L
H ₂ O	4,07 μ L
Nanopartícula	1 μ L
Amostra	5 μ L

*Neste protocolo não foi utilizado o RT-Mix pois utilizamos cDNA para realização específica deste teste.

Tabela 2: Informações dos Primers utilizados.

Gene E	
Oligonucleotídeo	Sequência
E-Sorbeco_F1	ACA GGT ACG TTA ATA GTT AAT AGC GT
E-Sorbeco_R2	ATA TTG CAG CAG TAC GCA CAC A

Após a realização desse primeiro teste utilizando cDNA para a reação de qPCR, partimos para o segundo passo dessa pesquisa que é foi a realização da RT-qPCR, utilizando mRNA extraído de amostras previamente detectadas como positivas para COVID-19. Utilizamos então o protocolo apresentado na tabela 1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Para realização do ensaio de validação, a qPCR foi feita da seguinte forma:

1. qPCR com SBA-15;
2. qPCR com SBA-16;
3. qPCR sem nanopartículas;
4. Controle Negativo.

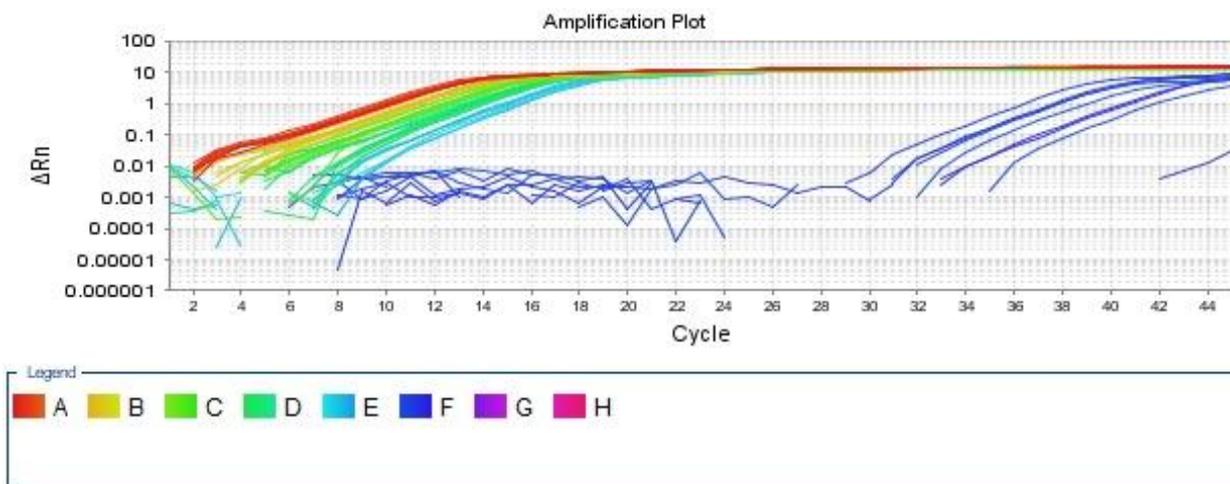


Figura 1: Ensaio de validação e padronização da qPCR para detecção de SARS-CoV-2.

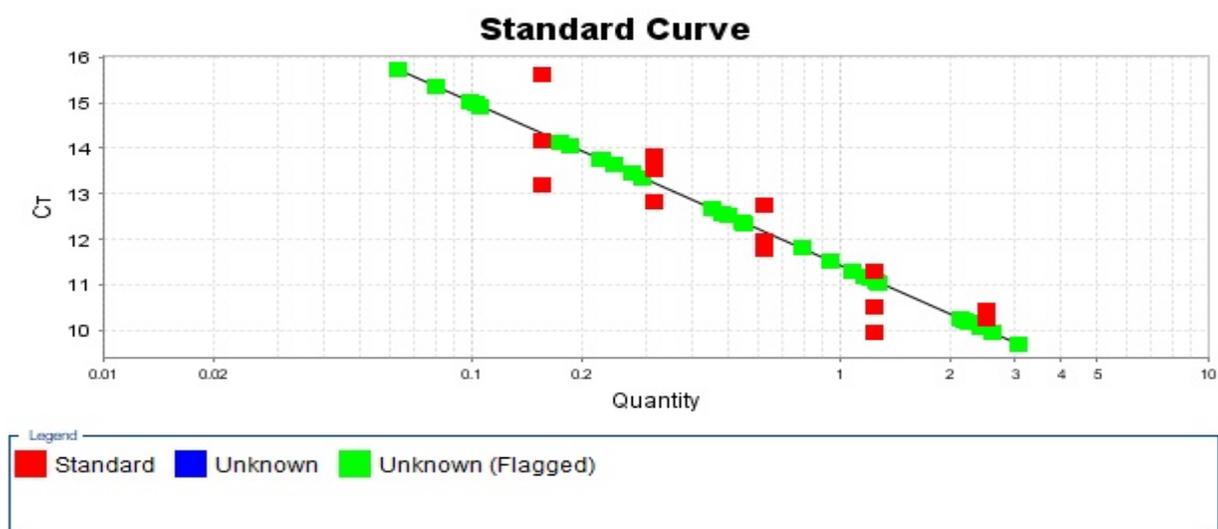


Figura 2: Curva Padrão

Podemos observar resultados melhores para as amostras que incluem o uso das nanopartículas, sendo as amostras com uso de SBA-15 as que mostraram detecção com uma quantidade menor de ciclos de quantificação (Cq).

Tendo esses resultados que nos mostraram a provável eficácia do uso de nanopartículas de sílica, seguimos com a próxima etapa desta pesquisa, que foi verificar se observamos bons resultados realizando a RT-qPCR. Pois dessa forma todo processo de detecção da infecção por SARS-CoV-2 poderia ser feita em apenas um passo.

Os resultados preliminares dessa etapa não mostraram os mesmos bons resultados que observamos na qPCR, acreditamos que possivelmente as nanopartículas não são capazes de ter a mesma interação com o mRNA, tendo em vista as diversas diferenças entre esse material genético e o cDNA.

Para os próximos passos dessa pesquisa, iremos realizar novamente os testes de RT-qPCR, porém desta vez utilizando novas amostras, a fim de entender se possivelmente tivemos interferências no teste preliminar feito.

CONCLUSÕES:

Até o momento concluímos que a utilização de nanopartículas SBA-15 e SBA-16 auxiliam na detecção de baixas concentrações de SARS-CoV-2, quando usadas na qPCR. Porém o mesmo não ocorre com RT-qPCR, acreditamos que possivelmente as nanopartículas não são capazes de ter a mesma interação com o mRNA, tendo em vista as diversas diferenças entre esse material genético e o cDNA.

BIBLIOGRAFIA

1. VELAVAN, Thirumalaisamy P.; MEYER, Christian G. The COVID-19 epidemic. **Medicina tropical e saúde internacional**, v. 25, n. 3, pág. 278, 2020.
2. DE SOUZA OLIVEIRA, Erivan; MATOS, Marcela Feitosa; DE MORAIS, Arlandia Cristina Lima Nobre. Perspectiva de resultados falso-negativos no teste de RT-PCR quando realizado tardiamente para o diagnóstico de covid-19. **InterAmerican Journal of Medicine and Health**, v. 3, p. 1-7, 2020.
3. LAN, Lan et al. Positive RT-PCR test results in patients recovered from COVID-19. **Jama**, v. 323, n. 15, p. 1502-1503, 2020.
4. TAHAMTAN, Alireza; ARDEBILI, Abdollah. Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 20, n. 5, p. 453-454, 2020.
5. MARCO ANTONIO ROCHA (PORTAL FIOCRUZ). **Covid-19: Pesquisador da Fiocruz tira dúvidas sobre testes de Covid-19**. 2021. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/covid-19-pesquisador-da-fiocruz-tira-duvidas-sobre-testes-de-covid-19#:~:text=O%20uso%20de%20um%20teste,o%20SARS%2DCoV%2D2..> Acesso em: 03 maio 2021.
6. MENEZES, Maria Elizabeth. Diagnóstico laboratorial do SARS-CoV-2 por transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). **A Tempestade do Coronavírus**, v. 52, n. 2, p. 122-30, 2020.
7. XIAO, Ai Tang; TONG, Yi Xin; ZHANG, Sheng. False negative of RT-PCR and prolonged nucleic acid conversion in COVID-19: Rather than recurrence. **Journal of medical virology**, v. 92, n. 10, p. 1755-1756, 2020.
8. WERNIKE, Kerstin et al. Pitfalls in SARS-CoV-2 PCR diagnostics. **Transboundary and emerging diseases**, 2020.
9. Hollanda, Luciana M ; Cury, Gisele CG ; Pereira, Rafaella FC ; Ferreira, Gracielle A ; Sousa, Andreza ; Sousa, Edesia MB ; Lancellotti, Marcelo. Effect of mesoporous silica under *Neisseria meningitidis* transformation process: environmental effects under meningococci transformation.. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, p. 28, 2011.
10. BERNARDES, Bruno Gaia; LANCELOTTI, Marcelo. Análise do efeito das nanopartículas de sílica mesoporosa SBA-15 e SBA-16 na detecção de *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae* biotipo aegyptius por qPCR. **Revista dos Trabalhos de Iniciação Científica da UNICAMP**, n. 26, 2018.
11. Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K., ... & Drosten, C. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. **Eurosurveillance**, 25(3), 2000045.