

TESTES DIAGNÓSTICOS PARA O SARS-COV-2: UMA REFLEXÃO CRÍTICA

Marcone A. L. de Oliveira^{a,*}, Aripuanã S. A. Watanabe^b, Dionéia E. Cesar^d, João Marcos B. Candido^a, Nerilson M. Lima^a, Olívia B. O. Moreira^a e Paula R. Chellini^c

^aDepartamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Juiz de Fora, 36036-900, Juiz de Fora – MG, Brasil

^bDepartamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, 36036-900, Juiz de Fora – MG, Brasil

^cDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, 36036-900, Juiz de Fora – MG, Brasil

^dDepartamento de Biologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, 36036-900, Juiz de Fora – MG, Brasil

Recebido em 23/12/2021; aceito em 21/03/2022; publicado na web em 19/04/2022

DIAGNOSTIC TESTS FOR SARS-COV-2: A CRITICAL REFLECTION. The new coronavirus, called Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), was discovered in late December 2019 after cases were reported in the city of Wuhan, China. In January 2020, the World Health Organization (WHO) officially declared the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) as a pandemic, which has an official record of around 500 million cases and more than 6.0 million deaths worldwide. An important factor in controlling the pandemic is the development of more effective and efficient diagnostic tests. In this context, this review has as its main proposal to discuss the effective differences between the possible diagnostic tests, the implications of molecular and serological methods available on the market and the analytical and clinical parameters involved in the development and application of these methods.

Keywords: SARS-CoV-2; COVID-19; diagnostic tests.

INTRODUÇÃO

Os primeiros diagnósticos de *Coronavirus Disease 2019* (COVID-19) foram registrados em dezembro de 2019 na cidade de Wuhan, China, cujos laudos foram descritos como pneumonia de etiologia desconhecida, de origem zoonótica, relacionada a um mercado de animais silvestres autóctone.¹ Após identificar o agente etiológico denominado *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2), a Organização Mundial da Saúde (OMS) entendeu que se tratava de uma doença pandêmica, e, portanto, em janeiro de 2020, declarou estado de emergência de saúde global. Desde então, a COVID-19 tem sido um dos maiores desafios epidemiológicos do século, sendo considerada mais grave do que a pandemia por gripe espanhola com registro de ocorrência em 1918.²⁻⁴ É importante destacar que o SARS-CoV-2 também pertence ao gênero *Betacoronavirus* da ordem *Nidovirales* e possuem um genoma caracterizado por alta frequência de mutações e recombinações, adquirindo alto potencial para alternar hospedeiros e patogenicidade.^{5,6} A COVID-19, é frequentemente associada a problemas respiratórios cujos sintomas mais comuns incluem febre, tosse seca e fadiga. Embora classificada como síndrome respiratória, relatos recentes sobre a doença a caracterizam como uma doença sistêmica, pois envolve o sistema cardiovascular, respiratório, gastrointestinal, neurológico, hematopoiético e imunológico.^{1,7} Contudo, outros sintomas menos comuns como a anosmia (perda do olfato), congestão nasal, conjuntivite (também conhecida como olhos vermelhos), dor de garganta, dor de cabeça, dores musculares ou articulares, diferentes tipos de erupções cutâneas, náusea ou vômito, diarreia, calafrios ou tonturas podem também ser evidenciados. No entanto, uma pequena parte dos infectados evolui para síndrome do desconforto respiratório agudo e dano alveolar difuso, cujos quadros

graves de pneumonia podem causar insuficiência respiratória, perda de apetite, confusão mental, dor persistente ou pressão no peito, febre alta (temperatura acima de 38 °C), irritabilidade, consciência reduzida (às vezes associada a convulsões), ansiedade, depressão, distúrbios do sono, complicações neurológicas mais graves e raras, como acidentes vasculares cerebrais, inflamação do cérebro, delírio e danos nos nervos. Após a exposição ao SARS-CoV-2, os sintomas aparecem, em média, de 5 a 6 dias e pode variar de 1 a 14 dias. Em função disso, é aconselhável permanecer em isolamento por um período mínimo de 14 dias a fim de evitar a propagação do vírus, especialmente onde os testes não estão facilmente disponíveis.⁸⁻¹⁰ Nos casos mais brandos, a infecção tende a retroceder sem maiores complicações. Porém, pacientes portadores de doenças crônicas ou comorbidades, ou que em uma semana apresentem piora clínica, precisam de acompanhamento e assistência médica mais intensiva, pois a doença pode progredir para o estágio mais grave, muitas vezes levando a óbito.

O elevado número de pessoas infectadas assintomáticas e pré-sintomáticas que podem transmitir o vírus, associado com a dificuldade em testar toda a população em tempo real, é um dos grandes desafios no controle da pandemia de COVID-19.¹¹ Um dos principais agentes para controlar a pandemia, de fato, é aplicação de testes efetivos ainda na fase inicial da doença, em que os sintomas não são específicos, visto que outras doenças, como por exemplo a influenza, apresentam sintomas similares e acabam contribuindo para a inexactidão do diagnóstico.¹²

A partir de dezembro de 2019, diversos testes diagnósticos foram desenvolvidos para a detecção do SARS-CoV-2 incluindo os testes diretos para a pesquisa de alvo genético ou proteico do vírus, e os testes indiretos para a detecção de anticorpos contra o vírus. Portanto, o principal objetivo deste artigo de revisão é discutir a eficácia, eficiência e acurácia dos atuais testes utilizados para detectar a COVID-19. Dentro desse contexto, com o intuito de apresentar

*e-mail: marcone.oliveira@ufjf.edu.br

aos leitores o estado da arte envolvendo o tema em epígrafe, um esforço crítico e interpretativo envolvendo a busca e investigação bibliográfica, foi direcionado.

MÉTODOS DIAGNÓSTICO

Métodos sorológicos

Testes rápidos (lateral flow - imunocromatográficos)

Atualmente, encontra-se disponível no mercado dois tipos de testes rápidos, aqueles que detectam proteínas na fase ativa da infecção, conhecidos como teste de antígeno, e aqueles que identificam a presença de anticorpos que são produzidos por uma resposta imunológica do organismo quando exposto ao vírus. Apesar de amplamente difundidos, os testes rápidos, quando realizados fora do período indicado, podem apresentar sensibilidade e especificidade muito reduzidas e taxa de erro em torno de 75% de resultados falso negativo, acarretando em insegurança e incerteza para interpretação diagnóstica.¹³ Considerando que nem todos os indivíduos infectados pelo vírus apresentam anticorpos detectáveis por esses métodos, principalmente indivíduos assintomáticos ou que desenvolvem quadro leve de infecção, é importante realizar o diagnóstico por meio de metodologias mais precisas e confiáveis como a reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (do inglês *Reverse transcriptase-Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR).¹⁴ Embora esses testes não sejam apropriados para o diagnóstico precoce da infecção pelo SARS-CoV-2, eles podem auxiliar no diagnóstico de inflamação multissistêmica relacionada a COVID-19.¹⁵

A detecção de anticorpos ou imunoglobulinas A, M e G, ou seja, IgA, IgM e IgG em pessoas que foram expostas ao SARS-CoV-2 é realizada a partir da amostra de sangue do paciente. A IgM é identificada a partir do quinto dia de sintomatologia e, mais significativamente, a partir do oitavo dia, enquanto os valores de IgG específica começam a ser detectáveis a partir do décimo dia do início dos sintomas e, mais significativamente, a partir do 14º dia.¹⁶

Os exames sorológicos podem ser usados como ferramentas auxiliares para diagnóstico de infecção prévia e para estudos populacionais, porém, deve-se avaliar primordialmente alguns parâmetros como validação e acurácia do teste, seleção da amostra e a interpretação dos resultados. Além disso, eles não devem ser utilizados como método diagnóstico preciso, na identificação e controle de surtos entre profissionais de saúde, pois não fornecem informações no que concerne ao período de infectividade ou transmissibilidade da infecção e, também, não são recomendados para indicar ou retirar o paciente das precauções respiratórias.¹⁷

Método de imunoabsorção enzimática e Quimioluminescência

Além do teste Lateral Flow, apresentado no item anterior, a quantificação de IgG e IgM pode ser realizada também pelo método de imunoabsorção enzimática conhecido como ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA), o qual, assim como o método de Quimioluminescência (do inglês *Chemiluminescence Immunoassay*, CLIA) são testes sorológicos realizados por técnicas de análise automatizadas e convencionais.^{17,18} Métodos mais recentes como Eletroquimioluminescência (ECLIA) também estão disponíveis para detecção de anticorpos totais ou apenas para IgG. Esses métodos apresentam sensibilidade superior ao teste rápido na detecção dos anticorpos, porém, assim como o teste rápido, a acurácia destes ensaios é dependente da época em que a coleta foi realizada, cujas recomendações são a partir do 10º dia do início dos sintomas para IgM e IgA e após 15º dia para IgG.¹⁹

O método ELISA tem sido amplamente utilizado em alguns países

da Europa e nos Estados Unidos para a avaliação da soroprevalência dos anticorpos IgG em populações suscetíveis, cujos resultados concluíram que muitas populações possuíam níveis significativos de anticorpos contra o vírus SARS-CoV-2. Esses resultados podem ajudar a entender a probabilidade de infecções assintomáticas ou infecções com sintomas leves.²⁰ Esse método é um ensaio valioso em elucidação de diagnósticos virais uma vez que ele fornece informações qualitativas e quantitativas a partir de amostras de sangue total, plasma ou soro. Esse ensaio utiliza uma placa revestida com proteína viral, onde as amostras são incubadas e, quando na presença de anticorpos, ocorre uma ligação destes anticorpos com uma proteína específica formando um complexo proteína-anticorpo e, dessa forma, pode ser detectado por ligação a um novo lote de anticorpos fluorescentes.²¹ Informações da agência reguladora americana FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) indicam que esse teste é um auxílio no diagnóstico de pacientes com suspeita de COVID-19 em conjunto com a apresentação clínica e os resultados de outros testes laboratoriais. Portanto, não devem ser usados como única base para o diagnóstico de pacientes com infecção aguda por COVID-19. O Teste de Anticorpo IgG pelo método ELISA consiste em dois ensaios diretos e em série: o primeiro é realizado contra o domínio de ligação ao receptor recombinante de SARS-CoV-2 no soro e plasma; o segundo, é realizado para amostra contendo o anticorpo, e é empregado um ensaio ELISA confirmatório contra a proteína Spike do SARS-CoV-2 de comprimento total no soro e plasma.²² Uma importante variável na aplicação de testes sorológicos em diagnósticos virais é o tempo médio de soroconversão para os anticorpos avaliados. Um estudo transversal desenvolvido a partir de 1.942.514 notificações de registros de casos de síndrome gripal contendo resultados de testes diagnósticos para o SARS-CoV-2 nas capitais brasileiras e no Distrito Federal, mostrou que o método ELISA IgM foi realizado em tempo adequado para 58,8%, isso é, em mais da metade dos casos o teste foi realizado dentro do período recomendado o qual é maior ou igual a 8 dias para o ELISA IgM.²³

Uma pesquisa realizada na China, com mais de 200 amostras, resultou na informação de que o teste ELISA IgM combinado com RT-PCR aumentou, substancialmente, na detecção da infecção causada pelo SARS-CoV-2 (98,6%), quando comparada com único teste de RT-PCR (51,8%).²⁴ Entretanto, ao que tange à especificidade, ainda existem algumas preocupações em relação a reatividade cruzada com o vírus da CPVID-19 e outros coronavírus como SARS-CoV e *Middle East respiratory syndrome coronavirus* (MERS-CoV). Dessa forma, foram desenvolvidos testes pelo método ELISA capazes de detectar anticorpos contra as proteínas N, RBD e S/S1, que são as principais proteínas imunológicas do coronavírus, cujos resultados evidenciam que a proteína N (compartilha 92% de sua sequência de aminoácidos com o SARS-CoV) e a RBD (compartilha 73%) foram mais específicas para o SARS-CoV-2 do que a proteína S. Assim, esses resultados podem ser úteis em elucidar resultados falso-negativos.^{25,26}

O método CLIA que também é utilizado na detecção de títulos de anticorpos IgM e IgG em pessoas expostas ao SARS-CoV-2 apresenta sensibilidade relativamente menor que o RT-PCR. Esse método é caracterizado como uma tecnologia de alto rendimento e baixa complexidade e fornece informações sobre níveis de anticorpos e cinética de tempo da resposta humoral que podem ser aplicadas no diagnóstico da COVID-19.²⁷ Embora ainda tenha muitas limitações, muita pesquisa tem sido investida nesta tecnologia visando obter maior sensibilidade para aplicação no diagnóstico da COVID-19. Nessa vertente, Grossberg e colaboradores desenvolveram uma tecnologia baseada no método de Quimioluminescência e validaram em mais de 7 mil amostras obtendo resultados promissores, os quais comprovam a capacidade de detectar uma pluralidade de respostas de anticorpos, incluindo 12 combinações de anticorpo/antígeno: IgM,

IgA e IgG, contra a proteína Spike 1 SP (S1 SP), receptor do domínio de ligação (RBD), Spike 2 SP SP (S2 SP) e NP de SARS-CoV-2. A partir dos resultados desse estudo, foi possível obter informações confiáveis de que a tecnologia desenvolvida pode ser usada para o diagnóstico da COVID-19, sendo suficientemente sensível para detectar os anticorpos IgA, IgG ou IgM para pelo menos um antígeno contra SARS-CoV-2 em 99,67% dos casos positivos confirmados por RT-PCR. Além disso, pôde-se constatar a elevada especificidade da abordagem ao se confirmar que 99,77% dos pacientes negativados por RT-PCR também apresentaram resultado negativo para todas as combinações anticorpo e antígeno.²⁸

Métodos moleculares

O diagnóstico molecular ou baseado em ácido nucleico de doenças humanas pode ser compreendido como a detecção de variações genéticas em amostras de DNA ou RNA.²⁹ Considerando esse tipo diagnóstico, os testes de amplificação de ácidos nucleicos (TAANs), aqueles que realizam a identificação de sequências específicas do material genético do patógeno nas amostras dos pacientes suspeitos,³⁰ são recomendados para o diagnóstico da COVID-19, conforme as diretrizes da OMS, e atualmente o “método padrão ouro” é o conhecido RT-qPCR.³ Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real (do inglês *real-time reverse transcription polymerase chain reaction*), devido a sua alta sensibilidade e especificidade.³¹

RT-qPCR

O uso da reação em cadeia da polimerase (do inglês *polymerase chain reaction*, PCR) no monitoramento em tempo real da amplificação do DNA através da medida do sinal da fluorescência está entre as suas principais aplicações, porém, ainda nos dias atuais diferentes terminologias para identificar esta metodologia ainda são utilizadas, o que pode ser um fator confundidor. É preciso salientar que RT-PCR é uma abreviação transcriptase reversa da reação em cadeia da polimerase (do inglês *reverse transcription PCR*), e não de PCR em tempo real (do inglês *real time PCR*, também chamado de *quantitative PCR*, qPCR). Logo, a sigla RT-qPCR simboliza a transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (do inglês *Reverse Transcription Real-Time PCR* ou também *Reverse Transcription quantitative*), sendo essas terminologias utilizadas neste artigo.³² Assim, RT-qPCR e *real time* RT-PCR são sinônimos.

De maneira pragmática, a distinção entre RT-qPCR (RT-PCR em tempo real) e RT-PCR (semiquantitativo) é a maneira em que ocorre o monitoramento da elevação no número de cópias do gene de interesse, visto que a primeira realiza a detecção concomitantemente a amplificação do material genético, em tempo real, enquanto que na segunda metodologia, a análise dos transcritos só é feita mediante a conclusão da etapa de amplificação.³³

Concernente à sensibilidade dos testes de detecção de anticorpos no diagnóstico do SARS-CoV-2, independente da presença ou ausência destes anticorpos no indivíduo, deve-se avaliar as características das técnicas utilizadas como desempenho do teste, sensibilidade analítica (limite de detecção) e a especificidade analítica (menor interferência de outras substâncias ou antígenos), tendo em vista que muitas variáveis provenientes da fase pré-analítica como o método de coleta, conservação e transporte da amostra podem influenciar diretamente no resultado do exame. Dessa forma, a fase de verificação analítica destes exames constitui uma etapa crítica, uma vez que os testes empregados nos laboratórios clínicos fazem de uso de kits de exames provenientes de diferentes fabricantes, não são padronizados e, muitas vezes, possuem amostragem baixa para confiabilidade dos resultados.³⁴ No tocante ao RT-qPCR, o limite de detecção (LOD = menor concentração viral detectada) dos ensaios

varia de acordo com os kits de diagnósticos, para detecção de SARS-CoV-2, disponíveis em cada laboratório clínico.

No âmbito dos testes de diagnósticos para COVID-19 utilizando o RT-qPCR, o primeiro protocolo foi criado pela OMS no início de 2020. Esse protocolo consistia em três etapas, cuja etapa inicial permitia identificar o gene E (proteína de pequeno envelope) com um limite de detecção de 5,2 cópias de RNA/reação e um intervalo de confiança (IC) de 95% de 3,7-9,6. As próximas etapas consistiam de testes confirmatórios visando detectar o gene RNA-polimerase dependente de RNA (Limite de detecção de 3,8 cópias de RNA/reação e IC de 95% de 2,7-7,6) e o gene N (Limite de detecção de 8,3 cópias de RNA/reação e IC de 95% de 6,1-16,3).³⁵⁻³⁷

LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*)

Uma alternativa ao RT-qPCR em tempo real é a abordagem para detecção consideravelmente rápida do SARS-CoV-2 conhecida como amplificação isotérmica mediada por loop (do inglês *loop-mediated isothermal amplification*). Possui maior custo benefício quando comparado as técnicas convencionais de amplificação de ácidos nucleicos, como PCR e o PCR em tempo real,³⁸ tendo em vista a redução do custo envolvido considerando os reagentes e instrumentos utilizados no processo.³⁹ Neste método, o processo de amplificação do DNA ocorre à temperatura constante, cerca de 60-65 °C em uma hora, suprimindo o uso de termocicladores.

Desde o seu desenvolvimento nos anos 2000, este método de amplificação isotérmica de ácido nucleico já era capaz de gerar cópias do DNA, na escala de 10⁹, com alta especificidade.⁴⁰ Desde então, inúmeras reações baseadas em LAMP foram desenvolvidas para a detecção de diversos patógenos visando o diagnóstico clínico de doenças infecciosas.⁴¹

A detecção de RNA viral do SARS-CoV-2 através da RT-LAMP (do inglês *reverse transcription-LAMP*) foi avaliada em diversos estudos.⁴²⁻⁴⁵ Possui como contraponto os testes por RT-qPCR, e tem demonstrando uma sensibilidade superior a 97% e alta especificidade, evidenciada pelo uso de alguns *primers* que permitem a distinção de maneira síncrona de seis diferentes regiões do DNA.⁴⁶

Metodologias utilizando biomarcadores e detecção baseada em nanomateriais

A comunidade científica segue em constante trabalho para desenvolvimento de novas tecnologias para diagnóstico mais rápido, confiável, cômodo e com menor custo para o paciente. Uma vez que grande parte da pesquisa mundial está voltada para assuntos relacionados à recente pandemia, hoje temos acesso há um grande volume de dados e informações importantes que estão sendo compartilhados por toda comunidade. Neste sentido, dados clínicos e experimentais aliados a estatística e inteligência artificial vêm sendo uma estratégia utilizada.⁴⁷

Por exemplo, tecnologias baseadas em nanomateriais são uma boa alternativa visto que podem, em alguns casos, promover uma detecção viral precisa. Recentemente, pesquisadores desenvolveram nanopartículas magnéticas que facilitam a extração do DNA viral, útil nas etapas de análises clínicas. Um sensor contendo tecnologia de nanoplasma também foi desenvolvido especificamente para detecção da proteína S sem a necessidade de preparo de amostras extensas, considerando que se trata de amostras biológicas, essa é uma característica vantajosa.^{48,49} Shan e colaboradores desenvolveram um sensor híbrido constituído por nanomaterial a base de nanopartículas de ouro associado a ligantes orgânicos para diagnóstico de COVID-19 através da respiração do paciente. Uma vez que o paciente exala em frente ao sensor, o dispositivo é capaz de detectar compostos orgânicos voláteis relacionados à infecção ainda em seu estágio inicial.^{49,50}

Assim como nesse último exemplo e em vários outros casos, os testes de COVID-19 ou qualquer outra doença viral são baseados na detecção de componentes do próprio vírus ou pode-se ainda detectar uma doença a partir de biomoléculas que indicam que nosso organismo está em inconformidade, são os chamados biomarcadores. Em geral, o comportamento desses biomarcadores apresenta um padrão para cada enfermidade, que quando identificado, pode ser transformado em um meio de diagnóstico.⁵¹

No Brasil, de acordo com reportagens de jornais eletrônicos nacionais, grupos de pesquisa diversificados também vêm trabalhando no desenvolvimento de novas tecnologias nesse sentido. Há pesquisas cujo o foco é o desenvolvimento de um método para detecção de sequenciamento de genoma do vírus em saliva de pacientes. Alguns pesquisadores também tem voltado esforços para realização de análises quantitativas, o que por sua vez, aumenta a especificidade e exatidão de testes diagnósticos, e em fabricação de dispositivos portáteis que futuramente poderão ser acoplados a um *smartphone* (Figura 1).

Muitas destas pesquisas já estão em fase de pedido de patente e/ou liberação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e demais órgãos competentes ou ainda já está sendo aplicada em paciente em capitais e alguns locais restritos. Alguns grupos estão ainda em fase de negociação para que testes mais simples e cômodos para o paciente sejam distribuídos pelo SUS.⁵²⁻⁵⁹

SENSIBILIDADE CLÍNICA E ANALÍTICA DOS TESTES DE DIAGNÓSTICOS – ERROS NA FASE PRÉ-ANALÍTICA

A execução de um exame laboratorial passa por várias etapas, e podem ser divididas em três fases: pré-analítica, analítica e pós-analítica. Estima-se que os erros pré-analíticos correspondem aproximadamente a 75% dos erros no ambiente laboratorial, cuja fase envolve todas as etapas iniciais que antecedem a realização do exame como o preparo do paciente, os procedimentos de coleta, o acondicionamento, o transporte e o preparo da amostra biológica.⁶⁰ Em adição, outros fatores como o tempo em que foi realizado o exame, bem como a metodologia de coleta de amostras e a coinfeção com outros vírus podem influenciar a precisão dos testes diagnósticos. Os principais fatores que influenciam na acurácia de um teste de diagnóstico são a sensibilidade e a especificidade clínicas e analíticas., uma vez que o parâmetro sensibilidade reflete a fração de indivíduos infectados com o agente etiológico que, quando testados, o resultado de teste é positivo. Enquanto a especificidade indica a proporção de indivíduos certificados sem doença que, quando

testados, o resultado do teste é negativo.⁶¹ Contudo, a especificidade e sensibilidade de um teste pode variar dentro de uma amostragem populacional significativa, uma vez que os fabricantes dos kits de diagnósticos reportam a sensibilidade e especificidade em um conjunto de amostras com resultados positivos e negativos colhidas de indivíduos admitidos em hospitais, os quais possuem carga viral mais elevada do que indivíduos assintomáticos.^{37,62,63} Em adição, o desempenho e resultado do teste também pode variar dependendo de outras circunstâncias como armazenamento ou transporte da amostra, soro conversão e declínio do título de anticorpos. Assim, obter testes de diagnósticos com sensibilidade e especificidade elevadas aliado às devidas condições analíticas de coleta e tratamento das amostras evita uma alta frequência de resultados falsos negativos que podem influenciar nas estratégias de controle da infecção.

Durante o curso da pandemia, novas tecnologias foram desenvolvidas visando a aquisição de kits de diagnósticos mais sensíveis baseados nas características genômicas do vírus. Um deles é o teste que rastreia o gene N, usando o gene ORF1b como confirmação, cujo ensaio possui alta sensibilidade e especificidade para o vírus da COVID-19.^{35,64,65}

Inerente aos testes de diagnósticos empregados no Brasil e com registros na ANVISA, Verotti e colaboradores realizaram um levantamento de mais de 200 registros. Dentre eles: incluindo ensaios imunocromatográficos (135), RT-PCR (34), anticorpos (15) e Imunoensaios fluorescente (11), cujos resultados mostraram que a sensibilidade IgG/IgM variou de 72% até 100% e especificidade de 32% até 100% para os testes imunocromatográficos e 97,05% alegaram possuir sensibilidade igual ou maior a 95% para os testes RT-PCR.¹⁸

CUSTO DO TESTE

Em 29 de abril de 2020 a ANVISA publicou no Diário Oficial da União, a autorização para utilização de testes rápidos (ensaio imunocromatográficos) para pesquisa de anticorpos ou antígeno do novo coronavírus.⁶⁶ Com isso, os testes rápidos são oferecidos em farmácias, drogarias e laboratórios, devidamente regularizados. São os testes mais acessíveis aos consumidores e o preço para o teste rápido para pesquisa de anticorpos varia de R\$ 80,00 a R\$ 140,00, já para o teste rápido para pesquisa de antígeno o valor encontrado foi entre R\$ 90,00 e R\$ 200,00, conforme apresentado na Figura 2.

O diagnóstico da COVID-19 não deve ser feito por uma avaliação isolada dos resultados dos testes rápidos, além do que, no estágio inicial da infecção, falsos negativos são esperados. Cabe ainda

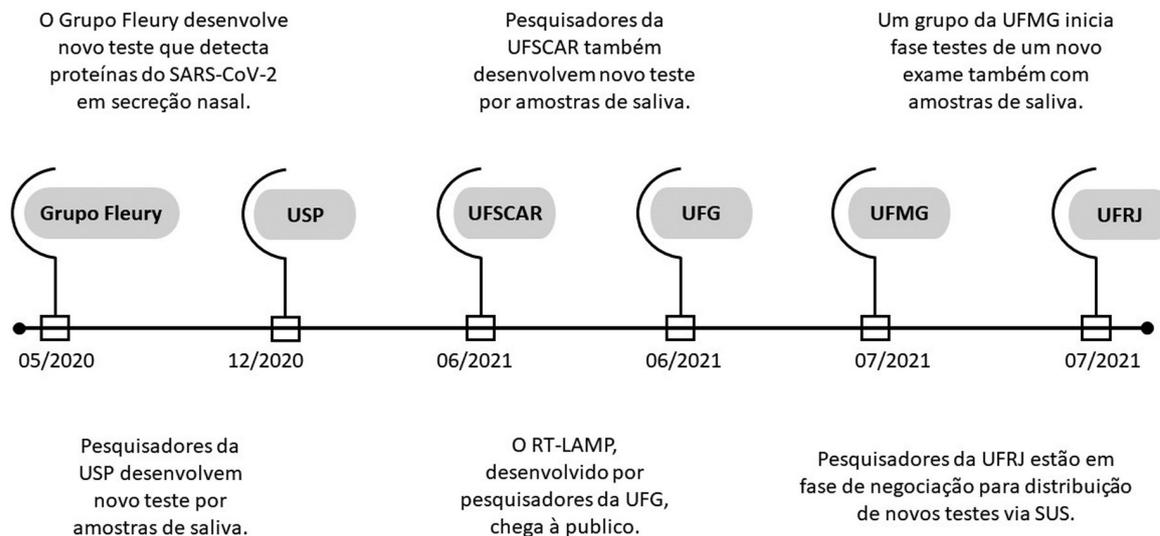


Figura 1. Pesquisas realizadas no Brasil para o desenvolvimento de testes de diagnóstico alternativo para o SARS-CoV-2

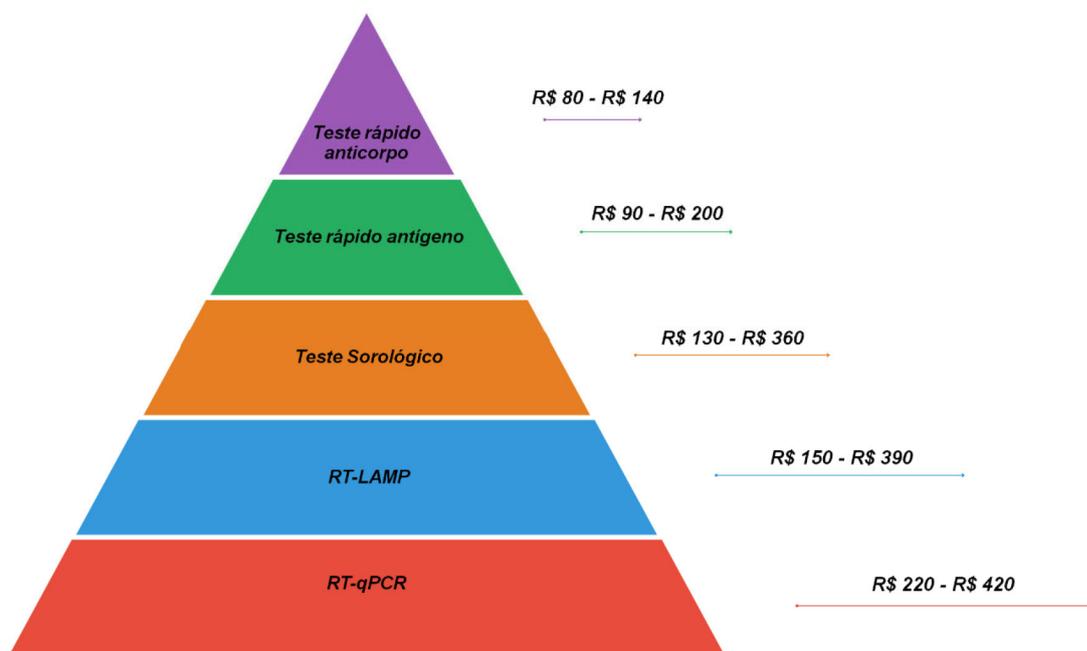


Figura 2. Custo dos exames para o consumidor, na qual o preço mais alto encontra-se na base

ressaltar que a medida perde a validade assim que o Ministério da Saúde suspender o estado de emergência em saúde pública de importância nacional.

Além dos testes rápidos, os outros testes disponíveis em laboratórios de análises clínicas ao consumidor são o teste sorológico, o RT-LAMP e o RT-qPCR. Diferentes laboratórios oferecem diferentes serviços com relação ao teste sorológico, estão disponíveis sorologias para determinação de IgA, IgM e/ou IgG e assim podem ser utilizadas as técnicas de ELISA, CLIA e ECLIA. Como podem ser realizadas as determinações das imunoglobulinas separadamente ou IgM e IgG no mesmo exame, os valores podem variar de R\$ 130,00 a R\$ 360,00.

Os resultados dos testes rápidos podem ser obtidos em um curto período de tempo (aproximadamente 20 min) a partir da análise de algumas gotas de sangue e, como dito anteriormente, é um serviço amplamente oferecido por farmácias, laboratórios e clínicas habilitadas. Porém, apresentam baixa especificidade.^{34,67} Por outro lado, os testes sorológicos convencionais como ELISA são realizados apenas em laboratórios clínicos e demandam um prazo maior para a liberação dos resultados, fornecem uma análise qualitativa ou semi-quantitativa dos anticorpos IgG, IgM, IgA e/ou totais. Além disso, eles podem ser utilizados para reavaliação de eventual viragem sorológica ou aumento do título do anticorpo IgG, quando os resultados estão muito próximos do ponto de corte.³⁴

O RT-LAMP não é um método muito oferecido pelos laboratórios, porém é possível encontrar o kit para venda em algumas redes de drogarias, assim o próprio paciente faz a coleta do material e envia ao laboratório para análise. Como abordado anteriormente, o RT-qPCR é o padrão ouro para o diagnóstico de COVID-19, porém, é o exame de maior custo para o paciente – foram encontrados valores entre R\$ 220,00 e R\$ 420,00. Essa variação é devido à região do país e à urgência do paciente com relação ao resultado, ou seja, alguns laboratórios têm preços variados para o mesmo exame dependendo do tempo de espera do resultado, 24, 48 ou 72 horas.

CONCLUSÕES

A situação pandêmica causada pelo SARS-CovV-2 trouxe a necessidade de utilização, adaptação e desenvolvimento de técnicas e

metodologia específicas para a identificação e quantificação do vírus ou da resposta imunológica. Métodos sorológicos, imunoabsorção, quimioluminescência, moleculares e utilizando biomarcadores possuem custos e sensibilidade clínica e analítica distintas. Maior sensibilidade do teste implica, na maioria das vezes, em maior custo. A expectativa é de aumento nas ofertas de novos métodos com menor custo, maior confiabilidade e rapidez nos resultados.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001; CNPq (303355/2017-4, 424032/2018-0, Schorlaship 142502/2020-0); Finep (CT-INFRA 01/2013-REF 0633/13); RQ-MG (CEX.RED- 00010-14), INCTBio (FAPESP 2014/50867-3, CNPq 465389/2014-7) e Fapemig (Processo APQ-00585-21).

REFERÊNCIAS

- Rothan, H. A.; Byrareddy, S. N.; *J. Autoimmun.* **2020**, *109*, 102433 [Crossref].
- Hasan, S. M. Al; Saulam, J.; Kanda, K.; Hirao; Tomohiro; *Bull. W. H. O.* [Crossref].
- <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331329>, acessada em abril 2022.
- Zand, M.; Wang, J.; *OSF Preprints.*, [Crossref].
- De Sabato, L.; Lelli, D.; Faccin, F.; Canziani, S.; Di Bartolo, I.; Vaccari, G.; Moreno, A.; *Virus Res.* **2019**, *260*, 60 [Crossref].
- Guo, L.; Ren, L.; Yang, S.; Xiao, M.; Chang, D.; Yang, F.; Dela Cruz, C. S.; Wang, Y.; Wu, C.; Xiao, Y.; Zhang, L.; Han, L.; Dang, S.; Xu, Y.; Yang, Q.-W.; Xu, S.-Y.; Zhu, H.-D.; Xu, Y.-C.; Jin, Q.; Sharma, L.; Wang, L.; Wang, J.; *Clin. Infect. Dis.* **2020**, *71*, 778 [Crossref].
- Mehta, P.; McAuley, D. F.; Brown, M.; Sanchez, E.; Tattersall, R. S.; Manson, J. J.; *Lancet* **2020**, *395*, 1033 [Crossref].
- <https://covid19.who.int/>, acessada em Dezembro 2021.
- Mahase, E.; *BMJ* **2020**, *368*, m265 [Crossref].
- Guan, W.; Ni, Z.; Hu, Y.; Liang, W.; Ou, C.; He, J.; Liu, L.; Shan, H.; Lei, C.; Hui, D. S. C.; Du, B.; Li, L.; Zeng, G.; Yuen, K.-Y.; Chen, R.; Tang, C.; Wang, T.; Chen, P.; Xiang, J.; Li, S.; Wang, J.; Liang, Z.; Peng,

- Y.; Wei, L.; Liu, Y.; Hu, Y.; Peng, P.; Wang, J.; Liu, J.; Chen, Z.; Li, G.; Zheng, Z.; Qiu, S.; Luo, J.; Ye, C.; Zhu, S.; Zhong, N.; *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 1708 [Crossref].
11. Oran, D. P.; Topol, E. J.; *Ann. Intern. Med.* **2020**, *173*, 362 [Crossref].
 12. Fleury, M. K.; *Rev. Bras. Anal. Clin.* **2020**, *52*, 131 [http://dx.doi.org/10.21877/2448-3877.20200003].
 13. <https://www.gov.br/saude/pt-br>, acessada em Dezembro 2021.
 14. Long, Q.-X.; Tang, X.-J.; Shi, Q.-L.; Li, Q.; Deng, H.-J.; Yuan, J.; Hu, J.-L.; Xu, W.; Zhang, Y.; Lv, F.-J.; Su, K.; Zhang, F.; Gong, J.; Wu, B.; Liu, X.-M.; Li, J.-J.; Qiu, J.-F.; Chen, J.; Huang, A.-L.; *Nat. Med.* **2020**, *26*, 1200 [Crossref].
 15. Riollano-Cruz, M.; Akkoyun, E.; Briceno-Brito, E.; Kowalsky, S.; Reed, J.; Posada, R.; Sordillo, E. M.; Tosi, M.; Trachtman, R.; Paniz-Mondolfi, A.; *J. Med. Virol.* **2021**, *93*, 424 [Crossref].
 16. Deeks, J. J.; Dinnes, J.; Takwoingi, Y.; Davenport, C.; Spijker, R.; Taylor-Phillips, S.; Adriano, A.; Beese, S.; Dretzke, J.; Ferrante di Ruffano, L.; Harris, I. M.; Price, M. J.; Ditttrich, S.; Emperador, D.; Hooft, L.; Leeftang, M. M. G.; Van den Bruel, A.; *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2020**, CD013652 [Crossref].
 17. Dias, V. M. de C. H.; Carneiro, M.; Michelin, L.; Vidal, C. F. de L.; Costa, L. A. T. J. da C.; Ferreira, C. E. dos S.; Rosseto-Welter, E. A.; Lins, R. S.; Kfoury, R.; Costa, S. F.; Cunha, C. A. da; Chebabo, A.; Rocha, J. L. L.; Bahten, L. C. Von; Silva, L. E. da; Cohen, R. V.; Moura-Neto, J. A.; Nascimento, M. M. do; Oliveira, A. F.; Ribeiro, H. S. de C.; Ribeiro, R.; Carrilho, C. M. D. de M.; *Journal of Infection Control* **2020**, *9*, 90.
 18. Verotti, M. P.; Ramos, M. C.; Henriques, C. M. P.; Elias, F. T. S.; Camargo, E. B.; *Revista Comunicação em Ciências da Saúde* **2020**, *31*, 217.
 19. Hoffman, T.; Nissen, K.; Krambrich, J.; Rönnerberg, B.; Akaberi, D.; Esmaeilzadeh, M.; Salaneck, E.; Lindahl, J.; Lundkvist, Å.; *Infection ecology & epidemiology* **2020**, *10*, 1711576 [Crossref].
 20. Levesque, J.; Maybury, D. W.; *medRxiv* **2020** [Crossref].
 21. <https://www.centerforhealthsecurity.org/covid-19TestingToolkit/serology/Serology-based-tests-for-COVID-19.html>, acessada em abril 2022.
 22. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-issues-emergency-use-authorization-yale-school-public-health>, acessada em abril 2022.
 23. Lima, F. E. T.; Albuquerque, N. L. S. de; Florencio, S. de S. G.; Fontenele, M. G. M.; Queiroz, A. P. O.; Lima, G. A.; Figueiredo, L. M. de; Amorim, S. M. C.; Barbosa, L. P.; *Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde* **2021**, *30*, 1 [Crossref].
 24. Ren, L.-L.; Wang, Y.-M.; Wu, Z.-Q.; Xiang, Z.-C.; Guo, L.; Xu, T.; Jiang, Y.-Z.; Xiong, Y.; Li, Y.-J.; Li, X.-W.; Li, H.; Fan, G.-H.; Gu, X.-Y.; Xiao, Y.; Gao, H.; Xu, J.-Y.; Yang, F.; Wang, X.-M.; Wu, C.; Chen, L.; Liu, Y.-W.; Liu, B.; Yang, J.; Wang, X.-R.; Dong, J.; Li, L.; Huang, C.-L.; Zhao, J.-P.; Hu, Y.; Cheng, Z.-S.; Liu, L.-L.; Qian, Z.-H.; Qin, C.; Jin, Q.; Cao, B.; Wang, J.-W.; *Chin. Med. J. (Beijing, China, Engl. Ed.)* **2020**, *133*, 1015 [Crossref].
 25. Lv, H.; Wu, N. C.; Tsang, O. T.-Y.; Yuan, M.; Perera, R. A. P. M.; Leung, W. S.; So, R. T. Y.; Chan, J. M. C.; Yip, G. K.; Chik, T. S. H.; Wang, Y.; Choi, C. Y. C.; Lin, Y.; Ng, W. W.; Zhao, J.; Poon, L. L. M.; Peiris, J. S. M.; Wilson, I. A.; Mok, C. K. P.; *Cell Rep.* **2020**, *31* [http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107725].
 26. Zhou, P.; Yang, X.-L.; Wang, X.-G.; Hu, B.; Zhang, L.; Zhang, W.; Si, H.-R.; Zhu, Y.; Li, B.; Huang, C.-L.; Chen, H.-D.; Chen, J.; Luo, Y.; Guo, H.; Jiang, R.-D.; Liu, M.-Q.; Chen, Y.; Shen, X.-R.; Wang, X.; Zheng, X.-S.; Zhao, K.; Chen, Q.-J.; Deng, F.; Liu, L.-L.; Yan, B.; Zhan, F.-X.; Wang, Y.-Y.; Xiao, G.-F.; Shi, Z.-L.; *Nature* **2020**, *579*, 270 [Crossref].
 27. Infantino, M.; Grossi, V.; Lari, B.; Bambi, R.; Perri, A.; Manneschi, M.; Terenzi, G.; Liotti, I.; Ciotta, G.; Taddei, C.; Benucci, M.; Casprini, P.; Veneziani, F.; Fabbri, S.; Pompetti, A.; Manfredi, M.; *J. Med. Virol.* **2020**, *92*, 1671 [Crossref].
 28. Grossberg, A. N.; Koza, L. A.; Ledreux, A.; Prusmack, C.; Krishnamurthy, H. K.; Jayaraman, V.; Granholm, A.-C.; Linseman, D. A.; *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 740 [Crossref].
 29. Patrinos, G. P.; Danielson, P. B.; Ansoorge, W. J.; *Molecular Diagnostics*, 3rd ed., Academic Press: Cambridge, 2017.
 30. Taleghani, N.; Taghipour, F.; *Biosens. Bioelectron.* **2021**, *174*, 112830 [Crossref].
 31. Ratre, Y. K.; Kahar, N.; Bhaskar, L. V. K. S.; Bhattacharya, A.; Verma, H. K.; *3 Biotech* **2021**, *11*, 94 [Crossref].
 32. Kralik, P.; Ricchi, M.; *Frontiers in Microbiology* **2017**, *8*, 108 [Crossref].
 33. Gonçalves, J. O.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2014.
 34. Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial. *Revista Notícias – Medicina Laboratorial* **2020**, *105*, 16.
 35. Sinha, N.; Balayla, G.; *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões* **2020**, *47*, 1 [Crossref].
 36. Udugama, B.; Kadhiresan, P.; Kozłowski, H. N.; Malekjahani, A.; Osborne, M.; Li, V. Y. C.; Chen, H.; Mubareka, S.; Gubbay, J. B.; Chan, W. C. W.; *ACS Nano* **2020**, *14*, 3822 [Crossref].
 37. Corman, V. M.; Landt, O.; Kaiser, M.; Molenkamp, R.; Meijer, A.; Chu, D. K. W.; Bleicker, T.; Brünink, S.; Schneider, J.; Schmidt, M. L.; Mulders, D. G. J. C.; Haagmans, B. L.; van der Veer, B.; van den Brink, S.; Wijsman, L.; Goderski, G.; Romette, J.-L.; Ellis, J.; Zambon, M.; Peiris, M.; Goossens, H.; Reusken, C.; Koopmans, M. P. G.; Drosten, C.; *Eurosurveillance* **2020**, *25* [Crossref].
 38. Fu, S.; Qu, G.; Guo, S.; Ma, L.; Zhang, N.; Zhang, S.; Gao, S.; Shen, Z.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2011**, *163*, 845 [Crossref].
 39. Kashir, J.; Yaqinuddin, A.; *Med. Hypotheses* **2020**, *141*, 109786 [Crossref].
 40. Notomi, T.; *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, e63 [Crossref].
 41. Mori, Y.; Kanda, H.; Notomi, T.; *J. Infect. Chemother.* **2013**, *19*, 404 [Crossref].
 42. Kidd, S. P.; Burns, D.; Armson, B.; Beggs, A. D.; Howson, E. L. A.; Williams, A.; Snell, G.; Wise, E. L.; Goring, A.; Vincent-Mistiaen, Z.; Grippon, S.; Sawyer, J.; Cassar, C.; Cross, D.; Lewis, T.; Reid, S. M.; Rivers, S.; James, J.; Skinner, P.; Banyard, A.; Davies, K.; Ptasińska, A.; Whalley, C.; Ferguson, J.; Bryer, C.; Poxon, C.; Bosworth, A.; Kidd, M.; Richter, A.; Burton, J.; Love, H.; Fouch, S.; Tillyer, C.; Sowood, A.; Patrick, H.; Moore, N.; Andreou, M.; Morant, N.; Houghton, R.; Parker, J.; Slater-Jefferies, J.; Brown, I.; Gretton, C.; Deans, Z.; Porter, D.; Cortes, N. J.; Douglas, A.; Hill, S. L.; Godfrey, K. M.; Fowler, V. L.; *J. Mol. Diagn.* **2022**, no prelo [Crossref].
 43. Huang, X.; Tang, G.; Ismail, N.; Wang, X.; *EBioMedicine* **2022**, *75* [Crossref].
 44. Jamwal, V. L.; Kumar, N.; Bhat, R.; Jamwal, P. S.; Singh, K.; Dogra, S.; Kulkarni, A.; Bhadra, B.; Shukla, M. R.; Saran, S.; Dasgupta, S.; Vishwakarma, R. A.; Gandhi, S. G.; *Virol. J.* **2021**, *18*, 178 [Crossref].
 45. Huang, W. E.; Lim, B.; Hsu, C.; Xiong, D.; Wu, W.; Yu, Y.; Jia, H.; Wang, Y.; Zeng, Y.; Ji, M.; Chang, H.; Zhang, X.; Wang, H.; Cui, Z.; *Microb. Biotechnol.* **2020**, *13*, 950 [Crossref].
 46. Sharma, B.; Shahanshah, M. F. H.; Gupta, S.; Gupta, V.; *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2021**, *21*, 475 [Crossref].
 47. Vandenberg, O.; Martiny, D.; Rochas, O.; van Belkum, A.; Kozlakidis, Z.; *Nat. Rev. Microbiol.* **2021**, *19*, 171 [Crossref].
 48. Huang, S.; Yang, J.; Fong, S.; Zhao, Q.; *Int. J. Biol. Sci.* **2021**, *17*, 1581 [Crossref].
 49. Kevadiya, B. D.; Machhi, J.; Herskovitz, J.; Oleynikov, M. D.; Blomberg, W. R.; Bajwa, N.; Soni, D.; Das, S.; Hasan, M.; Patel, M.; Senan, A. M.; Gorantla, S.; McMillan, J.; Edagwa, B.; Eisenberg, R.; Gurumurthy, C. B.; Reid, S. P. M.; Punyadeera, C.; Chang, L.; Gendelman, H. E.; *Nat. Mater.* **2021**, *20*, 593 [Crossref].

50. Shan, B.; Broza, Y. Y.; Li, W.; Wang, Y.; Wu, S.; Liu, Z.; Wang, J.; Gui, S.; Wang, L.; Zhang, Z.; Liu, W.; Zhou, S.; Jin, W.; Zhang, Q.; Hu, D.; Lin, L.; Zhang, Q.; Li, W.; Wang, J.; Liu, H.; Pan, Y.; Haick, H.; *ACS Nano* **2020**, *14*, 12125 [Crossref].
51. Caruso, F. P.; Scala, G.; Cerulo, L.; Ceccarelli, M.; *Brief. Bioinform.* **2021**, *22*, 701 [Crossref].
52. <https://jornal.usp.br/ciencias/usp-disponibiliza-teste-para-diagnosticar-covid-19-pela-saliva/>, acessada em abril 2022.
53. <https://www.fleury.com.br/noticias/novo-teste-covid19>, acessada em abril 2022.
54. <https://www2.ufscar.br/noticia?codigo=13800>, acessada em abril 2022.
55. <https://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2021-07/ufjr-desenvolve-teste-de-baixo-custo-para-deteccao-de-covid-19>, acessada em abril 2022.
56. <https://g1.globo.com/go/goias/noticia/2021/06/07/mais-rapido-e-barato-teste-de-covid-19-desenvolvido-pela-ufg-comeca-a-ser-aplicado-por-laboratorio-em-goiania.ghtml>, acessada em abril 2022.
57. <https://ufmg.br/comunicacao/noticias/laboratorio-da-ufmg-testa-uso-de-amostras-salivares-para-o-diagnostico-da-covid-19>, acessada em abril 2022.
58. <https://www.cnnbrasil.com.br/saude/2021/07/15/teste-de-covid-19-desenvolvido-pela-ufjr-da-diagnostico-em-menos-de-uma-hora>, acessada em abril 2022.
59. <https://www.ufg.br/n/140571-ufg-assina-contratos-de-transferencia-tecnologica-do-teste-rt-lamp>, acessada em Dezembro 2021.
60. Santos, P. C. J. de L.; *Hematologia - Métodos e Interpretação - Série Análises Clínicas e Toxicológicas*, 1ª ed., Roca: São Paulo, 2012.
61. Martins, M.; Matos, A. C.; Coelho, P.; Rodrigues, F.; *HIGEIA – Revista Científica da Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias do Instituto Politécnico de Castelo Branco*, **2021**, Edição Especial – COVID-19, 19.
62. Watson, J.; Whiting, P. F.; Brush, J. E.; *BMJ* **2020**, *369*, m1808 [Crossref].
63. Surkova, E.; Nikolayevskyy, V.; Drobniewski, F.; *Lancet Respir. Med.* **2020**, *8*, 1167 [Crossref].
64. To, K. K.-W.; Tsang, O. T.-Y.; Yip, C. C.-Y.; Chan, K.-H.; Wu, T.-C.; Chan, J. M.-C.; Leung, W.-S.; Chik, T. S.-H.; Choi, C. Y.-C.; Kandamby, D. H.; Lung, D. C.; Tam, A. R.; Poon, R. W.-S.; Fung, A. Y.-F.; Hung, I. F.-N.; Cheng, V. C.-C.; Chan, J. F.-W.; Yuen, K.-Y.; *Clin. Infect. Dis.* **2020**, *71*, 841 [Crossref].
65. Li, Y.; Yao, L.; Li, J.; Chen, L.; Song, Y.; Cai, Z.; Yang, C.; *J. Med. Virol.* **2020**, *92*, 903 [Crossref].
66. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 377, de 28 de abril de 2020. Autoriza, em caráter temporário e excepcional, a utilização de “testes rápidos” (ensaios imunocromatográficos) para a COVID-19 em farmácias, suspende os efeitos do § 2º do art. 69 e do art. 70 da Resolução de Diretoria Colegiada – RDC nº 44, de 17 de agosto de 2009. Brasília: Diário Oficial da União, 2020.
67. Beeching, N. J.; Fletcher, T. E.; Beadsworth, M. B. J.; *BMJ* **2020**, *369*, 1 [Crossref].