



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

Kédina Rafaela Santana

**Padronização do ensaio RT-PCRq para detecção de SARS-CoV-2 em
diferentes amostras clínicas: desafios e interferentes.**

Dourados-MS

2023

Kédina Rafaela Santana

Padronização do ensaio RT-PCRq para detecção de SARS-CoV-2 em diferentes amostras clínicas: desafios e interferentes.

Trabalho de Conclusão do Curso apresentado à Universidade Federal da Grande Dourados, como requisito parcial para a obtenção do título de bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Fábio Juliano Negrão.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Dourados-MS

2023

Kédina Rafaela Santana

Padronização do ensaio RT-PCRq para detecção de SARS-CoV-2 em diferentes amostras clínicas: desafios e interferentes.

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado pela Banca Examinadora como requisito parcial para obtenção do título de Biotecnologia, da Universidade Federal da Grande Dourados.

Orientador: Dr. Fábio Juliano Negrão

Aprovado em: 25/08/23

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **FABIO JULIANO NEGRAO**
Data: 28/08/2023 11:44:29-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Fábio Juliano Negrão
Presidente

Documento assinado digitalmente
 **VIVIANE REGINA NORO**
Data: 28/08/2023 21:59:32-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Viviane Regina Noro
Membro

Documento assinado digitalmente
 **MAYRA DEYSE HIRT DA SILVA**
Data: 28/08/2023 11:47:35-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Mayra Deyse Hirt da Silva
Membro

Padronização do ensaio RT-PCRq para detecção de SARS-CoV-2 em diferentes amostras clínicas: desafios e interferentes.

Standardization of RT-PCRq assay for SARS-CoV-2 detection in various clinical samples: challenges and interferences.

Kédina Rafaela Santana¹, Fábio Juliano Negrão¹

RESUMO

Objetivo: Descrever a padronização do teste RT-PCRq em diferentes amostras clínicas, os desafios e interferentes para detecção de SARS-CoV-2. **Metodologia:** Coletou-se amostras de suabe do trato respiratório superior, soro e urina de 138 pacientes positivos e suabe de 67 pacientes negativos. Foram incluídos pacientes maiores de 18 anos, no primeiro atendimento, com febre e/ou sintomas respiratórios com menos de 7 dias de sintomatologia e diagnóstico para COVID-19 confirmados pela equipe de vigilância. As amostras foram submetidas à extração de RNA pelo método de colunas de sílica, seguido por RT-PCRq. **Resultados:** Suabe obteve 65 resultados positivos (≤ 38 Ct), seguido por urina (17) e soro (12). O estudo revelou porcentagem razoável de sensibilidade (47%) em amostras de suabe do trato respiratório quando comparadas ao padrão ouro e diferença significativa ($p < 0,0001$) entre estes. Em contrapartida, das amostras de suabe dos pacientes negativos, a especificidade foi de 100%, sugerindo que o teste forneceu resultados negativos precisos na ausência da doença. **Conclusão:** Tais resultados destacam a importância de práticas de controle de qualidade e padronização para se evitar resultados falsos, além da junção da técnica com testes beira-leito e recursos clínicos para um diagnóstico preciso e eficaz da COVID-19.

Palavras-chave: RT-PCRq, SARS-CoV-2, Detecção, Amostras clínicas.

ABSTRACT

Objective: To describe the standardization of the RT-PCRq test in different clinical samples, the challenges, and interferences for SARS-CoV-2 detection. **Methodology:** Upper respiratory tract swab, serum, and urine samples were collected from 138 positive patients, along with swab samples from 67 negative patients. Patients over 18 years old, presenting with fever and/or respiratory symptoms within 7 days of onset, and confirmed COVID-19 diagnosis by the surveillance team were included. The samples underwent RNA extraction using the silica column method, followed by RT-PCRq. **Results:** The swab samples yielded 65 positive results (≤ 38 Ct), followed by urine (17) and serum (12). The study revealed a reasonable sensitivity percentage (47%) in upper respiratory tract swab samples when compared to the gold standard, with a significant difference ($p < 0.0001$) between them. Conversely, for swab samples from negative patients, specificity was 100%, suggesting that the test provided accurate negative results in the absence of the disease. **Conclusion:** These findings underscore the importance of quality control practices and standardization to prevent false results, in addition to integrating the technique with point-of-care tests and clinical resources for accurate and effective COVID-19 diagnosis.

Keywords: RT-PCRq, SARS-CoV-2, Detection, Clinical samples.

¹Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). Dourados - MS.

INTRODUÇÃO

A Doença do Coronavírus (COVID-19) é uma infecção cujo agente etiológico é o vírus de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples com sentido positivo, SARS-CoV-2, pertencente ao gênero *Betacoronavírus* [1, 2]. A infecção ocorre por meio das ligações entre a unidade de superfície (S1) da proteína spike do vírus com os receptores ECA2, enzima conversora de angiotensina tipo 2 [3]. Uma vez ligados, a proteína spike é então iniciada pela serina protease celular TMPRSS2 e funde-se à membrana citoplasmática das células-alvo do hospedeiro [4,5]. Já nas células do hospedeiro, o vírus passa a se replicar e migrar para vários tecidos e órgãos. Nesse sentido, Terpos *et al.* [6] aponta que os sintomas mais graves incluem predileção a órgãos com maiores receptores da SARS-CoV-2 que possuem relação com a ECA2.

A propagação da COVID-19 ocorre principalmente através de gotículas respiratórias e as manifestações clínicas, de acordo com Hu *et al.* [2], incluem sintomas de pneumonia viral, incluindo febre, tosse e desconforto torácico, e em casos graves dispnéia e infiltração pulmonar bilateral. Em virtude da possibilidade de agravamento do quadro clínico e da rápida disseminação do vírus, medidas de controle foram implementadas em todo o mundo a fim de mitigar tal problemática. Ilustrando esse cenário, sob recomendação do Ministério de Saúde, o ensaio de RT-PCRq, do inglês *reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction*, foi apontado como teste padrão ouro para a detecção de SARS-CoV-2 em pacientes sintomáticos e contactantes no Brasil [7].

Nesse sentido, o RT-PCRq é uma técnica para detecção e quantificação do RNA. Segundo Zaha *et al.* [8], o RNA é, primeiramente, transcrito em DNA complementar (cDNA) que, por sua vez, é utilizado como modelo para reação de PCR em tempo real, na qual há a observação e registro da quantidade de produto de amplificação que é medida em cada ciclo de PCR, por meio de sensores que detectam fluorescência [9,10]. O método possui uma série de vantagens quando comparado ao PCR convencional e métodos sorológicos, entre as quais, elencam-se a possibilidade de coleta de dados na fase exponencial e rapidez da análise, além de maior sensibilidade, precisão, reprodutibilidade e acurácia do ensaio [9].

Embora uma ferramenta poderosa no diagnóstico da COVID-19, a técnica não é isenta de limitações, uma vez que existem interferentes que podem afetar a precisão e a sensibilidade do método. De acordo com Menezes *et al.* [11], a técnica requer pessoal com conhecimento e treinamento técnico especializado para operar sofisticados instrumentos, são de alto custo e o laboratório deve atender aos requisitos de nível 2 ou mais de biossegurança.

Ainda, Trindade e Fortes [12] apontam erros analíticos que incluem variação na sequência do RNA viral, exame realizado fora da janela diagnóstica, má harmonização de iniciadores (primers) ou sondas e anelamento não específico.

À vista disso, o presente estudo tem por objetivo a descrição da padronização do teste RT-PCRq em diferentes amostras clínicas coletadas em pacientes com COVID-19 residentes da Grande Dourados, Mato Grosso do Sul, bem como revisar e discutir os desafios e interferentes para detecção de SARS-CoV-2 pelo ensaio.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de 205 pacientes, pela equipe de vigilância no Posto de Assistência Médica (PAM), localizado em Dourados, Mato Grosso do Sul. Foram incluídos pacientes maiores de 18 anos, no primeiro atendimento, com quadro de febre e/ou sintomas respiratórios com menos de 7 dias de sintomatologia e diagnóstico para COVID-19 confirmado pela equipe de vigilância.

Ainda, como critério de inclusão, os pacientes recrutados eram residentes da Grande Dourados e capazes de consentir no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e cumprir os procedimentos do estudo. Além disso, coletou-se amostras clínicas de diferentes espécimes no estágio D0 da doença, que incluem suabe, urina e soro que, por sua vez, foram processadas no Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados (LPCS/UFGD). Os pacientes foram recrutados entre outubro de 2020 e maio de 2022.

Extração de RNA

O RNA foi extraído de 200 μL de cada amostra clínica viral usando o kit QIAamp Viral RNA (QIAGEN, Hilden, Alemanha) pelo método de colunas de sílica. Um total de 50 μL de RNA foram eluídos de cada coluna de extração para cada amostra. A eficiência da extração foi aferida por espectrofotometria de densidade óptica a 260nm e 280nm com o equipamento NanoDrop (Thermo Fisher, Massachusetts, EUA), sendo a concentração calculada em $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Foram considerados sem contaminação que interferisse na realização da amplificação, eluído com coeficiente entre 1,8 e 2,0 na razão entre as duas densidades óticas.

Reação em cadeia pela polimerase

Realizou-se RT-PCRq pelo kit Allplex™ 2019-nCoV Assay (Seegene, Califórnia, EUA) cujos analitos eram E gene, N gene e RdRP gene; 8 µL de RNA extraído foram adicionados em 17 µL da mistura de reação. Cada mistura de reação de 17 µL continha 5 µL de reagente *2019-nCoV MOM*, 5 µL de *RNase-free Water*, 5µL de *5X Real-time One-step Buffer* que continha dNTPs e 2 µL de *Real-time One-step Enzyme*. A reação foi incubada a 50°C por 20 minutos e 95°C por 15 minutos, seguidas de 45 ciclos a 95°C por 15 segundos e 58°C por 30 segundos, acompanhados de 44 ciclos de 94° por 15 segundos. O processo de amplificação foi realizado em um termociclador C1000 (Bio-Rad, Califórnia, EUA) com modelo óptico CFX96 de reação. Os resultados foram interpretados de acordo com o manual do kit, na qual um valor de ciclo limiar (valor Ct) menor ou igual a 38 foi definido como um resultado positivo, e um valor de Ct maior que 38 foi definido como um resultado negativo.

Análise Estatística

Para a avaliação dos dados a sensibilidades e intervalos de confiança de 95% (IC) foram calculados a partir de tabelas dois por dois. A sensibilidade foi calculada em comparação com um padrão-ouro composto, que incluía qualquer resultado positivo por RT-PCRq no laboratório ou no Laboratório Central do Estado de qualquer tipo de espécime. As sensibilidades foram comparadas usando qui-quadrado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Data análise foi realizada usando o Programa R, com a interface Rstudio.

Ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal da Grande Dourados (N° CAAE: 32874720.8.2007.5160).

RESULTADOS

Foram coletadas 481 amostras provenientes de 205 pacientes, 138 com diagnóstico positivo e 67 negativos para COVID-19 pela técnica de RT-PCRq, com idade acima de 18 anos e que atendiam todos os critérios de inclusão. Os resultados obtidos (tabela 1), apontam que o suabe, das demais, foi a espécime que obteve maior número de resultados positivos (65), seguida por urina (17) e soro (12). Quando comparadas ao padrão ouro, o suabe obteve 47% de sensibilidade com valor razoável de intervalo de confiança (38.55-55.78). A

sensibilidade apresentou-se baixa nas amostras de urina (12.32%) e soro (8.70%), com intervalos de confiança indicando a faixa de incerteza desses valores. Além disso, os valores baixos de p (<0.0001) indicam que há diferença estatisticamente significativa entre as espécimes e o padrão ouro comparado, o que sugere que as diferenças observadas entre os grupos são muito improváveis de ocorrerem ao acaso.

Tabela 1. Detecção de SARS-CoV-2 em amostras clínicas pelo ensaio de RT-PCRq.

Tipo de amostra	Total de Testes, n	Resultados Positivos, n	Sensibilidad e^{1-2} %	IC 95%	Qui-quadrado	Valor de P^2
Suabe	138	65	47.10	38.55-55.78	19.1088	<0.0001
Urina	138	17	12.32	7.34-18.99	69.1429	<0.0001
Soro	138	12	8.70	4.57-14.70	78.3704	<0.0001

Fonte: Santana et al. ¹Sensibilidade, a probabilidade de um resultado de teste ser positivo quando a doença está presente (taxa de verdadeiros positivos) foi calculada em comparação com padrão-ouro. Os casos padrão ouro incluíram qualquer resultado positivo por rRT-PCR de suabe nasal coletado na investigação epidemiológica, foram consideradas amostras elegíveis amostras de pacientes com até 7 dias de sintomas.

²Sensibilidade do suabe nasofaríngeo executado no laboratório central estatal (padrão ouro), em comparação com as amostras de suabe, urina e soro. Todas as amostras foram coletadas do mesmo paciente e no mesmo momento e testadas usando o mesmo método de teste de diagnóstico.

Abreviações: IC, intervalo de confiança;

Nota: Especificidade, a probabilidade de um resultado de teste ser negativo quando a doença não está presente (taxa de verdadeiros negativos), foi calculada utilizando os resultados obtidos no suabe nasofaríngeo realizado central (prova ouro) em comparação à outras amostras de suabe, usando o mesmo método de teste de diagnóstico. Nesse processo foram avaliadas 67 amostras negativas. E, a especificidade foi de 100% (IC 95% 79.4-100%).

Outrossim, das 67 amostras de pacientes com resultados negativos que foram analisadas, o teste demonstrou uma especificidade de 100%. Dessa forma, de todas as amostras negativas avaliadas, o teste foi capaz de identificar corretamente todas elas como negativas. Ainda, o intervalo de confiança de 95% para a especificidade foi de 79.4% a 100%, o que sugere que os resultados são confiáveis e que a probabilidade da especificidade real estar dentro desse intervalo é alta. Tal resultado é uma boa indicação de que o teste possui uma alta capacidade de fornecer resultados negativos precisos quando a doença não está presente.

DISCUSSÃO

Apesar de baixa, a detecção de SARS-CoV-2 em amostras de soro no estudo, de acordo com Chan *et al.* [13], pode indicar um transbordamento do vírus do pulmão infectado mais gravemente para a circulação sistêmica. Ainda, mesmo que a taxa de detecção em

amostras de urina não seja tão alta, o percentual se difere dos estudos de Chan *et al.* [13], Wang *et al.* [14] e Lo *et al.* [15], em que não houve detecção em nenhum dos testes com urina utilizando a técnica de RT-PCRq. Em vista disso, embora as células pulmonares, intestinais e renais tenham maior expressão de ECA 2, a expressão do receptor foi também observada em células uroteliais e tornam tais células suscetíveis à infecção por SARS-CoV-2 [16]. Entretanto, a detecção do RNA viral na urina não indica necessariamente que o vírus esteja se replicando ativamente no trato urinário, tendo em vista que ainda fazem-se necessárias pesquisas que esclareçam os mecanismos envolvidos no processo.

Outrossim, a maior detecção do vírus nas amostras de suabe do trato respiratório superior estão de acordo com a grande maioria dos estudos, devido à alta presença de receptores ECA2. Segundo Bwire *et al.* [17], a espécime é preferível uma vez que é menos invasiva que as demais. No entanto, tendo em vista a ampla utilização no diagnóstico da COVID-19 com amostras de suabe, a sensibilidade apresentada foi baixa, visto que os resultados falso-negativos podem contribuir para a disseminação do vírus no entorno do paciente.

Nesse sentido, o principal desafio em relação ao ensaio de RT-PCRq se dá pela possibilidade de se obter resultados falso-negativos ou falso-positivos. Esses falsos resultados podem ser consequência de erros na amostragem clínica, no que se refere à amostragem incompleta ou restrições de transporte e armazenamento, bem como múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento, tendo em vista que a molécula de RNA é lábil e carece baixas temperaturas para evitar a sua degradação [18]. Além disso, as variações na sequência de RNA viral podem afetar os resultados, mesmo que a maioria dos ensaios tenham sido padronizados a partir de regiões conservadas dos genomas virais. Nesse mesmo entendimento, Tahamtan e Ardebili [19] apontam que resultados falso-negativos podem ocorrer por mutações no primer e nas regiões-alvo da sonda no genoma do SARS-CoV-2.

Ademais, a baixa carga viral em pacientes assintomáticos e pouco sintomáticos pode interferir na sensibilidade do método, especialmente em pacientes na fase inicial da doença ou àqueles cuja infecção já foi controlada pelo sistema imunológico, como destaca Ramirez *et al.* [20]. Da mesma forma, os erros humanos no processamento podem influenciar na precisão do ensaio. Sule *et al.* [21] salienta a importância do treinamento adequado dos profissionais e inclusão de inibidores de RNase para evitar a contaminação durante a condução do método, juntamente à adoção de boas práticas laboratoriais e treinamento para o trabalho em laboratório de biossegurança nível 2 (NB-2).

Dessa forma, de acordo com Tahamtan e Ardebili [19], o ensaio não deve ser utilizado como critério único para a escolha do tratamento e manejo de pacientes suspeitos. Gupta *et al.* [22], por sua vez, evidencia a importância dos testes beira-leito, pelo método de imunocromatografia para a detecção de antígeno ou anticorpo, nas unidades de atendimento como complemento à técnica, pois, embora tenham menor sensibilidade, são pouco laboriosos, têm baixo custo e boa acurácia [7]. Em concordância, Wang *et al.* [23] sugere que a técnica deve ser acompanhada de recursos clínicos para facilitar o gerenciamento de surtos da doença.

CONCLUSÃO

O estudo apresentou uma detecção relativamente baixa de RNA viral em amostras de soro e amostras de urina pelo ensaio RT-PCRq, embora menos frequente que em amostras respiratórias, difere dos resultados de alguns estudos anteriores e sugere que as células uroteliais também podem ser suscetíveis à infecção pelo SARS-CoV-2. Ademais, a maior taxa de detecção do vírus em amostras de suabe do trato respiratório superior está em consonância com a maioria dos estudos devido à elevada expressão de receptores ECA2 nesta região. Entretanto, o estudo revelou uma porcentagem alta de resultados negativos em amostras de suabe de pacientes positivos. Assim, o teste apresenta desafios em relação à possibilidade de resultados falso-negativos, em virtude de diversos fatores. Dessa forma, é importante que o ensaio de RT-PCRq não seja usado como único critério para o diagnóstico e manejo de pacientes suspeitos. Todavia, a especificidade em 100% nas amostras de pacientes negativos indica que o teste nos fornece resultados negativos precisos.

REFERÊNCIAS

1. Uzunian, A. Coronavirus SARS-CoV-2 and Covid-19. J Bras Patol Med Lab. 2020;56:3472020. doi:10.5935/1676-2444.
2. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. Nat Rev Microbiol. 2021 Mar;19(3):141-154. doi: 10.1038/s41579-020-00459-7.
3. Scholz J.R, Lopes MACQ, Saraiva, JFK, *et al.* COVID-19, Sistema Renina-Angiotensina, Enzima Conversora da Angiotensina 2 e Nicotina: Qual a Inter-Relação? Arq Bras Cardiol. 2020 Oct; 115(4): 708–711. doi: 10.36660/abc.20200653.
4. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, *et al.* SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. Cell. 2020 Apr 16;181(2):271-280.e8. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
5. Zhao X, Chen D, Szabla R, *et al.* Broad and Differential Animal Angiotensin-Converting Enzyme 2 Receptor Usage by SARS-CoV-2. J Virol. 2020 Aug 31;94(18):00940-20. doi: 10.1128/JVI.00940-20.
6. Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Elalamy I, *et al.* Hematological findings and complications of COVID-19. Am J Hematol. 2020 Jul;95(7):834-847. doi: 10.1002/ajh.25829.
7. Silva, MD.H, Ferrari, IC, Pires, MAS, *et al.* Uma análise dos principais diagnósticos de SARS-CoV-2 disponíveis no Brasil: uma revisão de literatura. Arq. Ciênc. Saúde da UNIPAR. 2023;27(3):1322-1333. doi: 10.25110/arqsaude.v27i3.2023-017.
8. Zaha A, Ferreira HB, Passaglia LMP. Biologia molecular básica. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
9. Lipay MVN, Bianco B. Biologia Molecular - Métodos e Interpretação. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2015.
10. Moraes SDL, Ferreira AW. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Autoimunes. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
11. Menezes ME, Lima LM, Martinello F. Diagnóstico laboratorial do SARS-CoV-2 por transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real

- (RT-PCR). *Rev Bras Anal Clin.* 2020; 52 (2):122-130. doi: 10.21877/2448-3877.20200006.
12. Trindade NS, Fortes IG. RT-PCR: importância e limitações no diagnóstico da covid-19. *Brazilian Journal of Development.* 2021;7(8):85067-85075. doi: 10.34117/bjdv7n8-627.
 13. Chan, J. F.; Yuan, S.; Kok, K.; et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of family cluster. *Lancet*, 2020. 395(10223):514-523. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30154-9.
 14. Wang, W.; Xu, Y.; Gao, R.; et al. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA.* 2020;323(18):1843–1844. doi: 10.1001/jama.2020.3786.
 15. Lo IL, Lio CF, Cheong HH, et al. Evaluation of SARS-CoV-2 RNA shedding in clinical specimens and clinical characteristics of 10 patients with COVID-19 in Macau. *Int J Biol Sci.* 2020; 16(16):707. doi: 10.7150/ijbs.45357.
 16. Mumm JN, Osterman A, Ruzicka M, et al. Urinary Frequency as a Possibly Overlooked Symptom in COVID-19 Patients: Does SARS-CoV-2 Cause Viral Cystitis? *Eur Urol.* 2020; 78(4):624-628. doi: 10.1016/j.eururo.2020.05.013.
 17. Bwire GM, Majigo MV, Njiro BJ, et al. Detection profile of SARS-CoV-2 using RT-PCR in different types of clinical specimens: A systematic review and meta-analysis. *J Med Virol.* 2021;93(2):719-725. doi: 10.1002/jmv.26349.
 18. Mo, X.; Qin, W.; Fu, Q. *et al.* Understanding the influence factors in viral nucleic acid test of 2019 novel coronavirus. *Chin J Lab Med.* 2020;43(3) : 213-216. doi: 10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2020.03.003.
 19. Tahamtan A, Ardebili A. Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. *Expert Rev Mol Diagn.* 2020;20(5):453-454. doi: 10.1080/14737159.2020.1757437.
 20. Ramirez PA, Valencia YE, Carillo CQ, et al. Pruebas diagnósticas para la COVID-19: la importancia del antes y el después. *Rev Horiz Med.* 2020; 20(2):. doi: 10.24265/horizmed.2020.v20n2.14.
 21. Sule WF, Oluwayelu DO. Real-time RT-PCR for COVID-19 diagnosis: challenges and prospects. *Pan Afr Med J.* 2020; 35(2):121. doi: 10.11604/pamj.suppl.2020.35.24258.
 22. Gupta N, Augustine S, Narayan T, et al. Point-of-Care PCR Assays for COVID-19 Detection. *Biosensors.* 2021;11(5):141. doi: 10.3390/bios11050141.

23. Wang Y, Kang H, Liu X, Tong Z. Combination of RT-qPCR testing and clinical features for diagnosis of COVID-19 facilitates management of SARS-CoV-2 outbreak. *J Med Virol*. 2020;92(6):538-539. doi: 10.1002/jmv.25721.

ANEXO

 **Brazilian Journal of Health Review** ISSN 2688-8855

[Home](#) / [Submissions](#)

Submissions

[Login](#) or [Register](#) to make a submission.

Submission Preparation Checklist

As part of the submission process, authors are required to check off their submission's compliance with all of the following items, and submissions may be returned to authors that do not adhere to these guidelines.



Author Guidelines

BJHR accepts only original articles, not published in other journals. We accept articles presented at events, provided that this information is made available by the authors.

The standards for formatting and preparation of originals are:

- Maximum of 20 pages;
- Maximum 8 authors;
- Times New Roman font size 12, line spacing 1.5;
- Figures and Tables should appear together with the text, editable, in font 10, both for the content and for the title (which should come just above the graphic elements) and font (which should come just below the graphic element).
- Title in Portuguese and English, at the beginning of the file, with source 14;
- Abstract, along with keywords, with simple spacing, just below the title;
- The submitted file should not contain the identification of the authors.

Upon receipt of the originals, the editor makes a prior review of content adequacy and verification of plagiarism and sends, within one week after receipt, for the analysis of at least two external reviewers, who can: accept the paper, accept with modifications, requires modifications and requests a new version for correction or refusal of the article.

This journal adopts as editorial policy the guidelines of good practices of scientific publication of the National Association of Research and Post-Graduation in Administration (ANPAD), available at: http://www.anpad.org.br/diversos/boas_praticas.pdf.

Publication Fee

- This journal does not charge a submission fee;
- This paper charges the publication of articles, in the amount of R\$ 495.00 per paper to be published.