

Resultado falso negativo no diagnóstico molecular de SARS-CoV-2 em amostras com inibidores de amplificação

False-negative result in molecular diagnosis of SARS-CoV-2 in samples with amplification inhibitors

Marcelo Fruehwirth; Açucena V. Rivas; Andressa F. R. Fitz; Aline Cristiane C. A. Batista; Cleypson Vinicius Silveira; Robson M. Delai

Centro de Medicina Tropical da Tríplice Fronteira, Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil.

RESUMO

Introdução: Embora a reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (rRT-PCR) seja o método padrão-ouro para detecção de coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2), alguns fatores como a presença de inibidores de amplificação levam a resultados falso negativos. **Objetivo:** Descrevemos as diferenças entre os resultados de rRT-PCR para infecção por SARS-CoV-2 em amostras normais e diluídas, simulando a necessidade de diluição devido à presença de inibidores de amplificação. **Material e método:** A extração de ácido ribonucleico (RNA) viral de amostras de suabes nasofaríngeos de 20 pacientes previamente detectados como “negativos” e 21 pacientes detectados como “positivos” para SARS-CoV-2 foi realizada com *kit* o EasyExtract DNA-RNA (Interprise®). A rRT-PCR foi realizada com o *kit* OneStep/COVID-19 (IBMP), com amostras normais e diluídas (80 µl de H₂O RNase-free), totalizando 82 testes. **Resultados:** Os resultados indicam que existe uma variação média ($\alpha < 0,05$) atrasando o Cq entre os resultados de amplificação do controle interno (CI), gene *N* (GN) e ORF1ab (OF) de 1,811 Cq, 3,840 Cq e 3,842 Cq, respectivamente. **Discussão:** O *kit* de extração não purifica completamente os compostos inibidores, portanto, pode ocorrer não amplificação. Obtivemos um diagnóstico falso negativo de 19,04% após a diluição da amostra; esse processo reduz a eficiência da rRT-PCR para 29,8% na detecção de SARS-CoV-2. **Conclusão:** Conhecer os padrões da rRT-PCR de amostras diluídas pode auxiliar na identificação de casos falso negativos e, conseqüentemente, evitar um diagnóstico incorreto.

Unitermos: COVID-19; rRT-PCR; diluição; diagnóstico viral; extração de RNA.

ABSTRACT

Introduction: Although reverse transcription-polymerase chain reaction (rRT-PCR) is the gold standard method for detecting severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), some factors, such as the presence of amplification inhibitors, lead to false-negative results. **Objective:** Here we describe the differences between rRT-PCR results for SARS-CoV-2 infection in normal and diluted samples, simulating the need for dilution due to the presence of amplification inhibitors. **Material and method:** Viral ribonucleic acid (RNA) from samples of nasopharyngeal swabs from 20 patients previously detected as “Negative” and 21 patients detected as “Positive” for SARS-CoV-2 was performed with the EasyExtract DNA-RNA kit (Interprise®). The rRT-PCR was performed with the OneStep/COVID-19 kit (IBMP), with normal and diluted (80 µl of H₂O RNase free) samples, totaling 82 tests. **Results:** The results indicate that there is an average variation ($\alpha < 0.05$) delaying the Cq between the results of amplification of the internal control (IC), N gene (NG), and ORF1ab (OF), 1.811 Cq, 3.840 Cq, and 3.842 Cq, respectively. **Discussion:** The extraction kit does not completely purify the inhibitor compounds; therefore, no amplified product result may occur. In this study, we obtained a 19.04% false-negative diagnosis after sample dilution; this process reduces the efficiency of rRT-PCR to 29.8% in detecting SARS-CoV-2. **Conclusion:** Knowing the rRT-PCR standards of diluted samples can assist in the identification of false-negative cases and, consequently, avoid incorrect diagnosis.

Key words: COVID-19; rRT-PCR; dilution; viral diagnosis; RNA extraction.

RESUMEN

Introducción: Aunque la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa en tiempo real (rRT-PCR) sea el método de referencia para detección del coronavirus tipo 2 del síndrome respiratorio agudo grave (SARS-CoV-2), algunos factores como la presencia de inibidores de amplificación conducen a resultados falsos negativos. **Objetivo:** Describimos las diferencias entre los resultados de rRT-PCR para infección por SARS-CoV-2 en muestras normales y diluidas, simulando la necesidad de dilución debido a la presencia de inibidores de amplificación. **Material y método:** La extracción de ácido ribonucleico (ARN) viral de muestras de hisopos nasofaríngeos de 20 pacientes previamente detectados como “negativos” y 21 pacientes detectados como “positivos” para SARS-CoV-2 se realizó con el kit Easy Extract DNA-RNA (Interprise®). La rRT-PCR se realizó con el kit OneStep/COVID-19 (IBMP), con muestras normales y diluidas (80 µl de H₂O libre de ARNasa), totalizando 82 pruebas. **Resultados:** Los resultados indican que hay una variación media ($\alpha < 0,05$) retrasando el ciclo de cuantificación (Cq) entre los resultados de amplificación del control interno (CI), gen N (GN) y ORF1ab (OF) de 1,811 Cq, 3,840 Cq y 3,842 Cq. **Discusión:** El kit de extracción no purifica completamente los compuestos inibidores; por lo tanto, puede ocurrir no amplificación. Obtuvimos un diagnóstico falso negativo de 19,04% después de la dilución de la muestra; ese proceso reduce la eficiencia de la rRT-PCR hacia 29,8% en la detección de SARS-CoV-2. **Conclusión:** Conocer los patrones de la rRT-PCR de muestras diluidas puede ayudar en la identificación de casos falsos negativos y, por consiguiente, evitar un diagnóstico equivocado.

Palabras clave: COVID-19; rRT-PCR; dilución; diagnóstico virológico; extracción de ARN.

INTRODUÇÃO

O primeiro caso confirmado de infecção pelo novo Coronavírus 2019 (COVID-19) na América Latina ocorreu no Brasil em 25 de fevereiro de 2020⁽¹⁾. Desde então, até agosto de 2020, o Brasil registrou cerca de 4,1 milhões de casos e aproximadamente 126 mil mortes devido a COVID-19⁽²⁾.

A detecção precoce de indivíduos infectados com testagem em grande escala, o isolamento de casos rastreados, o autoisolamento preventivo de contatos próximos e o tratamento imediato de casos graves são medidas essenciais para reduzir a disseminação da síndrome respiratória aguda grave do coronavírus 2 (SARS-CoV-2)⁽³⁾.

Portanto, para diagnosticar rapidamente as infecções e mitigar a transmissão da SARS-CoV-2, a reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa em tempo real (rRT-PCR) é utilizada como método de escolha em laboratórios de pesquisa e de hospitais para identificar o vírus em amostras respiratórias, como esfregaços de escarro ou nasal, de garganta e nasofaríngeo⁽⁴⁾.

Os testes rRT-PCR normalmente levam de 4 a 6 horas para serem concluídos, com extração, amplificação e detecção de ácido ribonucleico (RNA)⁽⁵⁾. Considerando o fornecimento limitado de reagentes de extração e kits de teste em todo o mundo, os kits de extração sem purificação de RNA visam solucionar essa limitação e encurtar o tempo de extração, diminuindo o tempo de resposta^(4,5).

Porém, inibidores de amplificação, substâncias orgânicas e inorgânicas, podem estar presentes nas amostras originais

ou serem introduzidos no transporte, no processamento ou na extração do RNA das amostras, causando inibição parcial da amplificação, levando à diminuição da sensibilidade do PCR ou à inibição total e, conseqüentemente, a resultados falso negativos⁽⁶⁾.

Os kits de extração sem purificação de RNA precisam otimizar a rRT-PCR por diluição de amostra quando houver problemas com a amplificação da rRT-PCR, minimizando assim a presença de inibidores da amplificação⁽⁷⁾, permitindo a amplificação mesmo que haja inibidores ou alguma degradação da amostra, evitando a necessidade de solicitação de nova amostra ao paciente. Contudo, é necessário conhecer os padrões de amplificação diluída para evitar diagnósticos falso negativos.

Devido à gravidade da pandemia, os kits de testes foram e estão sendo desenvolvidos e aprovados rapidamente, para atender à demanda mundial por testes em grande escala; isso gera a necessidade de informações sobre dados reais sobre o uso desses kits em laboratórios de diagnóstico⁽⁸⁾. Neste estudo, descrevemos as diferenças entre os resultados da rRT-PCR para infecção por SARS-CoV-2 em amostras normais e diluídas, simulando a necessidade de diluição devido à presença de inibidores de amplificação.

MATERIAL E MÉTODO

Amostras de suabe nasofaríngeo de extração de RNA

Quarenta e uma amostras de suabes nasofaríngeos foram selecionadas de 41 pacientes internados no Hospital Ministro Costa

Cavalcanti em Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil. Desses pacientes, 20 foram previamente detectados como negativos e 21, como positivos para infecção por SARS-CoV-2 no diagnóstico por rRT-PCR. Os suabes foram armazenados em tubos com solução salina tamponada com fosfato 1× (PBS 1×), a -20°C, até a extração.

O *kit* EasyExtract de ácido desoxirribonucleico (DNA)-RNA (Interprise®), lote ITBR0720, foi validado comparando os resultados encontrados no *kit* Applied Biosystems™ MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation (Thermo Fisher Scientific®), lote 200312, com nível de significância de 1% ($n = 96$). Para a extração do RNA viral, 20 µl do reagente EasyExtract DNA-RNA (Interprise®) foram misturados com 20 µl de PBS 1× das amostras de suabes em tubos eppendorf de 1,5 ml. Os tubos foram agitados em um misturador vortex (Kasvi, K45-2810) a 1,05 rpm por 15 segundos, incubados a 95°C por 5 minutos e refrigerados a -20°C para estabilização do RNA⁽⁷⁾.

Diluição de amostras e rRT-PCR para SARS-CoV-2

As amostras foram diluídas em 80 µl de UltraPure® H₂O RNase free (1:2), totalizando 82 testes (41 amostras normais e 41 amostras diluídas).

O ensaio rRT-PCR foi realizado com o *kit* Biomol OneStep/COVID-19™ (IBMP), lote 200399Z074; 15 µl da reação rRT-PCR Mix e 5 µl da amostra de RNA purificado (da extração de RNA) ou controle negativo purificado foram pipetados para cima e para baixo para homogeneizar e, para o controle positivo, 15 µl da reação Mix foram misturados com 5 µl do controle positivo⁽⁹⁾.

A análise foi realizada no equipamento QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems (Thermo Fisher Scientific®), nas seguintes condições: i) fase de espera – 50°C por 15 minutos (um ciclo), 95°C por 3 minutos (um ciclo); ii) etapa de PCR – 95°C por 15 segundos e 55°C por 40 segundos (40 ciclos); iii) fase de espera – 25°C por 10 segundos (um ciclo). Os valores limiares do controle interno (ROX), ORF1ab (FAM) e gene *N* (HEX/VIC) foram 20.000, 30.000 e 40.000, respectivamente, com parâmetro de 5 a 15, de acordo com o protocolo do IBMP⁽⁹⁾.

Os resultados foram avaliados pelos padrões de amplificação rRT-PCR e pelos valores de amplificação e foram submetidos a análise descritiva, teste de normalidade e análise de variância (Anova), para detectar as diferenças entre os resultados antes e após a diluição.

A eficiência da rRT-PCR

As eficiências analíticas para detecção da SARS-CoV-2 a partir da metodologia normal e após diluição foram realizadas por diluição em série nas seguintes proporções: 1, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:10 (veja o Teste de eficiência a seguir). Os resultados foram avaliados por gráficos de

dispersão, e os valores de eficiência, a partir do R² da regressão linear (veja o Teste de eficiência apresentado a seguir).

RESULTADOS

Os resultados estão descritos na **Tabela**. As comparações entre os resultados da amostra diluída e não diluída indicam que há uma variação média ($\alpha < 0,05$) atrasando o Cq entre os resultados de amplificação do controle interno (CI), gene *N* (*GN*) e ORF1ab (OF) de 1,811 Cq, 3,840 Cq e 3,842 Cq, respectivamente.

As médias Cq do CI foram 29,423 para as amostras originais e 31,280 para as diluídas; para *GN*, o Cq médio do valor original foi 25,816 e 29,848 para amostras diluídas; para ORF1ab, os resultados Cq médios para amostras sem diluição foram 27,104 contra 31,138 para amostras diluídas.

Antes da diluição, as amostras 25, 26, 39 e 40 apresentaram valores inferiores ao ponto de corte estipulado para ORF1ab, sendo consideradas positivas. Após a diluição, todas elas deslocaram os valores de ORF1ab Cq para a direita e foram consideradas negativas devido a não amplificação dentro dos parâmetros de corte (**Figura 1**).

O teste de normalidade considerou valores normais para CI e *GN* ($\alpha > 0,05$), porém, para ORF1ab, os valores foram considerados fora do normal ($\alpha < 0,05$). Ao remover os *outliers*, os dados voltam ao normal, indicando que os valores de amplificação das amostras 25, 26, 39 e 40 não estão dentro da faixa esperada e que há grande variação com as demais amostras ($\alpha > 0,05$).

A eficiência de amplificação para a amostra normal foi de 99,79% para CI, 99,51% para *GN* e 97,09% para OF. Para a amostra diluída, a eficiência de amplificação foi de 98,88% para CI, 78,33% para *GN* e 67,29% para OF, indicando diminuição de 21,18% para detecção de *GN* e de 29,8% para detecção de OF.

DISCUSSÃO

O controle positivo apresentou amplificação para os três alvos avaliados em todos os testes (Cq ≤ 35), e o controle negativo não apresentou amplificação para os três alvos avaliados, conforme protocolo do fabricante da Mix, validando os resultados.

Os testes realizados para demonstrar diluições 1:2 foram de interesse para a obtenção de uma amplificação confiável em amostras com inibidores, conforme mostrado na **Figura 2**. No entanto, é importante atentar-se aos padrões da curva de resultado após a diluição.

No exemplo apresentado na Figura 2A, a amostra sem diluição não obteve amplificação dos padrões CI (Cq = valor indeterminado) e OF (Cq = valor indeterminado); o GN (Cq = 29,995) não foi definido e não apresentou curvatura exponencial

perfeita. Após a diluição (b), percebe-se perfeita amplificação dos três marcadores, indicando uma qualidade superior da amostra e ausência de inibidores. Os valores Cq das amplificações foram 29,951 para CI, 25,444 para GN e 27,579 para OF.

TABELA – Resultados da amplificação rRT-PCR Δ Cq de amostras normais e diluídas

Diagnóstico	ID da amostra	CI	CI*	GN	GN*	OF	OF*	Δ CI	Δ GN	Δ OF
Negativo	1	26,224	28,376	-	-	-	-	-2,152	-	-
	2	28,941	31,024	-	-	-	-	-2,083	-	-
	3	29,585	31,871	-	-	-	-	-2,286	-	-
	4	29,436	30,428	-	-	-	-	-0,992	-	-
	5	32,186	34,128	-	-	-	-	-1,942	-	-
	6	30,660	32,673	-	-	-	-	-2,013	-	-
	7	27,193	29,721	-	-	-	-	-2,528	-	-
	8	29,451	31,890	-	-	-	-	-2,439	-	-
	9	29,092	31,230	-	-	-	-	-2,138	-	-
	10	25,364	27,492	-	-	-	-	-2,128	-	-
	11	30,608	32,700	-	-	-	-	-2,092	-	-
	12	29,246	31,522	-	-	-	-	-2,276	-	-
	13	30,690	32,037	-	-	-	-	-1,347	-	-
	14	28,590	30,194	-	-	-	-	-1,604	-	-
	15	27,598	28,500	-	-	-	-	-0,902	-	-
	16	27,651	29,382	-	-	-	-	-1,731	-	-
	17	28,691	30,320	-	-	-	-	-1,629	-	-
	18	25,980	27,693	-	-	-	-	-1,713	-	-
	19	28,382	31,124	-	-	-	-	-2,742	-	-
	20	27,813	29,600	-	-	-	-	-1,787	-	-
Positivo	21	28,941	30,974	21,011	24,046	19,121	21,320	-2,033	-3,035	-2,199
	22	27,536	29,633	19,276	22,270	24,767	27,180	-2,097	-2,994	-2,413
	23	29,052	31,038	22,909	24,030	27,013	29,706	-1,986	-1,121	-2,693
	24	29,668	31,944	17,969	23,490	25,689	28,211	-2,276	-5,521	-2,522
	25	29,488	32,191	21,520	35,000	28,990	40,000	-2,703	-13,480	-11,010
	26	30,437	32,970	20,175	32,377	28,299	40,000	-2,533	-12,202	-11,701
	27	28,067	29,983	23,868	28,955	24,136	26,759	-1,916	-5,087	-2,623
	28	22,793	23,674	24,278	25,226	25,345	26,093	-0,881	-0,948	-0,748
	29	23,423	25,454	21,491	24,937	21,280	25,490	-2,031	-3,446	-4,210
	30	26,926	28,030	17,773	21,417	17,873	21,780	-1,104	-3,644	-3,907
	31	30,772	30,907	31,018	31,312	29,833	31,767	-0,135	-0,294	-1,934
	32	28,332	30,406	24,273	27,285	23,178	25,684	-2,074	-3,012	-2,506
	33	27,453	28,774	28,912	30,416	27,939	29,197	-1,321	-1,504	-1,258
	34	29,475	30,981	24,052	25,287	23,684	24,918	-1,506	-1,235	-1,234
	35	32,237	32,427	27,702	31,440	27,225	30,644	-0,190	-3,738	-3,419
	36	26,155	28,695	27,684	31,167	27,783	30,702	-2,540	-3,483	-2,919
	37	29,219	31,453	27,088	30,406	26,308	29,036	-2,234	-3,318	-2,728
	38	28,364	30,639	24,162	28,913	24,462	27,117	-2,275	-4,751	-2,655
	39	31,006	32,548	32,500	35,380	32,914	40,000	-1,542	-2,880	-7,086
	40	31,776	32,410	34,074	35,756	32,333	40,000	-0,634	-1,682	-7,667
	41	32,434	34,160	24,577	27,840	23,906	27,165	-1,726	-3,263	-3,259

As variações foram calculadas considerando os valores das amostras originais como o Cq verdadeiro.

*amostras diluídas em 80 μ l; CI: controle interno Cq; GN: gene N Cq; OF: ORF1ab Cq; Δ : variação Cq. Em negrito estão as amostras falso negativas após diluição.

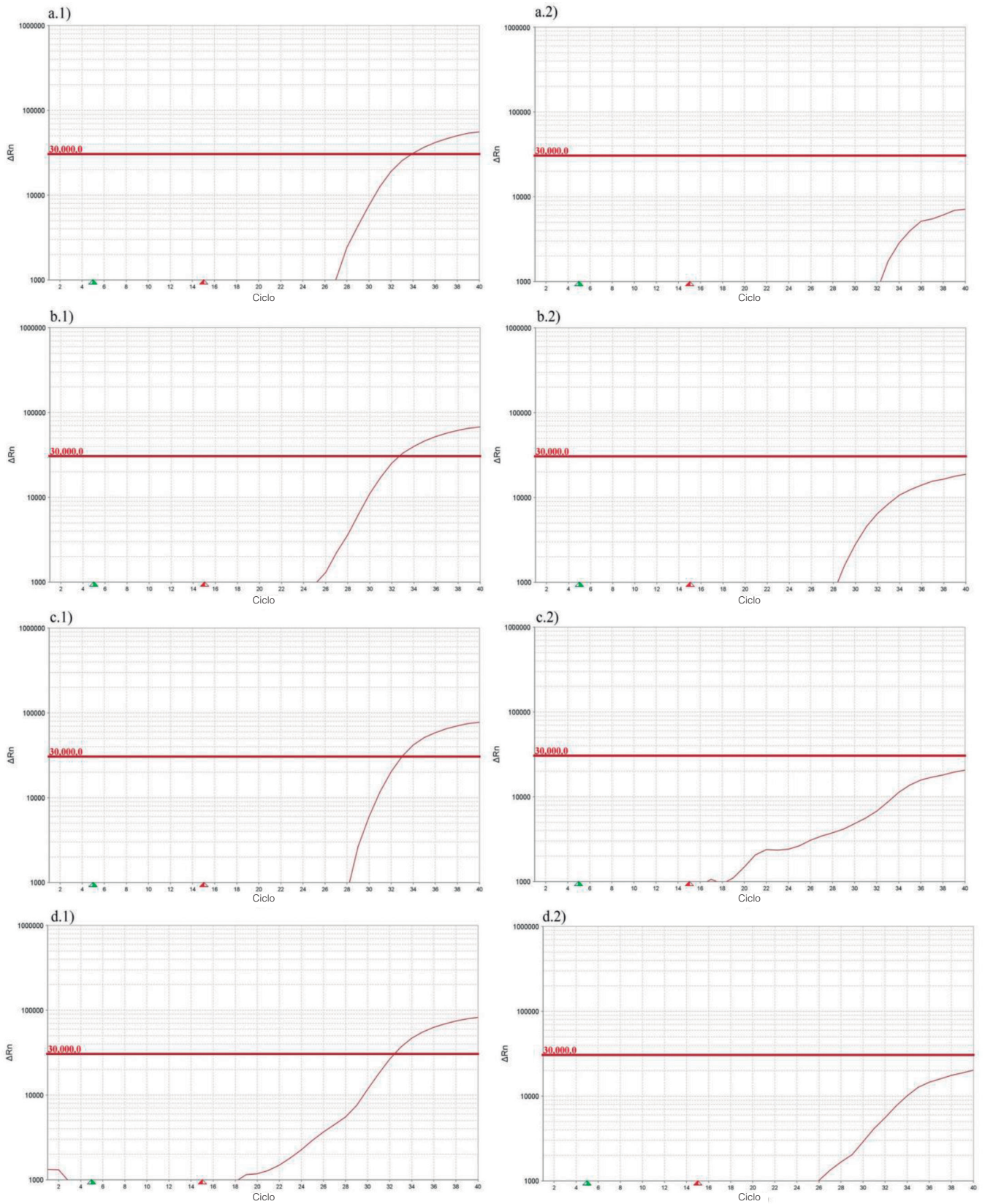


FIGURA 1 – Amplificação do ORF1ab das amostras 25 (a), 26 (b), 39 (c) e 40 (d) antes (.1) e após (.2) diluição

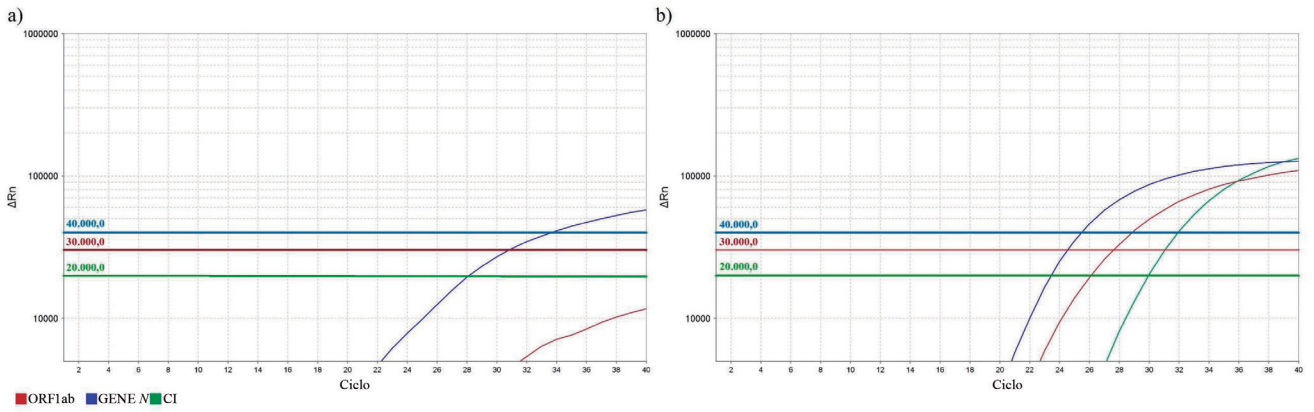
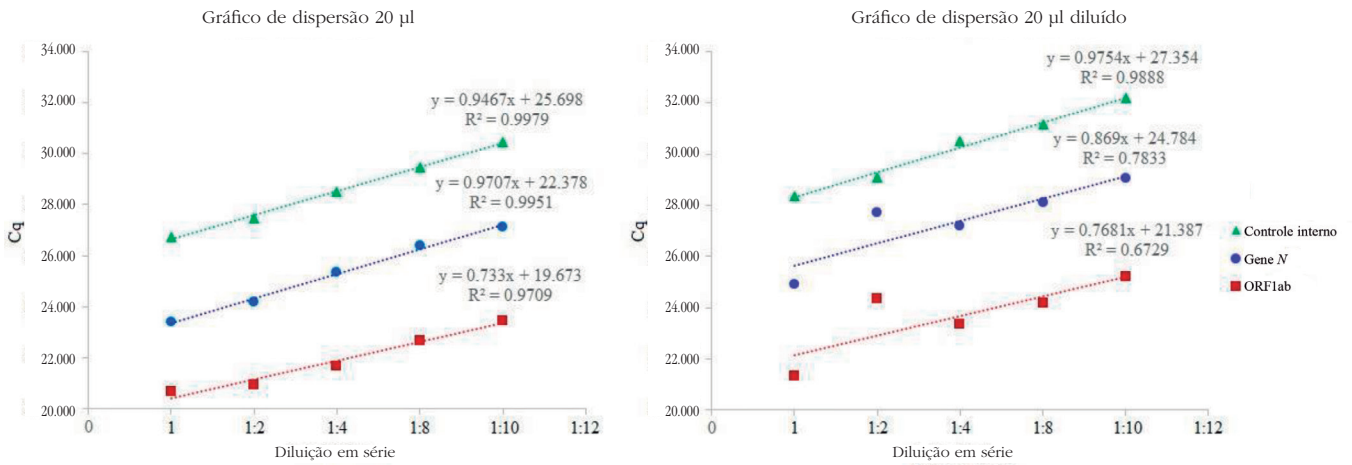
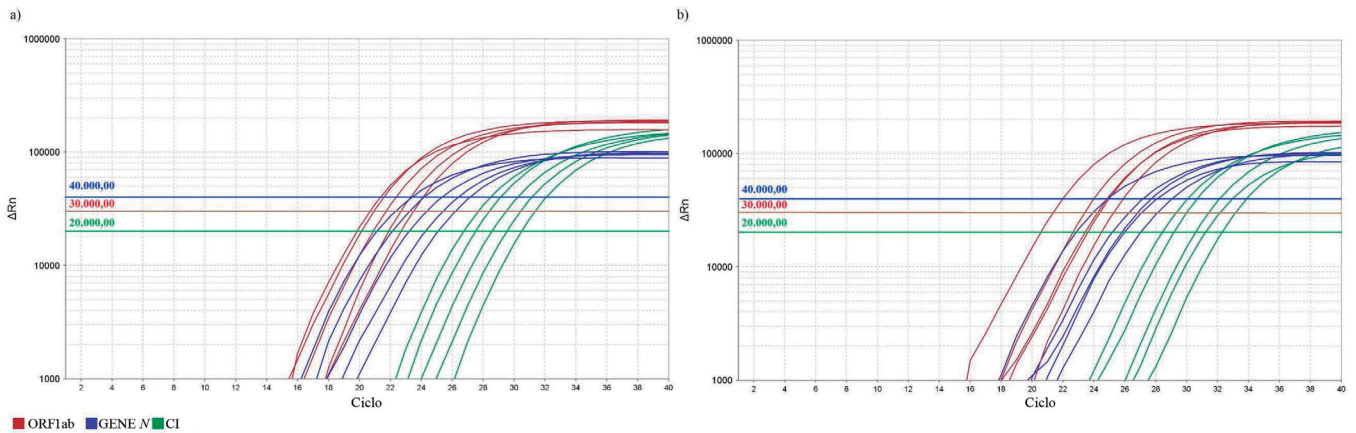


FIGURA 2 – Diferenças nos padrões de amplificação de uma amostra com inibidores antes (a) e após (b) diluição



Teste de eficiência



Curvas de eficiência

Em casos como na Figura 2, apenas a diluição é suficiente para diagnosticar a amostra como positiva, o que evita novo estresse para o paciente ao refazer a coleta e nova exposição do profissional de saúde; o paciente infectado será encaminhado para o local correto de tratamento em um curto período de tempo entre a coleta e o diagnóstico. Porém, nos casos em que o resultado após a diluição é negativo, uma série de cuidados deve ser tomada ao liberar o diagnóstico, como as características da curva; o gráfico deve ser avaliado por completo e não apenas os valores que ultrapassaram o Cq.

De acordo com o manual Thermo Fisher®, considerando uma eficiência de processo de 100%, existe uma variação conhecida no Cq quando a amostra é diluída, sendo variável de acordo com a proporção da diluição. Essa variação de diluição pode ser $\Delta Cq = 1$ de 1:2, $\Delta Cq = 2$ de 1:4, $\Delta Cq = 3$ a 1:8 e $\Delta Cq = 3,3$ de 1:10. No entanto, esses valores variam de acordo com a eficiência do processo e a presença de inibidores⁽¹⁰⁾, o que pode resultar em diagnóstico falso negativo em amostras de baixa carga viral, dependendo do valor utilizado como parâmetro para distinguir entre positivo e negativo.

As amostras positivas testadas que apresentaram resultados divergentes após a diluição obtiveram valores de ΔCq entre 28 e 33, o que não deve torná-las negativas após a diluição, mesmo com baixa eficiência no processo de amplificação, visto que houve uma variação entre 8 e 12 Cq (Figura 1). Considerando a progressão da ΔCq de acordo com as diluições maiores, a diluição proposta pelo fabricante do *kit* de extração de RNA viral (1:10) não seria de interesse, pois, teoricamente, 1:10 faria com que os valores de Cq fossem ainda mais tardios. Testes maiores que envolvem diluições menores podem ser realizados, verificando em qual proporção não haveria diferenças significativas nos valores de Cq e eficácia na diluição dos inibidores de rRT-PCR.

A importância da realização de rRT-PCR em *kits* que fornecem marcação CI já foi relatada por Kim *et al.* (2016)⁽¹⁰⁾, gerando resultados conclusivos sobre o processo de extração, evitando a liberação de resultados falso negativos em amostras que não foram amplificadas com precisão, uma vez que a interpretação dos resultados nem sempre é simples. A sensibilidade da rRT-PCR é afetada negativamente por compostos presentes na amostra clínica que podem inibir parcial ou completamente a química da rRT-PCR⁽¹¹⁻¹⁵⁾.

Os protocolos com etapas de purificação podem evitar a presença de inibidores da amplificação, removendo potenciais inibidores endógenos da rRT-PCR, como detergentes, compostos quelantes e guanidina-HCl^(11, 13, 16-19). A eficiência da remoção de inibidores em amostras de pacientes pode estar relacionada com

as propriedades intrínsecas do método utilizado para extrair o RNA⁽²⁰⁾, o que não ocorre com o *kit* utilizado neste estudo. O *kit* Easy Extract™ não purifica completamente os compostos inibidores, o que reduz significativamente o tempo de extração; no entanto, pode ocorrer não amplificação por inibidores.

Um erro de diagnóstico pode levar pacientes infectados para áreas de não COVID-19, com risco subsequente de infecção para outras áreas; ou levar pacientes SARS-CoV-2 negativos para áreas de COVID-19⁽²¹⁾, gerando uma possível contaminação de indivíduos não infectados e também a disseminação de vírus nas áreas desinfetadas de hospitais e centros de tratamento, contaminando os profissionais de saúde. Conhecer os padrões da rRT-PCR de amostras diluídas pode auxiliar na identificação de casos falso negativos e, conseqüentemente, evitar um diagnóstico incorreto.

CONCLUSÃO

A diluição 1:2 da amostra com inibidores em UltraPure® H₂O RNase free gerou amplificação em 100% dos casos testados, sendo uma alternativa para evitar nova coleta de amostra do paciente. No entanto, ressaltamos que neste estudo obtivemos 19,04% de diagnóstico falso negativo após a diluição da amostra; esse processo reduz a eficiência da rRT-PCR para 29,8% na detecção de SARS-CoV-2. É possível inferir que a diluição auxilia nos casos em que uma nova coleta de amostra não é viável, mas é preciso cautela na avaliação do resultado da rRT-PCR.

É importante avaliar o padrão das curvas de amplificação após a diluição para evitar diagnósticos imprecisos. Se a amostra com inibidores for positiva com carga viral elevada, o resultado será confiável se a amplificação de CI e GV ocorrer até Cq 30 e ORF1ab até Cq 35. No caso de não amplificação da curva GV e ORF1ab após diluição, recomendamos avaliar a necessidade de coleta de nova amostra e nova análise.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

AGRADECIMENTOS

À Itaipu Binacional, à Fundação Itaipuapy e ao Hospital Ministro Costa Cavalcanti pelo apoio.

REFERÊNCIAS

- Rodriguez-Morales AJ, Gallego V, Escalera-Antezana JP, et al. COVID-19 in Latin America: the implications of the first confirmed case in Brazil. *Travel Med Infect Dis.* 2020; 35: 101613.
- Brasil. Ministério da Saúde. Painel Coronavírus [atualizado: 31 de agosto de 2020]. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/>. [acessado em: 31 de agosto de 2020].
- World Health Organization (WHO). Novel coronavirus (2019-nCoV): situation report, 12. World Health Organization. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/330777>. [acessado em: 31 de agosto de 2020].
- Wee SK, Sivalingam SP, Yap EPH. Rapid direct nucleic acid amplification test without RNA extraction for SARS-CoV-2 using a portable PCR thermocycler. *Genes.* 2020; 11(6): 664.
- Sheridan C. Fast, portable tests come online to curb coronavirus pandemic. *Nat Biotechnol.* 2020; 38: 515-18.
- Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, John R. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol.* 2012; 113(5): 1014-26.
- Interprise. Protocolo de sugerido para extração de RNA viral. Disponível em: <https://interprise.com.br/easyextract/#protocolo-sugerido-para-extracao-de-rna-viral>. [acessado em: 31 de agosto de 2020].
- Smith E, Zhen W, Manji R, et al. Analytical and clinical comparison of three nucleic acid amplification tests for SARS-CoV-2 detection. *J Clin Microbiol.* 2020; 58(9): e01134-20.
- Instituto de Biologia Molecular do Paraná. Instruções de uso kit Biomol OneStep/COVID-19 Kit. Disponível em: http://www.ibmp.org.br/pt-br/wp-content/uploads/2020/05/Instru%C3%A7%C3%A3o-de-Usa-Kit-BIOMOL-OneStep_COVID-19-rev-02.pdf. [acessado em: 31 de agosto de 2020].
- Kim MN, Ko JY, Seong MW, et al. Analytical and clinical validation of six commercial Middle East Respiratory Syndrome coronavirus RNA detection kits based on real-time reverse-transcription PCR. *Ann Lab Med.* 2016; 36(5): 450-56.
- Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol.* 2020; 63: 3741-51.
- Valentine-Thon E. Quality control in nucleic acid testing--where do we stand? *J Clin Virol.* 2002; 25: 13-21.
- Dreier J, Stormer M, Kleesiek K. Use of bacteriophage MS2 as an internal control in viral reverse transcription-PCR assays. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 4551-57.
- Das A, Spackman E, Pantin-Jackwood MJ, Suarez DL. Removal of real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) inhibitors associated with cloacal swab samples and tissues for improved diagnosis of Avian influenza virus by RT-PCR. *J Vet Diagn Invest.* 2009; 21: 771-78.
- Kern M, Böhm S, Deml L, Wolf H, Reischl U, Niller HH. Inhibition of *Legionella pneumophila* PCR in respiratory samples: a quantitative approach. *J Microbiol Methods.* 2009; 79: 189-93.
- Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A, et al. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 995-98.
- Al-Soud WA, Jonsson LJ, Radstrom P. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 345-50.
- Oikarinen S, Tauriainen S, Viskari H, et al. PCR inhibition in stool samples in relation to age of infants. *J Clin Virol.* 2009; 44: 211-14.
- Burd EM. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 2010; 23: 550-76.
- Anwar A, Wan G, Chua K, August JT, Too H. Evaluation of preanalytical variables in the quantification of dengue virus by real-time polymerase chain reaction. *J Mol Diagn.* 2009; 11: 537-42.
- Williams TC, Wastnedge E, McAllister G, et al. Sensitivity of RT-PCR testing of upper respiratory tract samples for SARS-CoV-2 in hospitalised patients: a retrospective cohort study. *medRxiv.* 2020.

AUTOR CORRESPONDENTE

Marcelo Fruehwirth  0000-0002-8548-3798
e-mail: marcelo.fruehwirth@hmcc.com.br



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.