

# Diagnóstico molecular falso-negativo de SARS-CoV-2 em amostras com inibidores de amplificação

Marcelo Fruehwirth<sup>1</sup>, Açucena Veleh Rivas<sup>1</sup>, Andressa Faria Rahyn Fitz<sup>1</sup>, Aline C. Cechinel Assing Batista<sup>1</sup>, Cleypson Vinicius Silveira<sup>1</sup>, Alcina M. Rodrigues Fresta<sup>1</sup>, Marcia de Barros Moura<sup>1</sup>, Robson M. Delai<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Medicina Tropical da Tríplice Fronteira, Fundação de Saúde Itaipuapy, Foz do Iguaçu, PR, Brasil

## Introdução

Apesar da rRT-PCR ser o método padrão ouro, alguns fatores, como a presença de inibidores de amplificação acarretam em resultados falsos negativos (ALCOBA-FLOREZ et al., 2020; WANG et al., 2020). O objetivo foi verificar diferenças entre os resultados de rRT-PCR para SARS-CoV-2 de amostras normais e diluídas, simulando à presença de inibidores de amplificação.

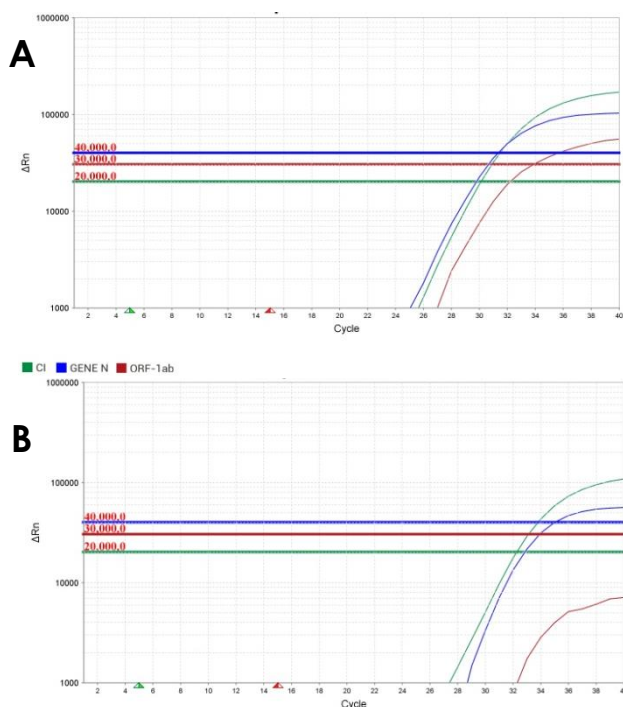
## Materiais e Métodos

Foram extraídos RNA viral de swabs de 41 pacientes em internamento, com o reagente *EasyExtract™ DNA-RNA* (Interprise®) (validado com o kit *MagMAX™ Viral/Pathogen*), conforme protocolo do fabricante. A rRT-PCR foi realizada utilizando o kit *OneStep/COVID-19* (IBMP) com amostras extraídas e diluídas em 100µl de H<sub>2</sub>O RNase free, totalizando 82 testes.

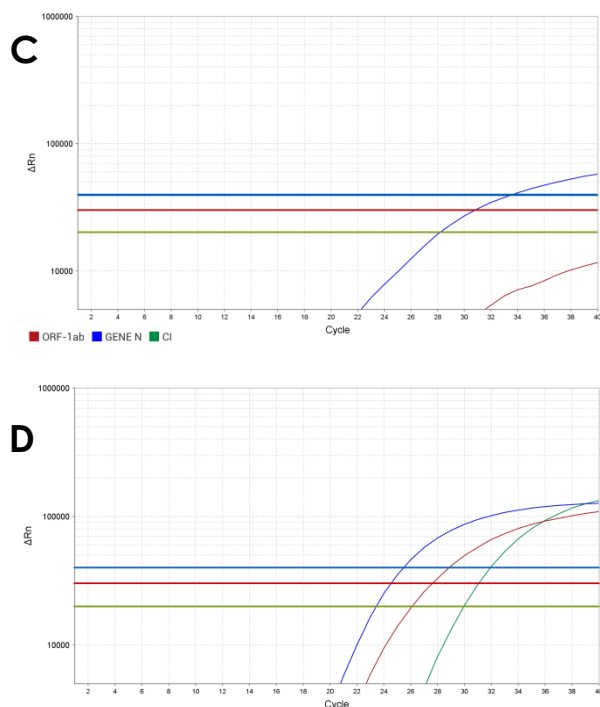
## Resultados

Não houve diferença estatística entre a diluição proposta pelo fabricante (1:10) e os 100µl utilizados ( $\alpha > 0,05$ ; N=96). As comparações entre resultados de amostras diluídas e não diluídas indicam que existe variação ( $\alpha < 0,05$ ) entre os resultados da amplificação do Controle Interno (CI), Gene N (GN) e ORF-1ab (OF), de 1,811Ct, 3,840Ct e 3,842Ct, respectivamente.

**Figura 1** – Amplificação de um amostra positiva sem diluição (A) e após diluição (B)



**Figura 2** – Amplificação de um amostra com inibidores (C) e após diluição (D)



## Discussão

Os resultados demonstram que a diluição pode resultar em falsos negativos em amostras de baixa carga viral (Figura 1). Nos casos onde há presença de inibidores e a rRT-PCR é prejudicada, a diluição é uma alternativa para evitar coleta e novo estresse do paciente, que caso seja positivo com alta carga viral, o resultado será confiável se a amplificação do CI e GN ocorrer até o ciclo 30 e OF até o 35 (Figura 2).

## Conclusão

Deve-se atentar para o padrão de resultado após a diluição, já que em amostras com resultado conhecido e amplificação posterior ao ciclo 28 da rRT-PCR houve falso negativo.

### Referências Bibliográficas

WANG, X. et al. Limits of Detection of 6 Approved RT-PCR Kits for the Novel SARS-Coronavirus-2 (SARS-CoV-2). *Clin. chem.*, v.66, n.7, p.977, 2020.  
ALCOBA-FLOREZ, J., et al. Sensitivity of different RT-qPCR solutions for SARS-CoV-2 detection. *Int J Infect Dis.* 2020. <https://www.doi.org/10.1016/j.ijid.2020.07.058>