



O farmacêutico no diagnóstico molecular do SARS-CoV-2 na costa do descobrimento e no extremo sul da Bahia

RESUMO

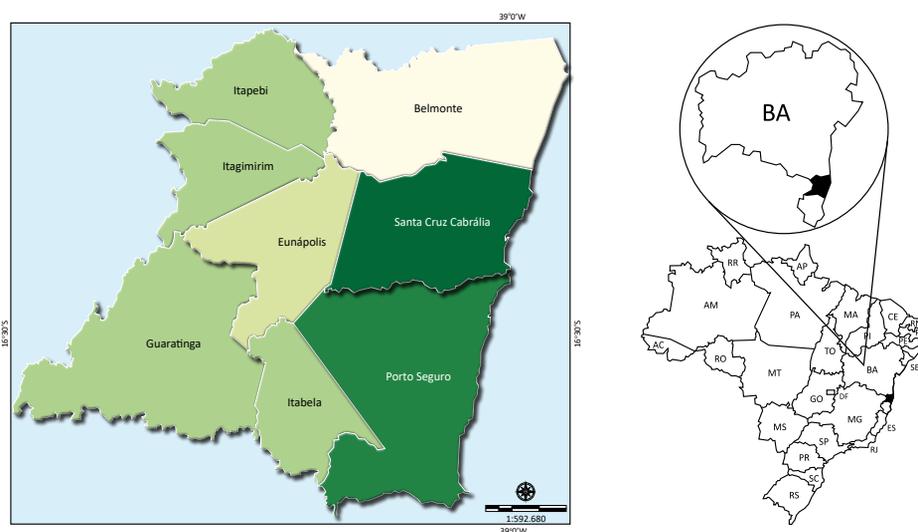
O surgimento e a rápida disseminação do vírus SARS-CoV-2, microrganismo causador da doença Covid-19, na cidade de Wuhan na China, representa uma crise de saúde que foi declarada pandêmica em 11 de março de 2020. No mesmo mês, a cidade de Porto Seguro, situada na Costa do Descobrimento e localizada na região sul da Bahia, contabilizava seus primeiros habitantes com diagnóstico da doença. A técnica padrão-ouro utilizada no diagnóstico laboratorial é o RT-PCR, que detecta a presença do material genético do vírus. A técnica possui algumas limitações: é mais lenta, exige profissionais altamente qualificados e requer aparelhos especializados. A carência de farmacêuticos com habilidades nas técnicas de biologia molecular para atuar no diagnóstico, na pandemia, motivou o desenvolvimento deste trabalho. Além do diagnóstico laboratorial, foram observadas as características clínicas dos cidadãos porto-segurenses infectados, que tiveram o diagnóstico confirmado pela técnica de RT-PCR. O maior percentual de amostras positivas foi entre os pacientes de 30 e 59 anos (70,3%) e o sintoma simultâneo mais comum foi a tosse (61,2%). No início da pandemia, não estava definida a correlação entre sinais, sintomas e o diagnóstico da doença, o que ressalta a grande relevância deste trabalho, e destaca a importância do farmacêutico frente ao diagnóstico laboratorial do SARS-CoV-2.

CARACTERIZAÇÃO

O sul da Bahia é dividido em três microrregiões: Litoral Sul, Costa do Descobrimento e Extremo Sul. A Costa do Descobrimento (Figura 1) ocupa uma área territorial de 12.130,20 km², sendo formada por oito municípios, que totalizam uma população de 343.347 habitantes. Já o Extremo Sul (Figura 2) ocupa uma área de 18.535,98 km² e possui treze municípios, com uma população de 416.859 habitantes (IBGE, 2010).

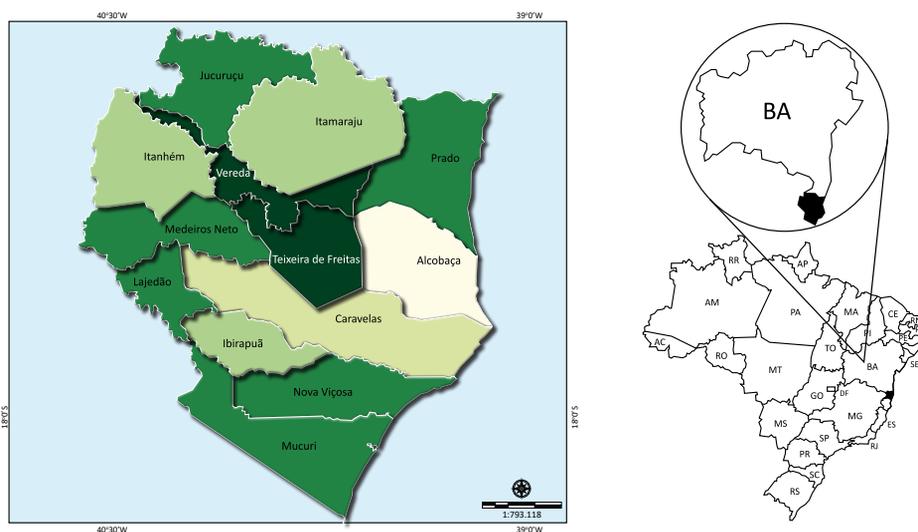
Essas duas microrregiões em estudo são conhecidas por suas belezas litorâneas e pela história da colonização do país, mas, também, por terem uma economia voltada à produção do eucalipto e, principalmente, para o turismo. O aeroporto de Porto Seguro é um dos mais movimentados do Nordeste, e a rede hoteleira da cidade está entre as maiores do Brasil. Os 21 municípios que integram as duas microrregiões contam com razoável infraestrutura, destacando-se o acesso pela BR-101, que constitui a principal rodovia (BAHIA, 2015).

Figura 1. Costa do Descobrimento – Bahia.



Fonte: Base Cartográfica: IBGE, 2006; Base Territorial: DETER/SDT/MDA; Elaboração: CGMA/SDT/MDA, março/2015.

Figura 2. Extremo Sul – Bahia.



Fonte: Base Cartográfica: IBGE, 2006; Base Territorial: DETER/SDT/MDA; Elaboração: CGMA/SDT/MDA, março/2015.

Perfil epidemiológico

A Covid-19 é um importante problema de saúde pública de interesse internacional (MEO, 2020; ZHU, 2020). Desde o registro do primeiro caso no Brasil, em 26 de fevereiro de 2020, e conforme noticiado pelos principais telejornais brasileiros, o suposto estopim da disseminação do vírus Sars-CoV-2 em Porto Seguro ocorreu em 12 de março de 2020, quando um turista contaminado transmitiu o vírus a amigos e a funcionários de um condomínio de luxo no distrito de Trancoso. Um mês depois, o município contabilizava 12 casos confirmados e, no mês seguinte, 45 moradores contaminados. Em janeiro de 2021, já eram 9.036 casos confirmados no município terra mãe do Brasil e 4.841 em Teixeira de Freitas. Atualmente, apesar de ser a menor parte dos territórios baianos, os 21 municípios do Extremo Sul e da Costa do Descobrimento têm 80.896 mil casos confirmados do SARS-CoV-2 (BAHIA, 2021).

Estrutura da saúde pública regional

Durante o pico da epidemia da Covid-19, os municípios que fazem parte da Costa do Descobrimento e do Extremo Sul da Bahia só tinham dois hospitais com estrutura para receber pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, o Hospital Regional Deputado Luís Eduardo Magalhães, em Porto Seguro (Costa do Descobrimento), e o Hospital Municipal, em Teixeira de Freitas (Extremo Sul). Em meados de junho de 2020, este município ainda recebeu um hospital de campanha, com unidade de terapia intensiva, ampliando para 20 os leitos voltados exclusivamente aos pacientes com a Covid-19 (Foto 1). Recentemente, em junho de 2021, um hospital de referência contra a Covid-19 foi inaugurado em Arraial d'Ajuda, distrito pertencente ao município de Porto Seguro. A unidade dispõe de oito leitos de internação, sete leitos de suporte ventilatório e um leito de estabilização.

Para auxiliar no diagnóstico laboratorial da Covid-19, a Bahia possui o Laboratório Central de Saúde Pública (Lacen). Em 2020, o Lacen completou 105 anos de história, sendo reconhecido como a 3ª maior unidade de vigilância laboratorial do país. Atualmente, dispõe de 26 laboratórios, sendo uma unidade central com gestão estadual, sediada em Salvador, e 12 laboratórios descentralizados, entre estes, um em Porto Seguro e outro em Teixeira de Freitas. Vale ressaltar que apenas o laboratório de Porto Seguro, no ápice da pandemia, realizava o diagnóstico molecular do SARS-CoV-2 em toda região sul da Bahia.



Foto 1. Hospital de Campanha – Teixeira de Freitas/BA.
Crédito: Sesab/Divulgação.



Foto 2. Hospital de campanha – Porto Seguro/BA.
Crédito: Acervo pessoal.

RELATO DA EXPERIÊNCIA

Introdução

Em maio de 2020, com aumento significativo de casos confirmados de Covid-19 no interior da Bahia, principalmente em Porto Seguro e Teixeira de Freitas, o governo do estado resolveu descentralizar o diagnóstico laboratorial, inserindo, em Porto Seguro, um laboratório de biologia molecular subordinado ao Lacen municipal. O exame considerado padrão-ouro no diagnóstico da Covid-19 é o RT-PCR, sigla para reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase. A análise do material coletado de secreções, preferencialmente obtidas de raspado de nasofaringe, permite detectar o vírus com altíssima precisão nos primeiros dias dos sintomas. Antes, os testes eram feitos apenas em Salvador, e com a alta demanda do estado, os resultados demoravam até 15 dias para chegar nos municípios do interior.

Com o objetivo de ajudar na descentralização e dar mais celeridade na realização de testes de Covid-19 na Costa do Descobrimento, auxiliando também o Extremo Sul do estado, a Prefeitura Municipal de Porto Seguro abriu edital para contratação de um farmacêutico-bioquímico para trabalhar no diagnóstico laboratorial da Covid-19.

A realidade encontrada pela Prefeitura Municipal durante o processo seletivo foi a carência de farmacêuticos qualificados com experiência em biologia molecular, mais precisamente com a técnica de RT-PCR. Selecionado o profissional, foram oito meses de dedicação e trabalho exaustivo e solitário na banca do laboratório de biologia molecular, extraíndo o RNA viral, sintetizando o cDNA e amplificando a região de interesse do vírus SARS-CoV-2 (Foto 3), para assim liberar os laudos com mais rapidez aos municípios da região.

Além de liberar um laudo altamente seguro e fidedigno à realidade viral do paciente, foram inseridas, nas observações, a carga viral do paciente com explicações claras para uma conduta médica segura, procedimento este pouco utilizado pelos analistas clínicos de outras regiões brasileiras. Foram necessárias horas extras aos sábados e domingos em razão da urgência para liberação dos velórios de pacientes sob suspeita de contágio.



Foto 3. Farmacêutico Dr. Juliano Santana, antes de iniciar o procedimento de extração do RNA do vírus SARS-CoV-2.

Crédito: Acervo pessoal.

Diante do cenário brasileiro e da carência de informações sobre os sintomas dos pacientes positivos para Covid-19, foi realizado um estudo pioneiro,

exclusivamente no município de Porto Seguro, para descrever o comportamento do vírus na saúde da população.

Metodologia

Trata-se de um estudo transversal, com dados das notificações de 219 pacientes diagnosticados com Covid-19, pela técnica de RT-PCR, entre os meses de junho a agosto de 2020, no Laboratório Municipal de Referência Regional de Porto Seguro (BA). Neste grupo de pacientes, foram inseridos indígenas, presidiários e moradores dos bairros e da região central do município.

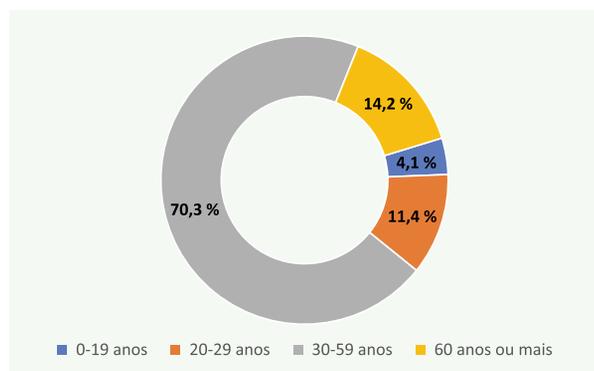
Após a coleta da amostra biológica pelos técnicos em análises clínicas, o material foi encaminhado para a extração do RNA viral. Um extrator automatizado de RNA foi utilizado com auxílio do Kit Veri-Q PREP M16. Para a construção do cDNA e amplificações dos genes de interesse (ORF3a e gene N), foi utilizando o Kit Veri-Q PCR 316 nCoV-QS (Mico Biomed Co. Ltda). Este sistema é baseado no método de detecção pela enzima TaqMan® (Livak, 1995), que utiliza uma sonda específica para o gene de interesse (Sars-CoV-2), a ser amplificado entre dois *primers* – *forward* e *reverse* (JOSEFSEN, 2012).

Os equipamentos foram fornecidos pelo governo do estado da Bahia e os reagentes foram financiados pela Secretaria Municipal de Saúde de Porto Seguro. Todas as análises foram realizadas com controle interno, controle positivo e negativo. Para realizar a análise dos dados clínicos foram utilizadas notificações dos pacientes provenientes das unidades de saúde e hospitais do município.

Resultados

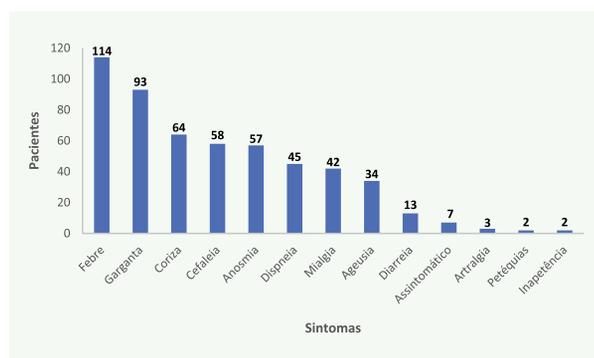
Pela técnica de RT-PCR, foram confirmados mais dois mil casos de Covid-19, em amostras provenientes de municípios da Costa do Descobrimento e no Extremo Sul da Bahia, entre junho/2020 e Janeiro/2021. Contudo, este trabalho se baseia apenas nas notificações de 219 pacientes do município de Porto Seguro. Destes, a maioria era do sexo feminino (n=146; 66,7%). Como pode ser observado no gráfico 1, o maior percentual de amostras positivas foi verificado entre os pacientes de 30 e 59 anos (70,3%). Em seguida vieram os idosos com 60 anos ou mais (14,2%), adultos de 20 a 29 anos (11,4%) e as crianças e adolescentes entre 4 e 19 anos (4,1%).

Gráfico 1. Grupos de pacientes distribuídos em faixas etárias com diagnóstico de Covid-19.



Conforme demonstrado no gráfico 2, entre os diversos sintomas simultâneos, os mais comuns foram tosse (61,2%), febre (52,1%), dor de garganta (42,5%), seguidos por coriza (29,2%), cefaleia (26,5%), anosmia (26,0%) e dispneia (20,5%).

Gráfico 2. Relatos de sintomas simultâneos dos 219 pacientes com diagnóstico de Covid-19.



É válido mencionar que 28 (12,8%) pacientes relataram perdas de paladar e olfato simultâneas, no início do quinto dia após os primeiros sintomas. Ainda, duas (0,9%) pacientes do sexo feminino apresentaram petéquias nas pernas e braços, e no diagnóstico diferencial para dengue, chikungunya e zika, os resultados foram negativos (DIAZ-GUIMARAENS, 2020). Atualmente, há vários casos descritos na literatura de pacientes com Covid-19 com problemas dermatológicos (WOLLINA, 2020; SACHDEVA, 2020; SANCHEZ, 2020). As manifestações cutâneas, que incluem petéquias em pacientes com Covid-19, já foram descritas em adultos e em crianças (GOTTLIEB, 2020; KLIMACH, 2020).

Próximos passos, desafios e necessidades

As técnicas moleculares utilizadas para a identificação do SARS-CoV-2 são diferentes, em comparação aos exames convencionais. Os profissionais que atuam nesta área possuem, mais frequentemente, titulações acadêmicas e experiência em pesquisa básica e aplicada, o que os torna escassos no campo de atuação nas análises clínicas. Devido à relevância do trabalho laboratorial desenvolvido, verificou-se a necessidade de incluir, nas grades curriculares dos cursos de graduação em Farmácia, disciplinas voltadas exclusivamente à biologia molecular como método de diagnóstico e prevenção de doenças.

Com relação aos reagentes utilizados nas extrações de RNA, amplificação do cDNA e aos aparelhos específicos (termocicladores), esses são importados e possuem custos elevados. O desafio financeiro em manter uma estrutura que proporcione à comunidade Porto-Segurense o acesso permanente ao diagnóstico molecular da Covid-19 requer parceria entre os governos municipais e estaduais.

Atualmente existe apenas um laboratório privado no município de Porto Seguro e região que está realizando o diagnóstico pela técnica de RT-PCR. Os turistas estrangeiros, com viagens marcadas em voos internacionais, são os que mais procuram esse serviço. Assim, é necessário reativar o laboratório de biologia molecular no Lacen de Porto Seguro para acolher uma parcela da população que está desassistida, pois o teste tem custo elevado no setor privado e há necessidade de garantir a agilidade no recebimento dos laudos.

Conclusão

Por se tratar de um diagnóstico laboratorial pioneiro no município de Porto Seguro, este estudo fornece dados para a sociedade e órgãos de saúde, permitindo mapear a distribuição do vírus SARS-CoV-2 na comunidade e direcionar as formas de planejamento e as medidas de controle. O diagnóstico por meio da biologia molecular, utilizando a técnica de RT-PCR, permitiu identificar precocemente a presença do vírus, favorecendo o isolamento imediato dos infectados, a investigação dos casos suspeitos e outras providências, principalmente em relação aos pacientes internados e que vieram a óbito.

Com a diminuição progressiva da circulação do vírus, a parceria com o governo do estado e com a secretaria de saúde de Porto Seguro foi encerrada. Para as pequenas quantidades de pacientes que ainda procuram atendimento no laboratório municipal, as amostras são encaminhadas para a unidade de referência em Salvador.

Com a grande demanda mundial no diagnóstico molecular do vírus SARS-CoV-2, as técnicas tornaram-se mais simples, com menos intervenção do analista clínico durante a extração do RNA, a síntese de cDNA e a amplificação do gene. Várias multinacionais desenvolveram métodos de diagnóstico com utilização de cartuchos, otimizando a análise e diminuindo o número de etapas fragmentadas para amplificação do gene e a liberação do laudo.

REFERÊNCIAS

- BAHIA. Governo do Estado. Secretaria de Desenvolvimento Rural. **Território de Identidade – Costa do Descobrimento – Perfil Sintético**. Salvador: 2015.
- BAHIA. Governo do Estado. Secretaria de Saúde. **Boletim Epidemiológico Covid-19**. Disponível em: <http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2021/10/BOLETIM_ELETRONICO_BAHIAN_580_25102021.pdf>. Acesso em: 25/10/2021.
- DIAZ-GUIMARAENS B, DOMINGUEZ-SANTAS M, SUAREZ-VALLE A, et al. **Petechial Skin Rash Associated With Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection**. JAMA Dermatol. 2020;156(7):820–822.
- GOTTLIEB M, LONG B. **Dermatologic manifestations and complications of Covid-19**. Am J Emerg Med. 2020 Sep;38(9):1715–21.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **População estimada**. Disponível em: <www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao>. Acesso em: 26/09/2021.
- JOSEFSEN, MATHILDE H. et al. **Instrumentation and Fluorescent Chemistries Used in qPCR**. In: Fillion, Martin (Ed.). Quantitative Real-time PCR in Applied Microbiology. Norfolk: Caister Academic Press, p. 27-52, 2012.
- KLIMACH A, EVANS J, STEVENS J, CREASEY N. **Rash as a presenting complaint in a child with Covid-19**. Pediatr Dermatol. 2020 Sep;37(5):966–7.
- LIVAK, KENNETH J. et al. **Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization**. Genome Research, v. 4, n. 6, p. 357-362, 1995.
- MEO SA, ALHOWIKAN AM, KHLAIWI TAL, MEO IM, HALEPOTO DM, IQBAL M, et al. **Novel coronavirus 2019-nCoV: Prevalence, biological and clinical characteristics comparison with SARS-CoV and MERS-CoV**. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2020;24(4):2012–9.
- SACHDEVA M, GIANOTTI R, SHAH M, BRADANINI L, TOSI D, VERALDI S, et al. **Cutaneous manifestations of Covid-19: Report of three cases and a review of literature**. J Dermatol Sci. 2020 May;98(2):75–81.
- SANCHEZ A, SOHIER P, BENGHANEM S, et al. **Digitate Papulosquamous Eruption Associated With Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection**. JAMA Dermatol. 2020;156(7):819–820.
- WOLLINA, U., KARADAĞ, AS., ROWLAND-PAYNE, C., CHIRIAC, A., LOTTI, T. **Cutaneous signs in Covid-19 patients: a review**. Dermatol Ther. 2020.
- ZHU N, ZHANG D, WANG W, LI X, YANG B, SONG J, XIANG Z, BAOYING H, WEIFENG S, ROUJIAN L, PEIHUA N, FAXIAN Z, XUEJUN M, DAYAN W, WENBO X, GUIZHEN W, GEORGE FG, PHIL D, WENJIE T. **A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019**. J Engl J Med 2020; 382(8):727-733.

Autor

Juliano Oliveira Santana

Contatos

emaildejuliano@gmail.com