

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS-UFMG
Instituto De Ciências Biológicas
Departamento De Microbiologia
Curso de Mestrado Profissional em Microbiologia Aplicada

ANGÉLICA BARBOSA DA CUNHA

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO DESEMPENHO DE UM TESTE RÁPIDO NA
DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG E IgM CONTRA O SARS-CoV-2**

Belo Horizonte
Dezembro de 2021

ANGÉLICA BARBOSA DA CUNHA

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO DESEMPENHO DE UM TESTE RÁPIDO NA
DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG e IgM CONTRA O SARS-CoV-2**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Microbiologia Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de mestre em Microbiologia.

Linha de Pesquisa: Diagnóstico Microbiológico e Epidemiologia

Orientador: Prof. PhD. Pedro Augusto Alves, UFMG, FIOCRUZ.

Belo Horizonte

Dezembro de 2021

043

Cunha, Angélica Barbosa da.

Avaliação comparativa do desempenho de um teste rápido na detecção de anticorpos IgG e IgM contra o SARS-CoV-2 [manuscrito] / Angélica Barbosa da Cunha. – 2021.

47 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. PhD. Pedro Augusto Alves.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Covid-19. 3. Aprovação de Teste para Diagnóstico. I. Alves, Pedro Augusto. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MESTRADO PROFISSIONAL EM MICROBIOLOGIA APLICADA

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PROFISSIONAL DE

ANGÉLICA BARBOSA DA CUNHA

Nº REGISTRO 2019753248

Às 10 horas do dia 14 de dezembro de 2021, reuniu-se, de forma virtual, na plataforma TEAMS, a Comissão Examinadora composta pela Dra. Karine Lima Lourenço, CT Vacinas UFMG, Dra. Ana Paula Moreira Franco Luiz, Instituto René Rachou, e o Prof. Pedro Augusto Alves, orientador do Curso de Mestrado Profissional em Microbiologia Aplicada, para julgar o trabalho final, **AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO DESEMPENHO DE UM TESTE RÁPIDO NA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgG E IgM CONTRA O SARS-CoV-2**, da candidata, ANGÉLICA BARBOSA DA CUNHA, requisito final para obtenção do grau de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Erna Geessien Kroon – Coordenadora do Curso, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Em seguida, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata, e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 14 de dezembro de 2021.

Dra. Karine Lima Lourenço

Dra. Ana Paula Moreira Franco Luiz

Prof. Pedro Augusto Alves (Orientador)



Documento assinado eletronicamente por **Erna Geessien Kroon, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 14/12/2021, às 15:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Karine Lima Lourenço, Usuário Externo**, em 15/12/2021, às 09:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Pedro Augusto Alves, Usuário Externo**, em 16/12/2021, às 10:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula Moreira Franco Luiz, Usuária Externa**, em 20/12/2021, às 10:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1146966** e o código CRC **F7FE8CB7**.

Dedico

À minha amada mãe, que sempre foi um exemplo de força e coragem e às minhas duas diferentes, intensas e imensas formas de amor, Alice e Lídia

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me proporcionar conhecer um pouco mais sobre a vida, sobretudo a microscópica. Por dar saúde e forças para seguir esse caminho intenso e gratificante. Por ter me dado a oportunidade de viver essa experiência grandiosa.

À minha mãe, que me ensinou como lutar e conquistar os meus objetivos com sua forma única de ser. Tenho certeza que estive em todas as suas orações nesse período.

Ao meu amor, presente nas melhores e piores fases desse trajeto. Pela paciência e por aguentar minhas loucuras e desespero. Por ter sido a pessoa que me mostrou esse caminho, acreditando mais em mim do que eu mesma. Disse: vai lá que já deu certo!

Ao meu orientador, PhD. Pedro Augusto Alves, por ter me acolhido como aluna e ter me auxiliado para que novos conhecimentos fossem adquiridos e outros aprimorados.

À coordenação do Mestrado Profissional em Microbiologia Aplicada da UFMG, especialmente a Professora Dra. Erna Kroon, pois sem ela não haveria essa oportunidade. E, aos professores que ensinaram com excelência cada disciplina cursada. Em especial agradeço o professor Dr. Jônatas Santos Abrahão, por ter dado uma disciplina desafiadora fazendo-me compreender que o conhecimento não tem limites, tampouco nossa capacidade de aprender.

Ao diretor da Biocon, Giuliano Araújo, que proporcionou insumos e garantiu que fosse possível esse estudo. Agradeço pela confiança e oportunidade de crescimento profissional e acadêmico durante esse período.

Ao pesquisador Dr. Flávio da Fonseca por ter disponibilizado prontamente amostras para o início dos ensaios e ao pesquisador Dr. Ricardo Gazzinelli que gentilmente cedeu as amostras de pacientes vacinados para esse estudo.

E, não menos importante, às pesquisadoras Dra. Beatriz Senra A. Silva Santos, Dra. Ana Paula Moreira Franco Luiz e Dra. Karine Lima Lourenço por compor a banca para defesa e ter aceito prontamente o convite para avaliar esse trabalho.

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.”

Marie Curie

RESUMO

Iniciada em 2019 a COVID-19 é uma doença que tem como agente etiológico o coronavírus SARS-CoV-2 que possui em sua constituição, duas proteínas estruturais principais a Spike (S) e a Nucleoproteína (N) que envolve o ácido ribonucleico (RNA) genômico viral. Assim, os anticorpos produzidos durante a infecção geralmente tem como alvo essas proteínas virais. A técnica padrão-ouro de detecção da doença é a transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR). Porém, outras metodologias mais rápidas e com menor custo, como os testes rápidos estão sendo utilizados no Brasil. Avaliar e garantir a qualidade desses testes é importante para que o diagnóstico laboratorial correto seja aplicado. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o desempenho de um teste rápido para detecção de anticorpos anti SARS-CoV-2 por método de comparabilidade com as metodologias ELISA, RT-PCR e imunofluorescência. Utilizando 42 amostras positivas, 30 amostras negativas para anticorpos anti SARS-CoV-2 e 28 de indivíduos vacinados com Coronavac. A performance do kit foi determinada pelos parâmetros de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN, repetibilidade, reprodutibilidade e variação de temperatura. Testes estatísticos como índice kappa, teste de McNemar, teste de Mann-Whitney foram aplicados para apontar diferenças significativas, demonstrar proporções similares ou diferentes entre os resultados e determinar o nível de confiabilidade do teste e os gráficos foram gerados pelo *software* GraphPad PRISM 9. O kit avaliado apresentou 95,23% de sensibilidade e especificidade de 100%. O VPP para o ensaio foi de 100% e o VPN de 93,75%. Além de boa correlação quando comparado aos resultados da imunofluorescência para amostras de vacinados por Coronavac ($X^2 p= 0,125$) e ($k = 0,510 p = 0,004$). O estudo demonstrou bom desempenho do kit para detecção de anticorpos durante a infecção por SARS-CoV-2, que foi de encontro a outros estudos semelhantes, principalmente relacionado à especificidade do teste. Os dados obtidos quanto a amostras de vacinados indicam que há necessidade de avaliar a utilização desses kits em populações altamente vacinadas contra o SARS-CoV-2.

Palavras-chave: Teste rápido. Ensaio de desempenho. COVID-19.

ABSTRACT

Initiated in 2019, COVID-19 is a disease whose etiological agent is the SARS-CoV-2 coronavirus, which has in its constitution, two main structural proteins, Spike (S) and Nucleoprotein (N) that involves ribonucleic acid (RNA) viral genomics. Thus, antibodies produced during infection usually target these viral proteins. The gold standard technique for detecting the disease is reverse transcription followed by quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). However, other faster and less expensive methodologies, such as rapid tests, are being used in Brazil. Evaluating and ensuring the quality of these tests is important for the correct laboratory diagnosis to be applied. Thus, the objective of this work was to evaluate the performance of a rapid test for the detection of antibodies against SARS-CoV-2 by a comparability method with ELISA, RT-PCR and immunofluorescence methodologies. Using 42 positive samples, 30 negative samples for anti-SARS-CoV-2 antibodies and 28 samples from Coronavac vaccinated individuals. Kit performance was determined by the parameters of sensitivity, specificity, PPV, NPV, repeatability, reproducibility and temperature variation. Statistical tests such as kappa index, McNemar test, Mann-Whitney test were applied to point out significant differences, demonstrate similar or different proportions between the results and determine the level of test reliability and the graphs were generated by the GraphPad PRISM 9 software. The kit evaluated showed a sensitivity of 95.23% and a specificity of 100%. The PPV for the test was 100% and the NPV was 93.75%. In addition to a good correlation when compared to the results of immunofluorescence for samples of vaccinated by Coronavac (X^2 $p= 0.125$) and ($k = 0.510$ $p = 0.004$). The study demonstrated a good performance of the kit for detecting antibodies during SARS-CoV-2 infection, which was against other similar studies, mainly related to the specificity of the test. The data obtained from samples of vaccinates indicate that there is a need to evaluate the use of these kits in populations highly vaccinated against SARS-CoV-2.

Keywords: Rapid test. Performance test. COVID-19.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Genoma SARS-CoV-2.....	18
Figura 2. Esquema de interação entre as nsps dos coronavírus.....	19
Figura 3. Representação das proteínas do SARS-CoV-2.....	21
Figura 4 - Interação viral com proteínas de membrana da célula hospedeira	22
Figura 5. Resposta específica de anticorpos do SARS-CoV-2.....	24
Figura 6. Componentes do teste imunocromatográfico.....	28
Figura 7 - Diagrama de Jablonski - Estágios da fluorescência.....	30
Figura 8. Diferenças de excitação e emissão de fluorescência	31
Figura 9. Fluxograma dos métodos empregados	37
Figura 10. Interpretação dos testes imunocromatográficos	38
Figura 11 - AFR200, dispositivos testes e leitor de códigos de barras.....	39
Figura 12. Porcentagem de amostras positivas para RT-PCR em relação ao total de amostras positivas para IgG IgM	43
Figura 13. Porcentagem de amostras positivas na USP para IgM.....	43
Figura 14. Número de amostras positivas no teste rápido para IgG e IgM.....	44
Figura 15. Resultados das amostras 10 (a), 29 (b) e 36 (c).....	45
Figura 16 - Percentual de linhas testes IgG IgM apresentadas nos testes rápidos de acordo com a intensidade de cor.....	46
Figura 17. Índice ELISA IgG x Resultados IgG testes rápidos.....	48
Figura 18. Relação entre sinal analítico Imunofluorescência e resultados obtidos nos testes rápidos IgG.....	51
Figura 19. Relação sinal analítico e resultados da imunofluorescência IgG anti-RBD ...	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Sinal analítico (DPP)	35
Tabela 2 – Resultados amostras reagentes para IgG e ou IgM e relação com índice ELISA .	47
Tabela 3 - Tabulação cruzada - McNemar ELISA IgG x Teste rápido IgG/IgM.....	48
Tabela 4 - Amostras relacionadas de Resumo de Teste de Mudança de McNemar	49
Tabela 5 - Tabulação cruzada -Kappa ELISA IgG x Teste Rápido IgG.....	49
Tabela 6 - Amostras relacionadas de Resumo de Teste Kappa	49
Tabela 7 - Resultados Teste Rápido IgG x Índice RBD FIA 1-14	50
Tabela 8 - Resultados Teste Rápido IgG x Índice RBD FIA 15-28	50
Tabela 9 - Tabulação cruzada - McNemar RBD IgG * Teste rápido IgG	52
Tabela 10 - Amostras relacionadas de Resumo de Teste de Mudança de McNemar	53
Tabela 11 - Tabulação cruzada - Kappa RBD IgG * Teste rápido IgG	53
Tabela 12 - Amostras relacionadas de Resumo de Teste de Mudança de McNemar	53

LISTA DE SIGLAS

+ssRNA	RNA fita simples com polaridade positiva
ACE2	Enzima de Conversão da Angiotensina 2
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
COVID-19	<i>Coronavirus Disease 2019</i>
CoVs	Coronavírus
E	Proteína do envelope
ECA	Sistema renina-angiotensina
ELISA	Ensaio de Imuno Absorção Enzimática
Eu	Európio
IgA	Imunoglobulina do tipo A
IgG	Imunoglobulina do tipo G
IgM	Imunoglobulina do tipo M
IL	Interleucina
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INF	Interferon
LED	<i>Light-emitting diode</i>
M	Proteína de membrana
MERS	<i>Middle East Respiratory</i>
MHC	Imunocomplexo principal de histocompatibilidade
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
N	Nucleoproteína
NSPs	Proteínas não-estruturais
NTD	Domínio N-terminal
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PHB	Proibiotina
RBD	Domínio de ligação ao receptor
RNA	Ácido ribonucleico
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase -Transcrição Reversa quantitativa

S	Spike
SIM-P	Síndrome Inflamatória Multissistêmica Pediátrica
SRAG	Síndrome Respiratória Aguda Grave
TLRs	Receptores do tipo <i>toll-likers</i>
TMPRSS2	Protease transmembrana serina do tipo 2
TNF	Fator de necrose tumoral
USP	Universidade Federal de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 <i>Histórico e epidemiologia</i>	16
1.2. <i>Doença e transmissão</i>	17
1.3. <i>Agente etiológico</i>	18
1.4. <i>Infecção e imunopatogênese</i>	22
1.5. <i>Tratamento e Vacina</i>	25
1.6. <i>Diagnóstico Laboratorial</i>	26
1.6.1. Método molecular	26
1.6.2. Testes imunocromatográficos	26
1.6.2.1. Detecção rápida de antígenos do SARS-CoV-2.....	27
1.6.2.2. Detecção de anticorpos IgG/ IgM.....	28
1.6.3. Imunoensaio rápido por fluorescência	29
1.6.5. Ensaio de Desempenho	31
2 JUSTIFICATIVA.....	32
3 OBJETIVO GERAL.....	33
4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
5 MATERIAIS.....	34
5.1. <i>Amostras</i>	34
5.1.1. Amostras reagentes para IgG anti SARS-CoV-2	35
5.1.2. Amostras reagentes IgM DPP	35
5.1.3. Amostras reagentes RT-qPCR	35
5.1.4. Amostras reagentes IgM USP	35
5.1.5. Amostras clínicas negativas para SARS-CoV-2	35
5.1.6. Amostras de vacinados com Coronavac	36
6 MÉTODOS.....	37
6.1. <i>Testes imunocromatográficos</i>	37
6.1.1. Interpretação dos resultados	38
6.2. <i>Imunofluorescência</i>	39
6.2.1. Interpretação dos Resultados	40

7 PERFORMANCE CLÍNICA.....	40
7.1. <i>Sensibilidade.....</i>	40
7.2. <i>Especificidade.....</i>	40
7.3. <i>Valor preditivo positivo (VPP)</i>	40
7.4. <i>Valor preditivo negativo (VPN)</i>	40
7.5. <i>Reprodutibilidade.....</i>	41
7.6. <i>Repetibilidade.....</i>	41
7.7. <i>Variação de temperatura.....</i>	41
7.8. <i>Análises estatísticas.....</i>	41
7.8.1. Índice kappa.....	41
7.8.2. Teste de McNemar.....	41
7.8.3. Teste de Mann-Whitney.....	42
7.8.9. Geração dos dados gráficos.....	42
8 RESULTADOS.....	43
8.1. <i>Resultados reagentes e não reagentes.....</i>	43
8.2. <i>Amostras de indivíduos vacinados.....</i>	50
9 DISCUSSÃO.....	54
10 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
REFERÊNCIAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

1.1. Histórico e epidemiologia

Em dezembro de 2019, na cidade de Wuhan, China, casos de indivíduos com pneumonia viral desconhecida foram relatados (LI et al., 2020) e seu patógeno, um novo membro da família Coronaviridae, foi sequenciado e isolado (ZHOU et al., 2020). No final de janeiro do ano seguinte, a OMS definiu o surto ocorrido como Emergência Internacional de Saúde Pública devido sua transmissão de humano para humano, qual pode acometer o trato respiratório ocasionando danos graves aos indivíduos (HU et al., 2020) (COUTARD et al., 2020).

Somando mais de 386 milhões de casos de COVID-19 no mundo, mais de 5 milhões de casos fatais foram reportados. No Brasil, são contabilizados mais de 25 milhões de pessoas que se infectaram e dessas, mais de 600 mil foram à óbito por complicações da doença (dados consultados em 4 de fevereiro de 2022) (WHO, 2021). Desde meados de fevereiro de 2021, o Brasil tem mantido sua posição entre os três países com maior número de infectados e mortos. Do total de mortes, o Sudeste do país representa 47,52% e o Nordeste 19,51%, classificadas até o momento como as regiões brasileiras com maior número de vítimas da COVID-19 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021a).

Surtos envolvendo vírus da mesma espécie do SARS-CoV-2 marcaram o ano de 2002, quando, no sudeste da China em Hong Kong, o SARS-CoV (*Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus*) acometeu aproximadamente 8.437 indivíduos, desses, mais de 800 mortes foram notificadas (DE WILDE, 2012). O SARS-CoV foi identificado no ano de 2005 como um agente causador de zoonoses tendo como reservatório morcegos da espécie *Rhinolophus mehelyi* e hospedeiros intermediários mamíferos da espécie *Civettictis civetta* no ciclo de transmissão para humanos (DE WILDE, 2012). Ainda, em 2012, o vírus MERS (*Middle East respiratory syndrome-related coronavirus*) foi isolado a partir de amostra das vias aéreas (escarro) de um homem com 60 anos, na Arábia Saudita, que foi a óbito por complicações relacionadas à infecção (ZAKI et al., 2012). Esse microrganismo acomete anualmente habitantes da região do Mediterrâneo Oriental e a maior parte das notificações de doenças relacionadas são da Arábia Saudita (WHO, 2019). Graves distúrbios sistêmicos em seres humanos podem ser desencadeados devido ao contágio que se dá geralmente por camelos infectados, hospedeiros intermediários do MERS (DE WILDE, 2012).

Estudos inferem que, pela proximidade gênica entre o SARS-CoV e o SARS-CoV-2, a doença pandêmica COVID-19, pode ter tido seu início a partir da transmissão de um patógeno derivado do SARS-CoV para o ser humano, por algum intermediário mamífero, ainda desconhecido, provavelmente o pangolim malaio da espécie *Manis javanica*.(KADAM et al., 2021a).

1.2. Doença e transmissão

A COVID-19 é uma doença infectocontagiosa causada pelo coronavírus SARS-CoV-2, transmitida entre humanos (LI et al., 2020b) por meio de gotículas de saliva, secreções expelidas pela tosse, espirro e por contato com superfícies contaminadas (JIANG; HILLYER; DU, 2020). No início da pandemia, estudos demonstraram que o período de incubação do SARS-CoV-2 poderia variar de indivíduo para indivíduo, sendo a média de 5.2 dias em 425 casos de infectados (LI et al., 2020b).

Alguns indivíduos podem se infectar e não desenvolver a doença. Os sinais e sintomas que envolvem a COVID-19, em pessoas que os manifestam, são diversos e estão associados à sua gravidade. Dentre os quais estão febre alta, tosse, fadiga, falta de apetite os mais relatados em casos mais leves. Outros sintomas também são reportados como dor de cabeça, náusea, vômitos e diarreia e alguns indivíduos são acometidos por disgeusia e anosmia (DHAMA et al., 2020). O agravamento da doença está relacionado com destruição de microvasculatura, pneumonia grave, falência múltipla sistêmica, infecções gastrointestinais, edema pulmonar, falência respiratória hipoxêmica, Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), falência renal, hepática e pancreática (LI et al., 2020b)(RABAAN et al., 2020).

Além disso, manifestações secundárias à infecção pelo SARS-CoV-2 têm sido relatadas. A Síndrome Inflamatória Multissistêmica Pediátrica (SIM-P) que acomete crianças é uma delas. Seus sinais e sintomas como febre alta persistente, erupções cutâneas, conjuntivite e edema periférico estão relacionados à disfunção orgânica grave, esses são semelhantes aos da rara síndrome de Kawasaki (RIPHAGEN et al., 2020).

1.3. Agente etiológico

O SARS-CoV-2 pertence à família *Coronaviridae*, ao gênero *Betacoronavirus* e ao subgênero *Sarbecovirus* (DE GROOT et al., 2020). Além disso, sua subfamília *Orthocoronavirinae* contém quatro gêneros distintos: *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus*, capazes de causar doenças em mamíferos, incluindo os humanos e os *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus* relacionados a infecções em aves (WANG et al., 2020b) (SU et al., 2016).

Os coronavírus (CoVs) são vírus envelopados de RNA fita simples com polaridade positiva (+ssRNA) (27 a 32 Kb) e seu genoma contém pelo menos seis fases de leitura aberta, as ORF's (do inglês *Open Reading Frame*). As ORF1a/b compreendem 2/3 do genoma e codificam duas grandes poliproteínas, as replicases pp1a e pp1ab (figura 1) (DE GROOT et al., 2020). Essas são essenciais para a replicação, pois a partir da clivagem proteolítica das mesmas, executadas pelas proteínas nsp3 e nsp5, são originadas 16 proteínas não-estruturais (nsps1-16) das quais participam efetivamente desse processo (KADAM et al., 2021a). Além disso outras ORF's estão presentes, relacionadas principalmente, à tradução de proteínas estruturais S (*spike*), E (proteína do envelope), M (proteína de membrana) e N (nucleoproteína) e os genes de codificação de proteínas acessórias (figura 1) (HU et al., 2020).

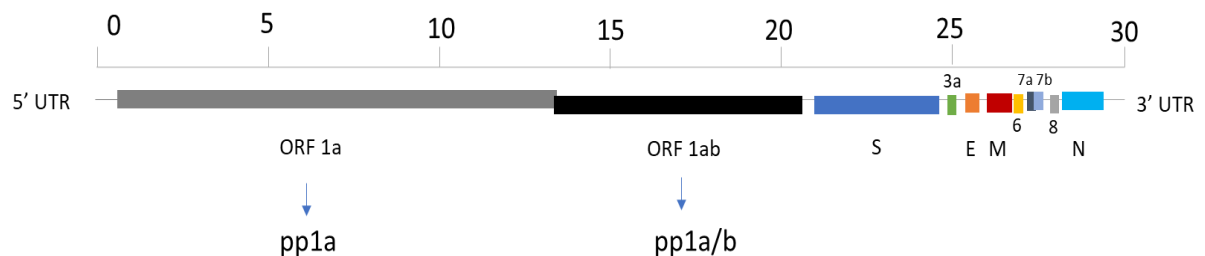


Figura 1. Genoma SARS-CoV-2. Representação esquemática do genoma do SARS-CoV-2. Clivagem das ORF1 e ORF2, das quais são originadas as poliproteínas pp1a e pp1a/b. Ainda, os genes de codificação das proteínas estruturais S, E, M e N e proteínas acessórias 3a, 7a, 7b, 6 e 8. Tamanho aproximado do genoma viral 30kb. Fonte: Adaptado de KIM et. al., 2020.

Como mencionado anteriormente, as nsps estão relacionadas a vários processos do ciclo de multiplicação viral dos coronavírus e particularidades as envolvem principalmente por atuarem em conjunto em muitas atividades, formando entre si interações e consequente maquinaria de replicação e tendo as nsp12 e nsp8 centralizadas nessa rede (figura 2).

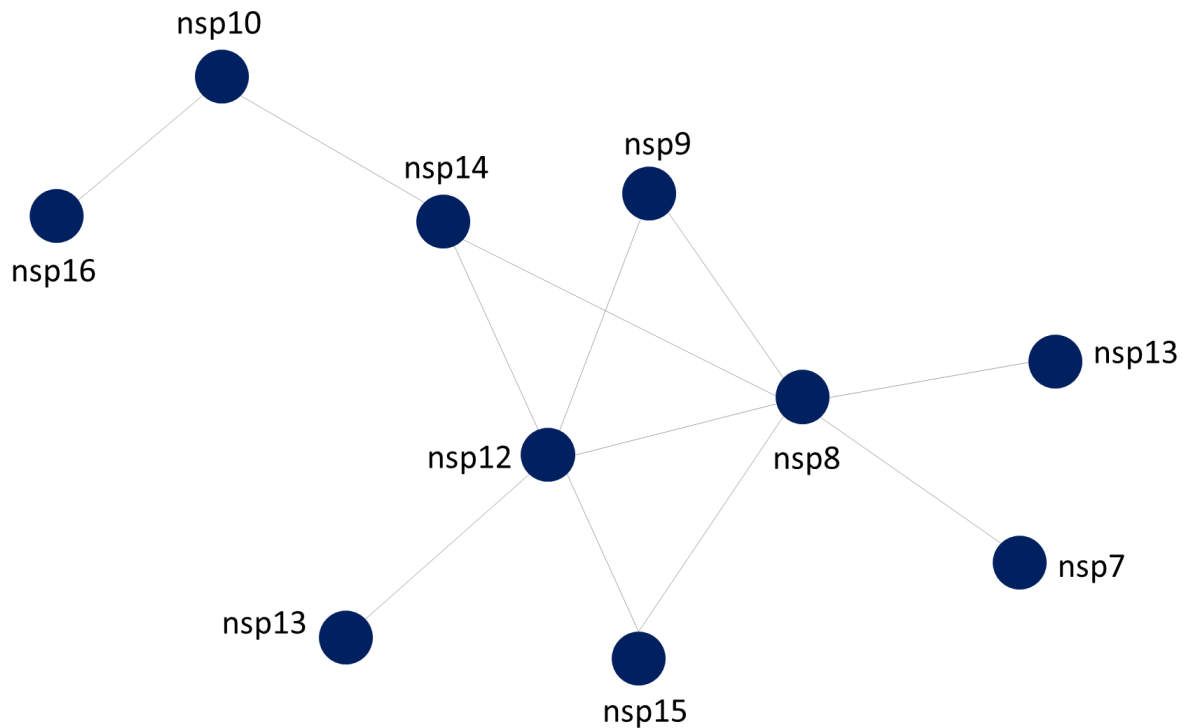


Figura 2. Esquema de interação entre as nsps dos coronavírus. Rede de interações entre as proteínas não estruturais do SARS-CoV-2. Das quais as nsp12 e nsp8 estão centralizadas nessa rede, formando complexas ligações e comunicação com as outras proteínas presentes: nsp16, nsp10, nsp14, nsp9, nsp13, nsp7 e nsp15. Fonte: Adaptado de Romano et. al., 2020

Em geral, estudos indicam que as primeiras proteínas não estruturais nsp1 e nsp2 codificadas pela região 5' estão associadas à interação com proteínas humanas (VANDELLI et al., 2020). Especificamente, os achados demonstram que a nsp1 interage com a subunidade ribossômica das células do hospedeiro previamente infectadas pelo SARS-CoV-2 inibindo a tradução de proteínas celulares (SCHUBERT et al., 2020) e a nsp2 interfere na sinalização celular, se associando a proteínas proibiotina 1 (PHB1) e PHB2, as quais são importantes para funcionamento, morfologia mitocondrial e multiplicação celular (CORNILLEZ-TY et al., 2009). Por outro lado, as funções da proteína nsp3 ainda não foram totalmente elucidadas, sendo descritas algumas atividades como clivagem da poliproteína pp1a e interação com a proteína N na interferência das vias lipídicas do hospedeiro, influenciando nas funções da proteína relacionada à diferenciação de adipócitos estabilizadora de gotículas lipídicas (ADRP) (MALIK, [s.d.]). Ainda, é atuante na formação de vesículas de membrana dupla, que é o redirecionamento e reorganização membranar do retículo endoplasmático celular, juntamente

com a nsp4 e nsp6. Ademais, estudos sugerem que essas são capazes de proteger o dsRNA de sensores da imunidade inata do hospedeiro e impedir sua degradação (ANGELINI et al., 2013).

Ainda, as nsps dos CoVs mantêm outras propriedades funcionais. Assim, até então, a função estabelecida da nsp5 é de protease, com papel principal de clivagem da pp1a/b, tendo grande importância na formação das outras nsps (5-16) (KADAM et al., 2021b). E, as nsp7 e nsp8 colaboram para que a nsp12, mais conhecida como RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) atue com mais eficiência em funções de revisão e modificação do RNA viral, favorecendo a eliminação de erros de leitura gênica (KADAM et al., 2021b). Também está atrelada como revisora de RNA, garantindo maior fidelidade na replicação, a coenzima nsp 14, da qual é ativada pela nsp10 e provável indução de nsp7 (ROMANO et al., 2020). Por outro lado, a nsp12 também atua como adjuvante da nsp13, da qual é uma helicase, a primeira enzima do ciclo de replicação, medeia a síntese de todas as moléculas de RNA e atua no capeamento de 5'-RNA (ROMANO et al., 2020). Ainda, outros trabalhos citam as nsp14 e nsp16 como metiltransferases, essenciais para que o ciclo viral ocorra (KIM et al., 2020). Por fim, análises experimentais têm demonstrado que a nsp15 pode interferir na resposta imune inata do hospedeiro, além de degradar o RNA viral em momentos dos quais são necessários o escape de células de defesa (KIM et al., 2020).

Por outro lado, as proteínas estruturais, além das atribuições de estruturação da partícula viral (figura 3), outras funções são realizadas por elas. Assim, a superfície viral é composta pela glicoproteína de membrana tipo I (spike) que forma homotrímeros e se projeta nesse local, sendo classificada como proteína de fusão que medeia a reação ligante-receptor e a fusão de membrana (DE GROOT et al., 2020; FREEMAN, 2018). Além disso, sua estrutura é constituída por duas subunidades funcionais, a subunidade S1, da qual é composta pelo domínio N-terminal (NTD) e domínio de ligação ao receptor (RBD) e a subunidade S2, relacionada diretamente à fusão de membrana viral e celular (DE GROOT et al., 2020). Ainda, a glicoproteína de membrana do tipo III integral (M) é a mais abundante, interage com todas as proteínas estruturais do vírus, define o formato do envelope, organiza a montagem viral e atua interferindo na resposta antiviral inata do hospedeiro (DE GROOT et al., 2020; FU et al., 2021).

Classificada como o menor componente proteico estrutural da partícula viral, a proteína do envelope, de membrana integral pentamérica possui canais de íons ou vioporinas com atividade de permeabilização de membrana (DE GROOT et al., 2020). Além disso, estudos demonstram várias outras funções relacionadas ao ciclo do vírus, como participação durante a montagem, brotamento e patogênese (SCHOEMAN; FIELDING, 2019). E por fim, a estrutura viral conta com a Fosfoproteína RNA-ligante, a proteína do nucleocapsídeo, que tem como função encapsidar o genoma. E está envolvida na síntese de RNA e sua tradução, atua como chaperona de RNA e como antagonista de interferon do tipo I (DE GROOT et al., 2020).

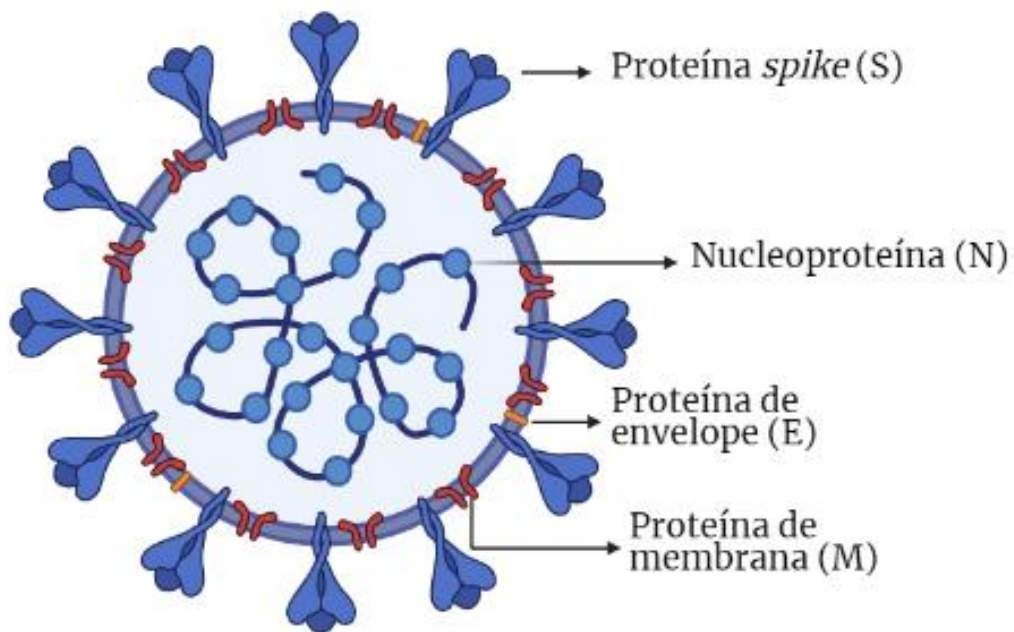


Figura 3. Representação das proteínas do SARS-CoV-2. Representação figurativa da estrutura do SARS-CoV-2, esférica e com espículas em sua superfície. Na qual estão as proteínas spike (S), proteína de membrana (M) localizadas no envelope viral (E) e a nucleoproteína (N) complexada ao genoma viral. Fonte: Adaptado de Biorender, 2021

Adicionalmente, todos os genomas completos descritos de coronavírus demonstram ORFs que codificam proteínas acessórias, com apresentações variadas intercaladas entre os genes padrões. Entretanto, os estudos quanto às proteínas acessórias dos coronavírus são os menos avançados e especula-se que estes tenham sido adquiridos de forma horizontal por fontes heterólogas ou celulares (MAZUMDER et al., 2021).

1.4. Infecção e imunopatogênese

Pesquisas demonstram que o receptor de membrana ACE2 (Enzima de Conversão da Angiotensina 2), que desempenha função importante na homeostase celular e na resposta pró-inflamatória, interage com as proteínas da espícula viral (S), e a partir dessa interação, inicia-se o processo de penetração do vírus na célula do hospedeiro (MASON, 2020) (figura 4). O SARS-CoV-2 infecta células que expressam o ACE2 e a protease transmembrana serina do tipo 2 (TMPRSS2), principalmente as do intestino delgado (enterócitos e macrófagos) e as dos alvéolos pulmonares (pneumócitos) (TO et al., 2020).

A proteína S possui em sua estrutura um domínio de ligação ao receptor (RBD) que está envolvido diretamente à ligação com o receptor celular de entrada ACE2. Ainda, durante esse processo, a protease transmembrana serina 2 (TMPRSS2) facilita a penetração do vírus à célula ou uma furina do tipo 1, ligada à membrana, que cliva a proteína S em seus domínios S1 e S2 e permitindo a fusão membranar (HOFFMANN et al., 2020).

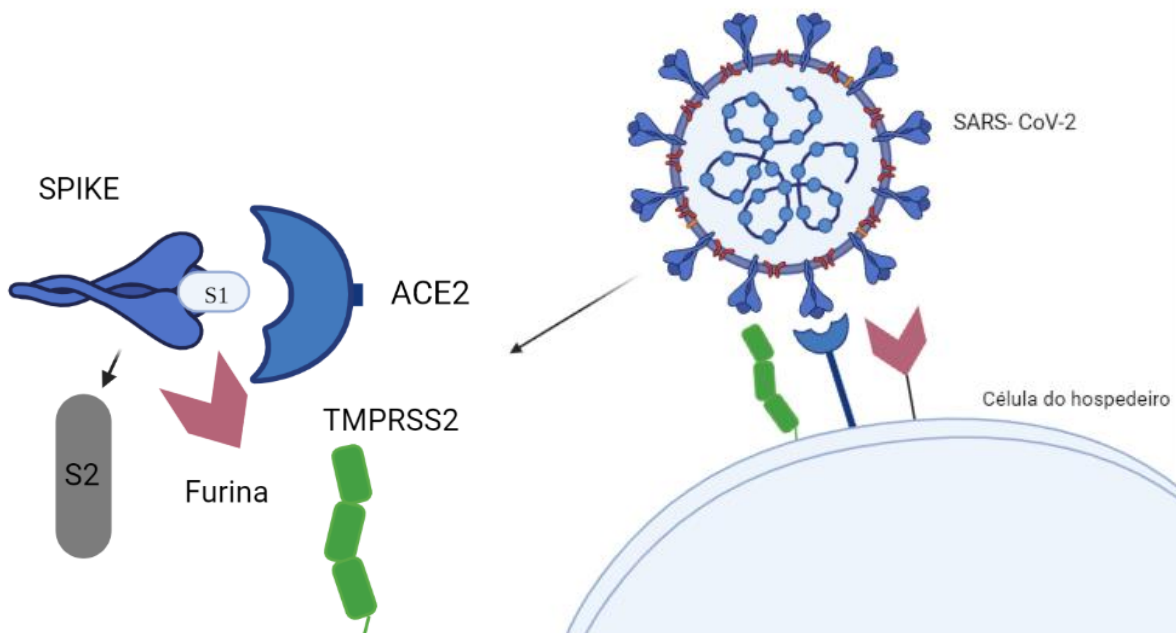


Figura 4 - Interação viral com proteínas de membrana da célula hospedeira. Figura esquemática da interação entre o SARS-CoV-2 e a célula do hospedeiro para penetração viral. A subunidade RBD (domínio de ligação ao receptor) de umas das estruturas da S1, porção da S (spike), interage com a Enzima de Conversão da Angiotensina 2 (ACE2). Ainda, a protease transmembrana serina 2 (TMPRSS2) auxilia a entrada do vírus e a furina do tipo 1, ligada à membrana, cliva a proteína S em seus domínios S1 e S2 e permite a fusão membranar. Fonte: Criado e adaptado em Biorender, 2021.

Estudos sugerem que o receptor ACE2 tem relação crítica na susceptibilidade ao vírus e na gravidade da lesão tecidual local e sistêmica (LIPPI et al., 2020a). Ainda, o receptor ACE2 e outros componentes tem atividade como reguladores do sistema renina-angiotensina (ECA) atuando fortemente no controle da gravidade da insuficiência pulmonar aguda, quando a doença é instalada (KUBA; IMAI; PENNINGER, 2006). Em análises experimentais com células epiteliais de vias aéreas, observou-se que após 24 horas de infecção pelo vírus SARS-CoV, membro da espécie do SARS-CoV-2, a expressão do ACE2 aumentou significativamente em comparação a 12 horas de infecção (LI et al., 2020a).

A destruição das células pulmonares ocasionada pela invasão viral desencadeia uma resposta imune local, que ativa macrófagos e monócitos, esses liberam citocinas e logo, as respostas adaptativas das células do tipo linfócitos T e B se iniciam (TAY et al., 2020). Em caso de desequilíbrio relacionado à atuação do sistema imune, o quadro pulmonar piora e uma patologia sistêmica pode se instalar no organismo infectado (TAY et al., 2020). Isso ocorre porque a resposta imunológica disfuncional desencadeia uma tempestade de citocinas as quais estão envolvidas: as interleucinas (IL), os interferons (INF), fator de necrose tumoral (TNF), fatores de crescimento, fatores estimuladores de colônias e as quimiocinas (SONG et al., 2020a). Ainda, as células epiteliais e macrófagos, ao ser invadidos pelas partículas virais são estimuladas a liberarem citocinas e quimiocinas, que recrutam mais células de defesa (SONG et al., 2020b) e os receptores do tipo *Toll-like receptors* (TLRs) 3, TRL7, TRL8 e TRL9 ao reconhecerem o RNA viral faz com que a via NF-Kb (fator nuclear kappa B) seja ativada e citocinas pró-inflamatórias participam do processo inflamatório (AZKUR et al., 2020).

Em infecções virais, dentro da célula hospedeira, proteínas do imunocomplexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I apresentam peptídeos virais às células T citotóxicas CD8. Nesse momento, essas células iniciam uma expansão clonal e desenvolve células T efetoras e de memória para combate específico ao vírus (AZKUR et al., 2020) (JANSEN et al., 2019). Além disso, a partir de moléculas MHC de classe II, as células dendríticas e macrófagos apresentam vírus inteiros ou partes deles para células do tipo T CD4+. As células B reconhecem de forma direta as partículas virais ou por interação com as células T CD4+ e passam a produzir anticorpos contra o patógeno.

Ainda, quanto à resposta imune humoral, na fase aguda da doença, a imunoglobulina do tipo M (IgM) tem sua produção aumentada atingindo seu pico em ~7 dias e, em seguida, na convalescência, ocorre o mesmo com imunoglobulina do tipo A(IgA) e a imunoglobulina do tipo G (IgG) específico (AZKUR et al., 2020), essas observações relacionadas à janela imunológica estão intimamente ligadas ao emprego adequado do método para detecção da COVID-19 (figura 5).

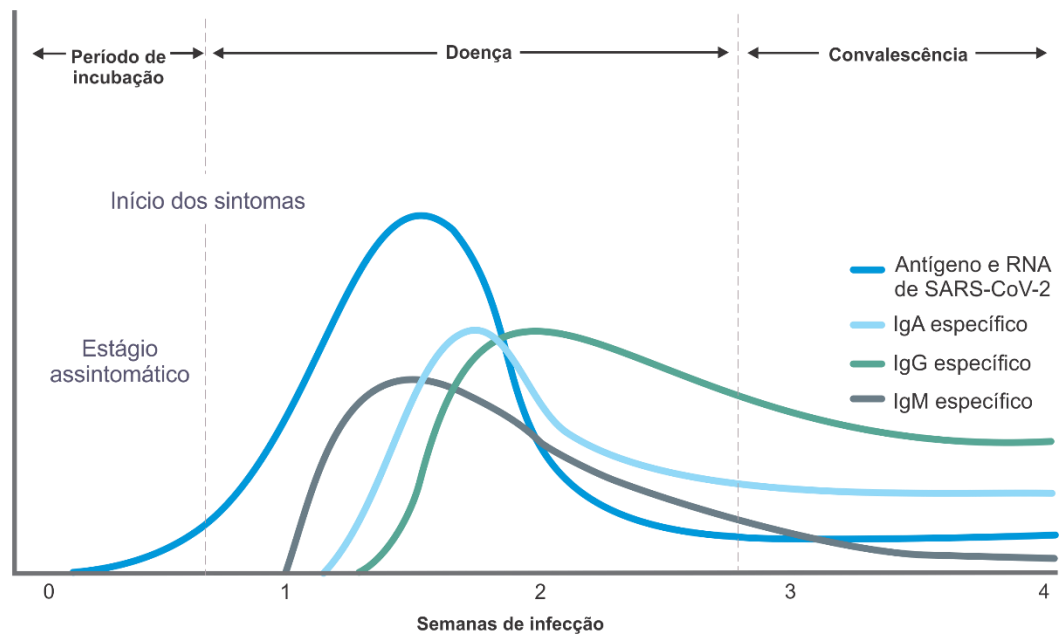


Figura 5. Resposta específica de anticorpos do SARS-CoV-2. Gráfico representativo mostrando a resposta específica de anticorpos frente à infecção por SARS-CoV-2. O estágio assintomático pode apresentar-se até duas semanas antes do início dos sintomas. Contudo, há aumento de antígenos desde o início da infecção. Após o início dos sintomas, na primeira semana, é possível verificar a produção de anticorpos IgM e IgA e adiante, a produção de anticorpos do tipo IgG. Em geral, há uma queda de anticorpos, principalmente após a segunda semana de sintomatologia com uma tendência de cessação de anticorpos IgM e linearidade na produção de IgG. Fonte: Adaptado de AZKUR,2020.

Os anticorpos produzidos para combate ao SARS-CoV-2 são direcionados às glicoproteínas de membrana do vírus e seus alvos principais são as proteínas N e S. Esses anticorpos têm a função de impedir a infecção viral em células que expressam o receptor ACE2 (POLAND; OVSYANNIKOVA; KENNEDY, 2020). Estudos têm demonstrado que o sucesso da neutralização contra o SARS-CoV-2 está relacionado com a produção de anticorpos específicos, IgG anti - domínio de ligação ao receptor da proteína S (S-RBD) (NI et al., 2020). No entanto, a resposta produzida pelas imunoglobulinas do tipo G e do tipo M (IgM) podem atuar contra a N e a S-RBD e não estar associadas à resposta imune duradoura (NI et al., 2020).

1.5. Tratamento e Vacina

Em Wuhan, no início da pandemia, para evitar a gravidade e óbitos dos pacientes com o novo coronavírus, testes com fármacos disponíveis foram feitos para avaliar sua eficácia contra a doença, porém não houve tratamento satisfatório (HUANG et al., 2020). Desde então, testes com medicamentos diversos foram avaliados em todo o mundo como os antimicrobianos cloroquina e hidroxicloroquina, o anti-helmíntico ivermectina, os anti-hipertensivos SABER e losartan e os antivirais favipiravir, umifenovir, lopinavir e roatanavir e remdesivir (WU et al., 2020). Este último, foi o primeiro medicamento aprovado emergencialmente no Brasil, no mês de março de 2021, produzido pelo laboratório *Gilead*. Contudo, ressalvas técnicas quanto ao uso no tratamento da COVID-19 foram estabelecidas pelo Ministério da Saúde do país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021b). Ainda, atualmente, outros fármacos estão sendo submetidos a testes e tem apresentado resultados promissores quanto à eficácia contra a infecção do SARS-CoV-2, como o molnupiravir e o paxlovid (PFIZER, 2021) (MERCK, 2021).

Historicamente, sabe-se que a melhor forma de prevenção de doenças é por vacinação. Estudos constantes para geração de vacinas eficientes contra o vírus tem sido empregados por grandes empresas e instituições de pesquisa. No Brasil, quatro vacinas de diferentes matérias-primas foram aprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para utilização na população (NINOMIYA, 2021). Assim tem-se a desenvolvida pela Universidade de Oxford e pelo laboratório britânico Astrazeneca, esta criada por tecnologia recombinante que utiliza um vetor viral não-replicante de adenovírus de um primata não-humano (chimpanzé) que é reconhecido pelas células de defesa e estimula resposta imunológica contra a proteína S do SARS-CoV-2 (FIOCRUZ, 2021). Ainda, a vacina de vírus inativado, a CORONAVAC, desenvolvida pela biofarmacêutica chinesa Sinovac Biotech e produzida pelo Instituto Butantan em São Paulo que também estimula a produção de anticorpos IgG neutralizantes e ativação da resposta celular principalmente induzidas pelo imunógeno RBD (WANG et al., 2020a). Também, a vacina que utiliza mRNA (ácido ribonucleico mensageiro) sintético, que desencadeia resposta imune quando o próprio organismo reconhece esse material e produz proteínas com função antigênica, essa tecnologia pertencente a BioNtech e produzida pela Pfizer (PFIZER, 2020). E a da farmacêutica Janssen-Cilag, da qual utiliza tecnologia recombinante com vetor de adenovírus sorotipo 26 (Ad26) (BRASIL, 2021).

1.6. Diagnóstico Laboratorial

A infecção causada pelo SARS-CoV-2 pode ou não desencadear sinais e sintomas. No entanto, quanto mais abrangente a testagem na população, maior probabilidade de conter a transmissão da doença, avançar com medidas preventivas e agregar dados epidemiológicos às instituições públicas e privadas da área de saúde para estudos com finalidade de controle da disseminação do vírus na população. Além disso, o diagnóstico clínico está intimamente ligado aos resultados laboratoriais. Dessa forma, diversos tipos de métodos para detecção da doença estão sendo desenvolvidos, sendo aplicadas várias maneiras de coleta e tipos de amostras. As técnicas moleculares e sorológicas são as mais utilizadas.

A RT qPCR é a metodologia molecular de referência para a confirmação de infecção por SARS-CoV-2 e seu foco é amplificar ácidos nucleicos do material genético do vírus com alta precisão (LI et al., 2020b). De forma indireta, os testes sorológicos são utilizados para determinar a presença ou quantificar anticorpos específicos contra a doença em indivíduos infectados. Atualmente, os ensaios imunocromatográficos, de imunoabsorção enzimática (ELISA) e de quimiluminescência são os mais utilizados. (GHAFFARI; MEURANT; ARDAKANI, 2020). Além disso, recentemente os ensaios de imunofluorescência portátil ganharam espaço na detecção de anticorpos e antígenos para COVID-19.

1.6.1. Método molecular

RT qPCR

A técnica de PCR faz amplificação específica do cDNA, que foi transcrito previamente pela transcriptase reversa. A detecção desse material amplificado será feita através de sondas de hidrólise específicas para o vírus presentes no mix da reação. Para o ensaio de PCR na detecção de SARS-CoV-2, amostras provenientes de escarro, fluido de lavagem bronco alveolar, swabs nasofaríngeos e orofaríngeos e aspirados do trato respiratório (AFZAL, 2020) são utilizadas. Para permitir a identificação do vírus por esse método, há os genes específicos que podem ser utilizados como gene E, gene N e gene RdRP dentre outros (CDC, 2020) (KUBINA; DZIEDZIC, 2020). Assim, o processo de extração aplicado ao teste deve ser feito em instalações de biossegurança nível BSL-2 e deve ser feito por pessoal capacitado (OPAS/OMS, 2020).

1.6.2. Testes imunocromatográficos

Desde o começo da pandemia, vários testes para detecção da COVID-19 foram produzidos. Dentre eles, os testes de detecção de anticorpos contra o SARS-CoV-2 ganharam destaque por especialistas da área da saúde e da população em geral por serem mais rápidos e de menor custo em relação à técnica padrão ouro determinada (SBPC, 2020). Nessa modalidade, testes com métodos diversos foram fabricados, dentre eles o ELISA, quimioluminescência e imunocromatografia foram os de maior destaque no Brasil e em sua maioria com detecção de anticorpos totais ou individuais, prevalecendo os que detectam IgM e IgG (SBPC, 2020). Esse processo aumentou a fabricação e importação de testes de todos os tipos e uma impactante quantidade de testes imunocromatográficos foram registrados no Ministério da Saúde (MS). Entretanto, conforme demonstrado no monitoramento do INCQS (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde), as análises feitas pós-mercado para avaliação do desempenho desses testes demonstram que muitos deles não estavam conforme a descrição em registro, com parâmetros exigidos pelos órgãos reguladores e que era necessário adequações e até mesmo suspensão do uso (ANVISA, 2021a).

Ainda, é importante ressaltar que a validação aplicada aos testes é imprescindível para garantir a confiabilidade dos mesmos, sendo aplicada uma verificação analítica padronizada que determina com segurança as suas características de desempenho, determinando sua real sensibilidade e especificidade (SBPC, 2020).

1.6.2.1. Detecção rápida de antígenos do SARS-CoV-2

De acordo com as orientações da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS/OMS, 2020), os testes rápidos que detectam antígenos do SARS-CoV-2 devem atender os requisitos impostos para sua utilização, como sensibilidade $\geq 80\%$ e especificidade $\geq 97\%$ em comparação com um teste molecular de referência. Além disso, é importante frisar que os testes desse tipo são úteis onde não há teste molecular disponível ou quando o tempo do resultado desse teste seja maior que 72 horas.

Indivíduos sintomáticos em um período de até 10 dias (melhor intervalo 5-7 dias) têm prioridade para aplicação dos testes, não sendo recomendado o uso em pacientes assintomáticos. Para interpretação dos testes é importante a correlação entre as informações clínicas e epidemiológicas, sendo necessário um teste confirmatório, como PCR, em alguns casos (OPAS/OMS, 2020).

1.6.2.2. Detecção de anticorpos IgG/ IgM

Esse ensaio contém vários subelementos e duas etapas definem seu processamento: amostra a ser utilizada (sangue total, plasma e soro, por exemplo) no volume pré-estabelecido é aplicada na cavidade correspondente e logo após, a aplicação de um tampão formulado para direcionamento da amostra se faz necessário (MILLER; SIKES, 2015). Nesse momento, há reação do conjugado (composto por um antígeno recombinante e um componente que emite cor, como por exemplo, o ouro coloidal) presente em um compartimento no início do dispositivo, que, quando em contato com anticorpos IgG /IgM da amostra (se houver) formam um complexo antígeno-anticorpo. Estes, migram por capilaridade e reagem com anti anticorpos IgM e IgG que estão localizados na membrana de nitrocelulose. Além disso, um outro composto conjugado geralmente é adicionado ao dispositivo que servirá como controle interno durante a execução do teste. Esse também migra e se liga ao anti anticorpo que está localizado na fase da linha de controle. Ao final da reação, há formação de uma linha visível colorida na janela de visualização, devido à composição do ouro coloidal no conjugado que permanece inerte na linha teste em caso de ligação com o anticorpo (figura 6).

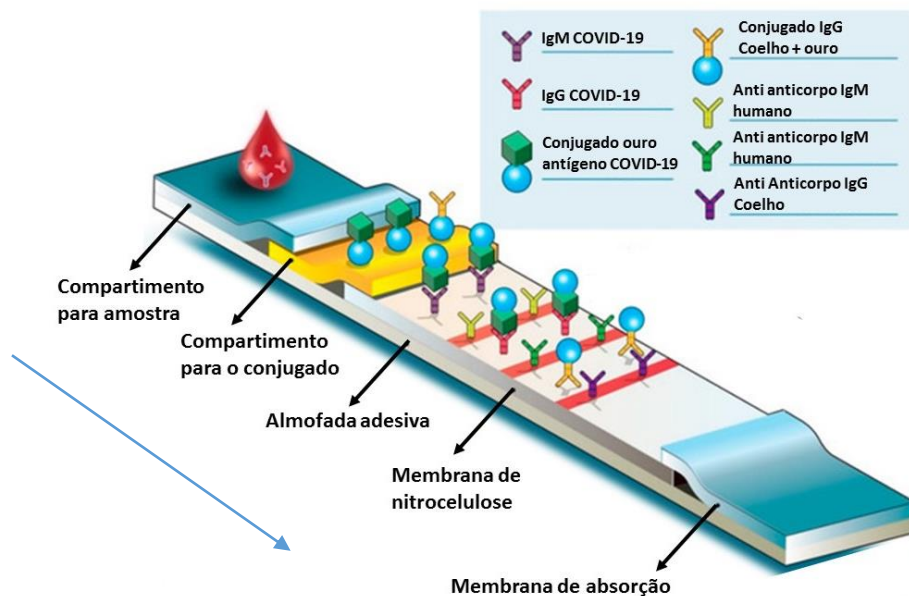


Figura 6. Componentes do teste imunocromatográfico. Representação de um ensaio imunocromatográfico para detecção de anticorpos IgG e IgM contra o SARS-CoV-2. Nesse dispositivo há um compartimento para amostra, o compartimento do conjugado, o qual terá dois tipos de conjugados específicos: ouro coloidal + antígeno COVID-19 e ouro coloidal + anticorpo IgG de coelho. Também se tem a membrana de celulose, onde ocorre a migração dos componentes por ação capilar e estão inseridos os anti anticorpos IgM, IgG humanos e IgG de coelho para se ligarem aos complexos migrados. Ainda há a membrana de absorção, que irá receber durante o ensaio os reagentes e amostra. Sustentando as estruturas citadas, está uma almofada adesiva. Fonte: Adaptado de GAPHARI et. Al, 2020.

1.6.3. Imunoensaio rápido por fluorescência

Geralmente, a junção de três ou mais tecnologias é empregada nessa metodologia, quais são, a imunocromatografia, a fluorescência, um software de leitura óptica e processamento dos dados recebidos (ALBANI, 2001). Ainda, os equipamentos que compõe a tecnologia podem variar quanto à robustez e formas de análises (quantitativas ou qualitativas). Quanto à imunocromatografia utilizada para esse fim, funciona, de forma semelhante à aplicada aos testes rápidos comumente conhecidos. Porém, a diferença estabelecida é que, o composto no conjugado específico do dispositivo teste, tem função de fluoróforo (elemento que emite fluorescência quando submetido a alguma fonte de radiação luminosa com comprimento de onda específico), o que não se aplica aos testes com uso, por exemplo, do ouro coloidal, capaz de emitir cor para interpretação visual em ensaios de fluxo lateral (WANG et al., 2015).

Conceitualmente, a fluorescência é um tipo de processo complexo da fotoluminescência que está atrelado a três estágios distintos (figura 7): o primeiro, quando um fóton de energia é fornecido por uma fonte externa, que pode ser por uma luz LED (*light-emitting diode*) ou LASER, por exemplo, o segundo, quando há absorção da energia emitida por um fluoróforo criando um estado de *single state* ($S1'$) (ALBANI, 2001). Esse estado existe por um tempo finito, que varia de acordo com cada componente fluorescente e durante esse período, o fluoróforo sofre mudanças conformacionais. Nesse processo, a energia de $S1$ é parcialmente dissipada e um novo estado se estabelece, o de *relax singlet* ou estado relaxado (DRUMMEN, 2012). É a partir desse momento que a emissão de fluorescência se origina do qual um fóton de energia é emitido, retornando ao seu estado fundamental ($S0$). Devido à dissipação de energia, durante o tempo no estado excitado, a energia desse fóton é menor, com conseqüente comprimento de onda maior ((DRUMMEN, 2012). Desse modo, o comprimento de onda da emissão fluorescente é maior que o da excitação porque durante o tempo de excitação, há colisões entre moléculas causando uma perda parcial de energia, liberada em forma de calor (ALBANI, 2001).

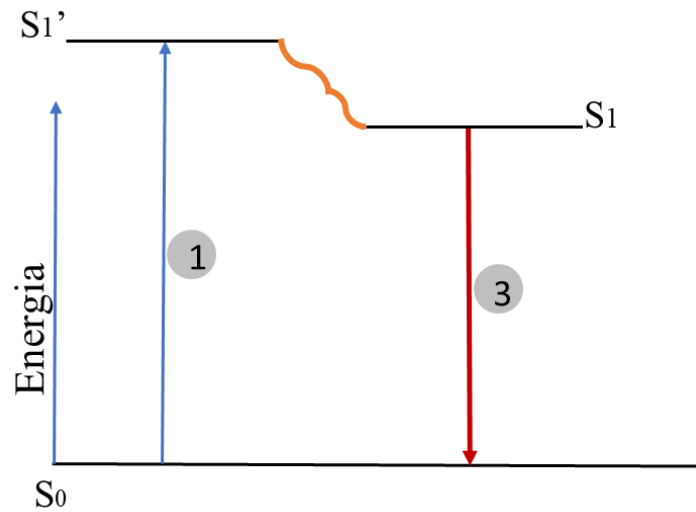


Figura 7. Diagrama de Jablonski. Diagrama de Jablonski- indicando os processos envolvidos na fotoluminescência. Três estágios distintos são mostrados: 1- um fóton de energia é fornecido por uma fonte externa, como uma luz LED. 2- Luz absorvida pelo fluoróforo é emitida criando um estado de single state (S₁'). 2- Esse estado existe por um tempo finito e o fluoróforo sofre mudanças conformacionais. A energia de S₁' é parcialmente dissipada (em laranja) e um novo estado se estabelece, o de relax singlet ou estado relaxado (S₁). 3- A partir desse momento a emissão de fluorescência se origina do qual um fóton de energia é emitido, retornando ao seu estado fundamental (S₀). Fonte: Adaptado de Termofisher, 2021.

Há diferenças entre os marcadores de fotoluminescência que determinam a qualidade da tecnologia empregada. Atualmente, o marcador mais utilizado para a fluorescência resolvida no tempo é o lantanídeo európio (Eu) (WANG et al., 2015). Em contraste com outros fluoróforos tradicionais, como fluoresceína e rodamina, o európio se caracteriza por ter um deslocamento de Stokes (diferença entre a absorbância máxima e os comprimentos de onda de emissão) maior, permitindo que a substância não sofra auto-extinção devido a sobreposição de espectros (BÜNZLI; PIGUET, 2005). Os lantanídeos possuem longo tempo de vida (*life time*) (em milissegundos) em relação aos outros fluoróforos (inclusive os naturais presentes em matrizes biológicas) (geralmente em nanossegundos), e o sinal luminoso produzido por essas partículas durante a emissão é intenso e estável, o que favorece a sensibilidade do ensaio, permite que a fluorescência seja lida logo após algum decaimento de energia proporcionando uma faixa de leitura mais dinâmica e garante a precisão dos resultados (figura 8) (BÜNZLI; PIGUET, 2005).

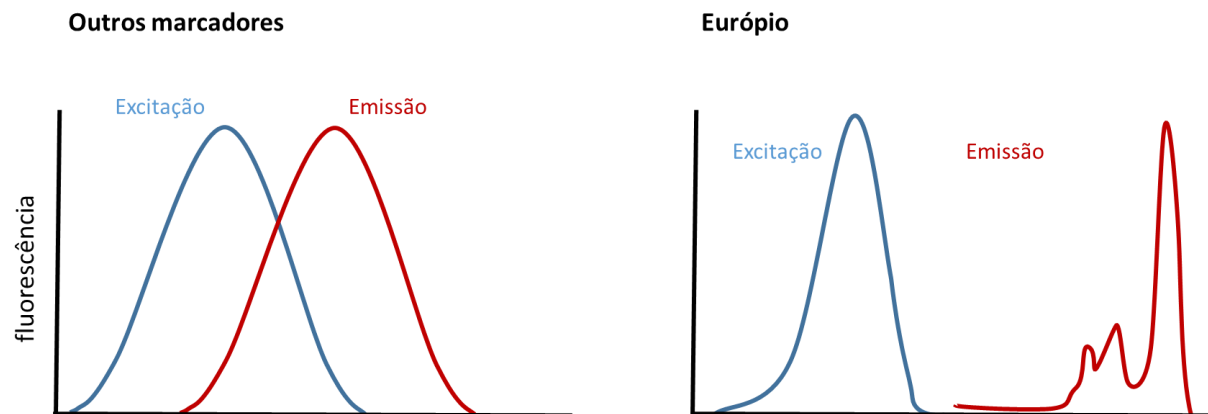


Figura 8. Diferenças de excitação e emissão de fluorescência. Gráficos representativos da diferença entre a absorção de luz por fluoróforos diferentes do európio. A emissão da luz recebida se dá em momentos em que ainda há absorção da luz recebida no primeiro gráfico, situação que pode ocasionar perda de energia durante o processo e os sensores de leitura do equipamento de imunofluorescência não serem capazes de captar a energia total emitida. No segundo gráfico, mostra a excitação e emissão em momentos diferentes, do qual influencia na leitura mais precisa do sensor do equipamento. Fonte: Adaptado de Teixeira, 2010.

Após a emissão de fluorescência, para leitura óptica dessa energia emitida, é necessário que tecnologias capazes de converter luz em correntes elétricas sejam utilizadas. Assim, geralmente, as fotomultiplicadoras convencionais são empregadas e utilizam catodos feitos com materiais fotossensíveis, sistema de coleção de elétrons, uma seção de multiplicação de elétrons e um anodo (CHERRY, 2012). Por meio de sistemas avançados, os ajustes para detecção de fótons podem ser feitos, evitando ruídos e melhorando a leitura individual. Ainda, é necessário que sistemas de processamento dos dados obtidos faça leitura, interpretação e análises dos mesmos. Essa atuação se dá por meio de algoritmos pré-programados. Logo, têm-se os resultados disponibilizados na interface visual do instrumento (CHERRY, 2012).

1.6.4. Ensaio de Desempenho

A ANVISA atua como órgão regulador para a validação de produtos *in vitro* e normatizador para os ensaios de desempenho desses (quando aplicável). Dessa forma, os quesitos preconizados: exatidão, sensibilidade analítica, repetibilidade, reprodutibilidade, especificidade e estabilidade ao serem contemplados no estudo garantem resultados confiáveis e confirma a adequação do produto ao fim destinado.

2 JUSTIFICATIVA

Neste ano (2021), no Brasil, a pandemia da COVID-19 ainda está causando perdas humanas e socioeconômicas. Assim, a vacinação tem sido fundamental para diminuição considerável das mortes e casos graves ocasionados pelo SARS-CoV-2. Atualmente, soma mais de 25 milhões de casos da doença, e dessas, foram perdidas milhares de vidas por complicações associadas à infecção (dados consultados em 4 de fevereiro de 2022). A situação pandêmica evidenciou a deficiência de produtos de diagnóstico laboratorial em várias partes do mundo, inclusive no nosso país. Além disso, deixou explícita a necessidade da importação de matéria-prima para a produção de vários produtos destinados ao setor de saúde, principalmente para contenção da propagação do vírus. Os testes moleculares específicos são de importância imprescindível para a ação dos órgãos de vigilância epidemiológica perante os casos de diversas doenças que afetam os seres humanos, contudo seu uso requer técnicas e instalações específicas que geralmente são de custo elevado.

Muitas empresas, ao se propor a comercializar os testes rápidos importados ou fabricados no país, foram alvos de materiais com baixa qualidade e como consequência apresentaram menor eficiência nos quesitos sensibilidade e especificidade, dificultando a interpretação médica perante os resultados obtidos. O diagnóstico clínico final, que tem complexidade variável a depender dos sinais e sintomas do indivíduo, histórico de comorbidades pré-existentes, contato com outros indivíduos infectados, período de incubação do vírus e outros fatores envolvidos, pode ficar comprometido se os testes laboratoriais não forem suficientemente eficazes para auxílio nesse processo.

Testes para detecção de anticorpos anti SARS-CoV-2, com alta qualidade, que permite manuseio fácil, menor tempo e menor custo, é uma das formas de detecção rápida que mais tem se buscado no mundo, portanto a produção em massa destes testes tem sido incansável por seus fabricantes. Apesar disso, a falta de um teste de referência para a busca de anticorpos IgG/ IgM aumenta a necessidade do controle de qualidade dos testes rápidos comercializados, sendo necessário constantes ensaios de desempenho, sempre em busca de atender a população com as melhores ferramentas de diagnóstico rápido e seguro. Dessa forma, a intenção do trabalho proposto é um ensaio de desempenho capaz de intensificar a monitorização da qualidade do teste comercializado, além de proporcionar um protocolo que poderá ser utilizado em outros testes de detecção rápida fabricados por nossa corporação.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar o desempenho de um teste rápido na detecção de anticorpos IgG/ IgM contra o vírus da COVID-19 (SARS-Cov-2) por método de comparabilidade.

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Avaliar a funcionalidade do teste rápido imunocromatográfico para COVID-19 IgG/IgM.
- ❖ Comparar os resultados com de outro teste imunocromatográfico registrado em território nacional.
- ❖ Comparar os resultados obtidos nos ensaios com os de ELISA.
- ❖ Comparar os resultados obtidos nos ensaios para IgG com os de imunofluorescência para IgG anti-RBD em amostras de vacinados com a Coronavac.

5 MATERIAIS

5.1. Amostras

Parte das amostras utilizadas nesse estudo foram obtidas de pacientes durante a pandemia de COVID-19, no ano de 2020, e pertencem ao projeto principal com aprovação no Comitê de Ética sob o número CAAE 1686320.0.0000.5149. Essas foram cedidas gentilmente pelo Dr. Flávio Guimarães da Fonseca - CT Vacinas no início da pandemia ocasionada pelo SARS-CoV-2, assim, há variação de características referente a cada amostra. Ainda, quanto às amostras, o grupo do professor Dr. Flávio Guimarães da Fonseca disponibilizou resultados de ELISA (IgG) e dos testes rápidos de Biomanguinhos (DPP) para detecção de IgG e IgM, que nesse estudo foram utilizados para comparação de desempenho dos kits imunocromatográficos avaliados. O método de ELISA utilizado no CT-Vacinas é semi-quantitativo, o índice (I) é dado pela razão: absorvância da amostra/cut-off do teste e, dependendo do índice, a amostra é classificada como reagente ($I \geq 1,1$), não reagente ($I < 0,8$) ou indeterminada ($0,8 \leq I < 1,1$). E, o método DPP possui um leitor de sinal, e classifica o resultado em reagente (≥ 25) ou não reagente (< 24). Pelo mesmo grupo, foram disponibilizadas amostras verdadeiramente negativas para IgG e IgM contra o SARS-CoV-2, essas coletadas antes de 2020.

Ainda, amostras de pacientes completamente imunizados (1ª e 2ª dose) com a vacina Coronavac foram utilizadas. Essas, gentilmente cedidas pelo Dr. Ricardo Gazzinelli e pertencentes ao grupo de Imunopatologia do René Rachou FIOCRUZ MINAS com aprovação pelo CEP/FHEMIG: CAAE 43335821.4.0000.5119. Para preservação de todas as amostras, estas ficaram acondicionadas à temperatura -70 no seu Biobanco de origem até a execução dos ensaios.

5.1.1. Amostras reagentes para IgG anti SARS-CoV-2

Para as análises do estudo, a partir do biobanco de soros positivos para COVID-19, um total de 42 amostras clínicas foram selecionadas. Para isso, foram escolhidos soros com mais características disponíveis e resultados laboratoriais disponibilizados pelo provedor do projeto referenciado. Todas as amostras selecionadas tiveram resultados no ELISA como reagentes para IgG, apresentando índices com intervalo de 1,1 a 8,8.

5.1.2. Amostras reagentes para IgG e IgM (DPP)

Das 42 amostras, 6 delas apresentam-se reagentes para anticorpos IgG e IgM contra SARS-CoV-2 e 2 foram reagentes apenas para IgG no teste rápido de Biomanguinhos (tabela 1). Esse método possui um leitor de sinal, e classifica o resultado em reagente (≥ 25) ou não reagente (<24). O restante das amostras não foi testado pelo método.

Tabela 1 Sinal analítico resultante no teste de Biomanguinhos

ID	Sin IgM	Sin IgG
1	29	18
2	28	160
3	25	100
4	97	291
5	124	51
35	12	62
36	43	120
37	2,7	27

Legenda: ID (identificação da amostra) DPP- Teste rápido Biomanguinhos
Sin IgM- Sinal analítico IgM Sin IgG- Sinal analítico IgG

5.1.3. Amostras reagentes RT-qPCR

Do total de amostras utilizadas nesse estudo, 18 foram positivas para RT-qPCR. A classificação dessas amostras, feita pelo detentor do projeto inicial, foi como amostras positivas, as quais apresentaram resultados reagentes no método ou amostras não testadas, as quais não foram testadas pelo método. Outros dados não foram disponibilizados. Dessa forma, 24 amostras desse estudo não foram testadas para RT-qPCR.

5.1.4. Amostras reagentes IgM USP

16 das 42 amostras utilizadas nesse estudo foram positivas para IgM anti SARS-CoV-2 em ensaios realizados por pesquisadores da Universidade Federal de São Paulo (USP). Correspondendo a 38% das amostras positivas para IgM contra SARS-CoV-2 analisadas.

5.1.5. Amostras clínicas negativas para SARS-CoV-2

As amostras de soro negativas para SARS-CoV-2 foram selecionadas do biobanco do CT-Vacinas, estas coletadas antes do ano de 2020, totalizando 30 soros. 4 deles são positivos para dengue e 3 para Chikungunya. Além disso, 2 amostras utilizadas estavam ictéricas e 6 são de vacinados contra Influenza. Assim, as 15 amostras restantes não apresentaram características anormais. Os índices de ELISA IgG obtidos nos ensaios com essas amostras do CT-Vacinas estão entre 0,3 a 0,9.

5.1.6. Amostras de vacinados com Coronavac

Um total de 28 amostras de pacientes que foram vacinados contra a COVID-19 com Coronavac foi adicionado ao estudo. Vacinados com outras vacinas que estimulam a produção de anticorpos anti proteína S apenas, não entraram no estudo, devido à limitação do teste avaliado, do qual detecta apenas anticorpos ligantes à proteína N.

5.4. Testes imunocromatográficos e de imunofluorescência

Foram disponibilizados pela empresa Diagnóstica Indústria e Comércio LTDA, 200 testes rápidos denominados COVID-19 IgG/IgM *Rapid Test*, previamente registrados na ANVISA sob o nº80638720150, lote COVNC1001R, validade 22/06/2022 e comercializado no país, sendo o objeto de estudo desse trabalho e foram utilizados para a execução dos processos do ensaio comparativo. Cada teste é composto por: um dispositivo de teste, um tubo capilar, uma solução tampão e a bula para instruções de uso. Todos os testes disponibilizados consistem em imunoenaios cromatográficos qualitativos que tem como objetivo determinar a presença de anticorpos dos tipos IgG e IgM em amostras de sangue total, soro ou plasma humano contra a proteína N (nucleoproteína) do vírus SARS-CoV-2.

Além disso, foram disponibilizados para uso, o equipamento de imunofluorescência portátil AFR200S e 60 testes para detecção de anticorpos do tipo IgG anti RBD, lote FCSG 21070002 validade: 07/2023 marca Biocon, por essa metodologia. Cada kit é composto por dispositivos testes, tubos de solução de extração, pipeta capilar, um cartão de identificação da curva de calibração específico e a bula. Além do processo de leitura realizado pelo equipamento, por meio dos sensores ópticos, há a formação de complexos no dispositivo teste durante a execução do ensaio. Assim, esse complexo contém antígenos ligantes à anticorpos do tipo IgG anti RBD e microesferas de európio (fluoróforo). Quando há anticorpos do tipo IgG anti RBD na amostra eles se ligam a esse complexo. Logo, como na imunocromatografia, por ação capilar, há a migração desses compostos pela membrana cromatográfica, sendo posteriormente capturada por anticorpos revestidos na linha teste. Além disso, outro conjugado está presente no dispositivo, migrando pela membrana juntamente com o complexo formado e ligante a anticorpos de captura como controle processual, em uma linha de controle específico. Finalmente, de acordo com a intensidade de fluorescência capturada pelos sensores do equipamento, há leitura do resultado e emissão do mesmo.

6 MÉTODOS

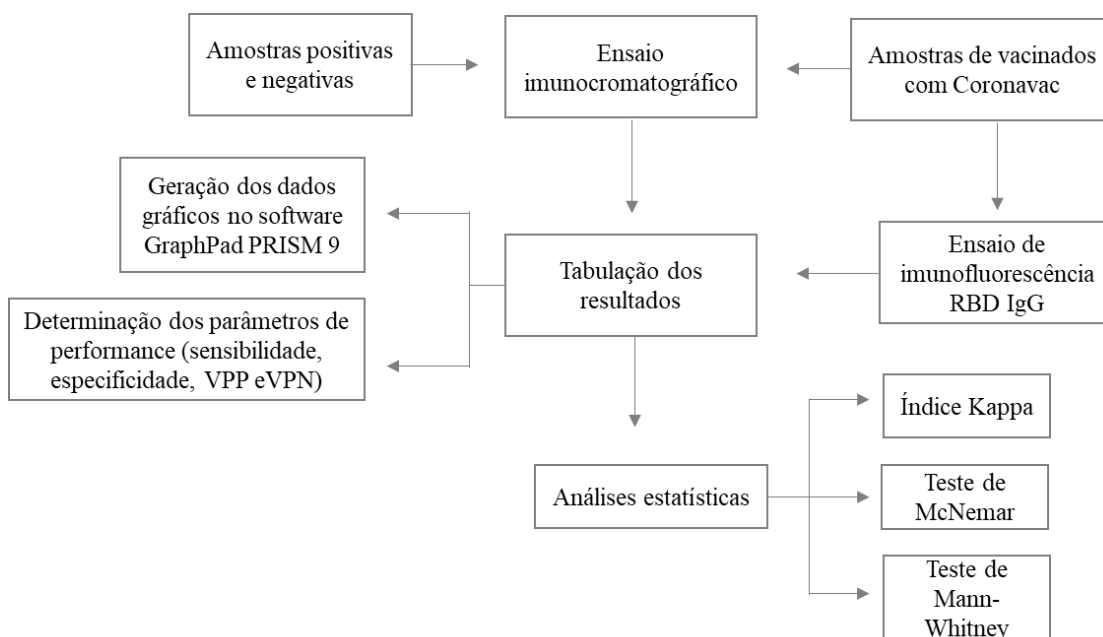


Figura 9. Fluxograma dos métodos empregados

6.1. Testes imunocromatográficos

Um total de 100 amostras foram submetidas aos ensaios. As mesmas foram levadas a temperatura ambiente para descongelamento, logo, quando descongeladas, foram homogeneizadas anteriormente ao procedimento do teste. A sequência de execução foi: amostras reagentes, amostras não-reagentes e amostras de vacinados.

O procedimento para execução foi feito de acordo com o direcionamento da bula do produto referido, da seguinte forma: os kits contendo os testes e seus materiais complementares, foram distribuídos em um local plano e asséptico, os dispositivos teste foram retirados das embalagens de alumínio apenas no momento da execução do ensaio, e logo, foram identificados de acordo com as amostras. Com a pipeta capilar plástica, foi pipetada a quantidade de soro delimitada por ela (identificada por uma marcação em preto, impressa na pipeta). Na cavidade do dispositivo teste, com pipeta capilar, verticalmente, foram dispensados $\sim 10 \mu\text{L}$ (microlitros) de soro. Logo, 3 gotas ($\sim 70 \mu\text{L}$) do tampão diluente foi aplicado na cavidade para migração na membrana teste. As leituras dos resultados foram interpretadas em 15 minutos. O registro dos resultados se deu mediante anotação em planilha previamente impressa e logo depois foi repassado para planilha eletrônica para guarda dos mesmos.

6.1.1. Interpretação dos resultados

Para interpretação dos resultados, a análise se fez a partir dos seguintes conceitos (figura 10):

Não Reagente - Apenas a linha Controle (C) está visível, sem coloração nas linhas G e M o que indica não reagente para anticorpos anti-COVID-19.

IgM Reagente - Além da linha controle (C), a linha M é visível, com coloração de qualquer intensidade, configurando IgM positivo para o vírus da COVID-19.

IgG Reagente - Se a linha controle (C) e a linha G é visível, com coloração de qualquer intensidade, o IgG é considerado positivo para o vírus da COVID-19.

IgG e IgM Reagente - Se a linha controle (C), a linha M e a G é visível, com coloração de qualquer intensidade, os anticorpos IgG e IgM são considerados positivos para o vírus da COVID-19.

Inválido - O teste será inválido caso não apareça a linha controle (C), mesmo que as linhas M e G sejam visíveis na janela de visualização.

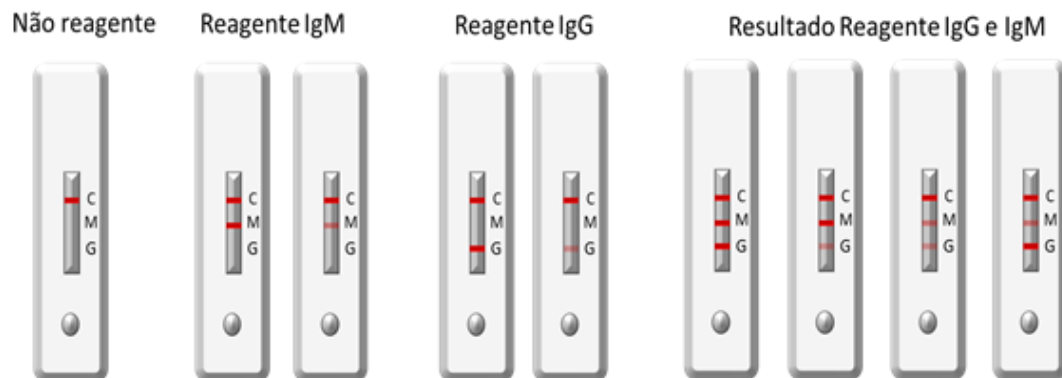


Figura 10. Interpretação dos testes imunocromatográficos. Para interpretação dos resultados: Quando houver apenas uma linha C, o teste é não reagente para os anticorpos IgG e IgM. Se surgir uma linha C e uma linha M, o resultado é reagente para IgM. Se houver formação de uma linha C e uma linha G, o teste é reagente para IgG. Se houver linhas fortes ou fracas C, M e G, o resultado é reagente para IgG e IgM.

6.2. Imunofluorescência

As amostras de soro de pacientes vacinados com Coronavac foram previamente descongeladas para a execução dos ensaios. Todos os procedimentos foram realizados seguindo o manual do equipamento AFR-200S (figura 11) e a bula referente ao kit de detecção de anticorpos IgG anti RBD.

Assim, para o ensaio, foi necessário ligar o equipamento, inserir o cartão de identificação da curva de calibração e deixá-lo no modo escolhido para operação. Para o AFR-200S, três tipos de modos operacionais são disponibilizados: rápido, padrão e testes em lote. Para esses estudos, o modo testes em lote foi o escolhido para otimização do processo. Dessa forma, as amostras foram previamente cadastradas no sistema do AFR-200S, logo, os dispositivos testes foram retirados de suas embalagens de alumínio e colocados em bancada plana e limpa para início dos ensaios. Seguindo a bula, para cada amostra foram realizados os procedimentos pertinentes. Sendo assim, foram adicionados aproximadamente 10 microlitros de soro na cavidade do dispositivo com o auxílio da pipeta capilar e após 5 segundos foram dispensadas 2 gotas da solução de extração (~80 μL) no mesmo local. Após esse procedimento, o início de incubação foi selecionado no equipamento. Logo, quando acabou o tempo de incubação contado pelo instrumento (15 minutos) para cada amostra feita, iniciou-se a leitura e emissão dos resultados referentes.



Figura 11 - AFR200, dispositivos testes e leitor de códigos de barras. Foto do equipamento AFR-200 de imunofluorescência e seus componentes: dispositivos testes e leitor de códigos de barras. Fonte: Arquivo Biocon

6.2.1. Interpretação dos resultados

Os resultados obtidos pelo AFR-200S são qualitativos, sendo lidos pelo equipamento sinais valorados como ≥ 1.00 e interpretados como positivos e < 1.00 negativos para presença de anticorpos IgG anti RBD. Ainda resultados inválidos apresentam erro de leitura e não emite resultado para interpretação, sendo sinalizados pelo instrumento com N/A indicando falha na quantidade de amostra ou curva de calibração incorreta para o analito buscado.

7 PERFORMANCE CLÍNICA

7.1. Sensibilidade

Foi calculada a partir da proporção de todos os resultados obtidos com o kit para detecção de anticorpos IgG/IgM positivos entre todos os verdadeiramente positivos (resultados obtidos pelo método de referência aplicado). Assim, sendo expresso em forma de porcentagem.

7.2. Especificidade

A partir da proporção de resultados não reagentes no kit de detecção de anticorpos IgG/IgM entre todos os verdadeiros negativos, foi expressa a especificidade dos testes nesse estudo.

7.3. Valor preditivo positivo (VPP)

Esse valor é a proporção de amostras verdadeiramente positivas entre todos os indivíduos com teste positivo. Desse modo, expressa a probabilidade de uma amostra com resultado positivo ser realmente uma amostra positiva.

7.4. Valor preditivo negativo (VPN)

Essa é a proporção de amostras verdadeiramente negativas entre todos os indivíduos com teste negativo. Assim, expressa a probabilidade de uma amostra com resultado negativo ser realmente uma amostra negativa.

7.5. *Reprodutibilidade*

5 amostras reagentes para IgG e IgM com índices de ELISA que variaram de 1,6 a 8,2 foram selecionadas para outro operador executar os ensaios. E essas amostras também eram positivas nos testes de Biomanguinhos para IgM. Ainda, foram selecionadas 5 amostras não reagentes para IgG e/ou IgM. Amostras negativas foram reproduzidas uma vez e as positivas em duplicata.

7.6. *Repetibilidade*

Para verificar a repetibilidade dos testes, 12 amostras foram selecionadas para os ensaios. Das quais tiveram resultados reagentes no ELISA com índices distintos entre 1,1 a 8,8.

7.7. *Variação de temperatura*

Para avaliar o desempenho do teste em relação à variação de temperatura, 10 testes foram armazenados em geladeira (~4 °C) durante pelo menos 1 hora antes da execução dos ensaios e seus resultados comparados com os de referência aplicado no estudo.

7.8. *Análises estatísticas*

7.8.1. Índice kappa

O método foi utilizado para avaliar o nível de reprodutibilidade (confiabilidade) entre os resultados obtidos. Considerando os valores de 0-0,20 baixa concordância, 0,21-0,60 concordância moderada, 0,61-0,80 boa concordância e 0,81-1,00 ótima concordância e valores de p abaixo de 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. O mesmo foi calculado no *software* IBM SPSS Statistics.

7.8.2. Teste de McNemar

O método não-paramétrico foi aplicado para determinar se as proporções encontradas nos resultados eram diferentes ou similares. Assim, foi comparado dois dos resultados de cada amostra para cada metodologia aplicada utilizando a hipótese de que não havia diferença significativa entre os resultados obtidos. O mesmo foi calculado no *software* IBM SPSS Statistics.

7.8.3. Teste de *Mann-Whitney*

Para observação das diferenças estatísticas esperadas entre os resultados das amostras de vacinados, foi utilizado o teste não-paramétrico.

7.8.9. Geração dos dados gráficos

Para construção dos gráficos foi utilizado o *software* GraphPad PRISM 9.

8 RESULTADOS

8.1. Amostras reagentes e não reagentes

Para esse estudo, dentre as amostras selecionadas positivas para anticorpos IgG e/ou IgM pelos métodos ELISA e DPP, 45% delas também foram positivas para RT-qPCR segundo os dados do estudo anterior (figura 12).

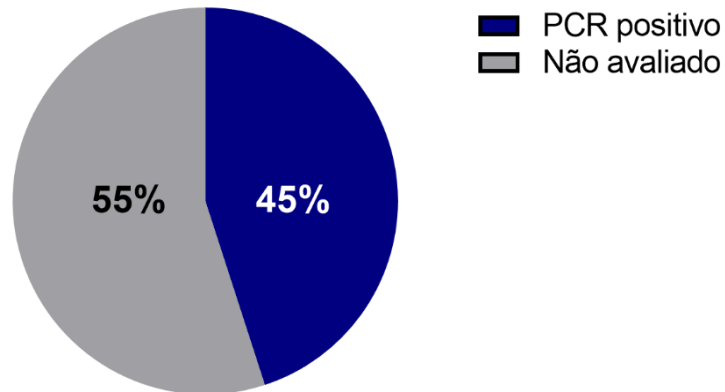


Figura 12. Porcentagem de amostras positivas para RT-PCR em relação ao total de amostras positivas para IgG e IgM. Gráfico de pizza representando porcentagem de amostras positivas e não avaliadas para RT-PCR (não testadas), do banco de amostras do CT-Vacinas. Sendo 45% (18) positivas (em azul) e não avaliadas e 55% (24) (em cinza). Fonte: Criado pelo autor no GraphPad PRISM 5.

Ainda, de todas as amostras que foram caracterizadas pela metodologia ELISA positivas para IgG, 40% delas foram reagentes nos testes da USP para IgM (figura 13).

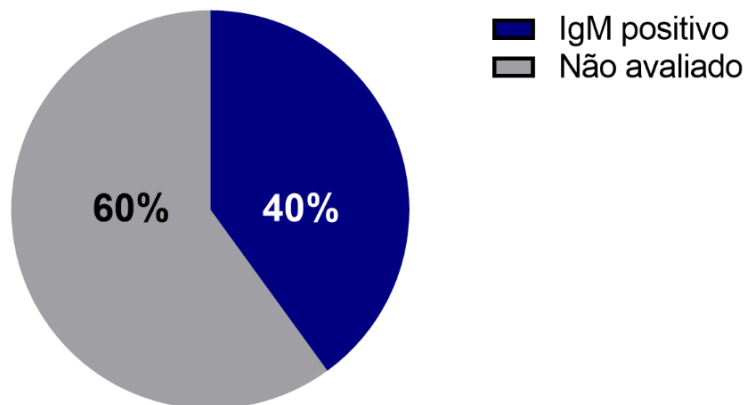


Figura 13. Porcentagem de amostras positivas na USP para IgM. Gráfico de pizza representando porcentagem de amostras, do banco do CT-Vacinas, com resultado reagente para IgM e não avaliadas. Assim, 40% foram positivas (16) (em azul) para IgM na USP e 60% (em cinza) não foram testadas nessa instituição. Fonte: Criado pelo autor no GraphPad PRISM 9.

Após a testagem realizada com as 42 amostras previamente caracterizadas e sabidamente reagentes para anticorpos do tipo IgG para o ELISA, das quais englobam positivas para IgM no teste rápido de Biomanguinhos e positivas para RT-PCR, para os ensaios da USP e para RT-PCR e não reagentes para IgM, o resultado encontrado foi de 40 amostras positivas e 2 negativas para IgG no ensaio imunocromatográfico. Assim, foi expressa uma sensibilidade de 95,23% nesse ensaio. Além disso, 37 amostras foram positivas e 3 foram negativas para IgM no teste imunocromatográfico. Porém, os resultados anteriores dessas 3 amostras não foram caracterizados para IgM em nenhuma metodologia, dessa forma, não houve comparação. Para o total de 37 amostras analisadas, foi encontrada a sensibilidade de 100%. O VPP para o ensaio foi de 100% e o VPN de 93,75%. A seguir é possível observar a representação de amostras positivas para anticorpos IgG e IgM em relação às características das amostras previamente determinadas (figura 14).

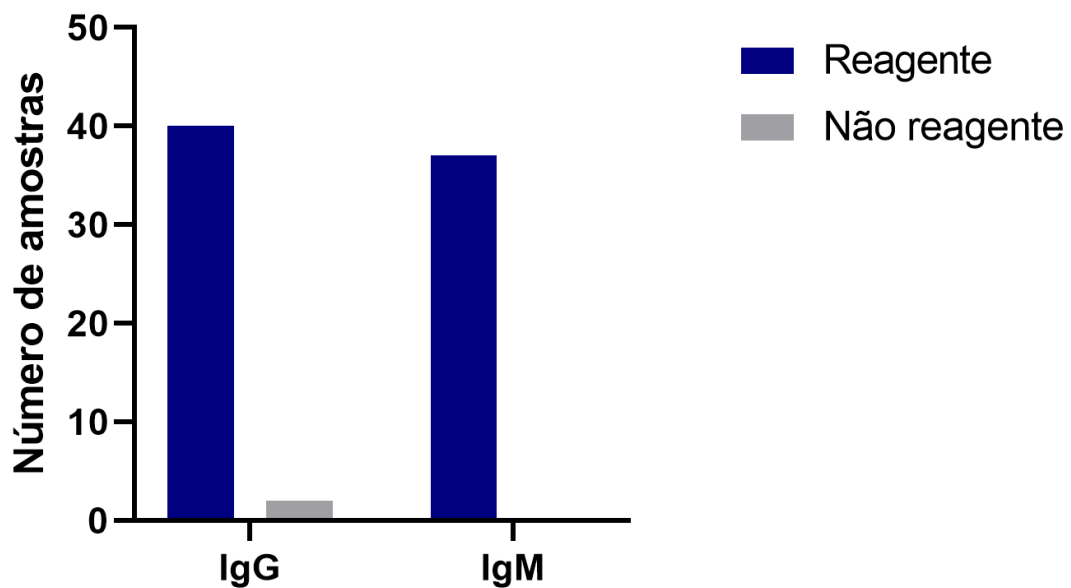


Figura 14. Número de amostras positivas no teste rápido para IgG e IgM. Gráfico representando número de amostras de acordo com os resultados reagentes e não reagentes para anticorpos IgG e IgM contra o SARS-CoV-2. Das 42 amostras, 40 foram reagentes para anticorpos IgG no ensaio imunocromatográfico e 2 não reagentes. Por outro lado, 37 amostras foram positivas para IgM para o mesmo ensaio. Fonte: Criado pelo autor no GraphPad PRISM 9.

Para amostras positivas com resultados em que foram observadas linhas fracas reagentes foram registradas fotografias que estão demonstradas a seguir. A observação referente a amostra 10 foi visual, na fotografia sem ajustes de sombras e contrastes não há linha formada expressiva. As amostras reagentes 29 e 36 também apresentaram linhas fracas (figura 15) tanto para IgG quanto para IgM.

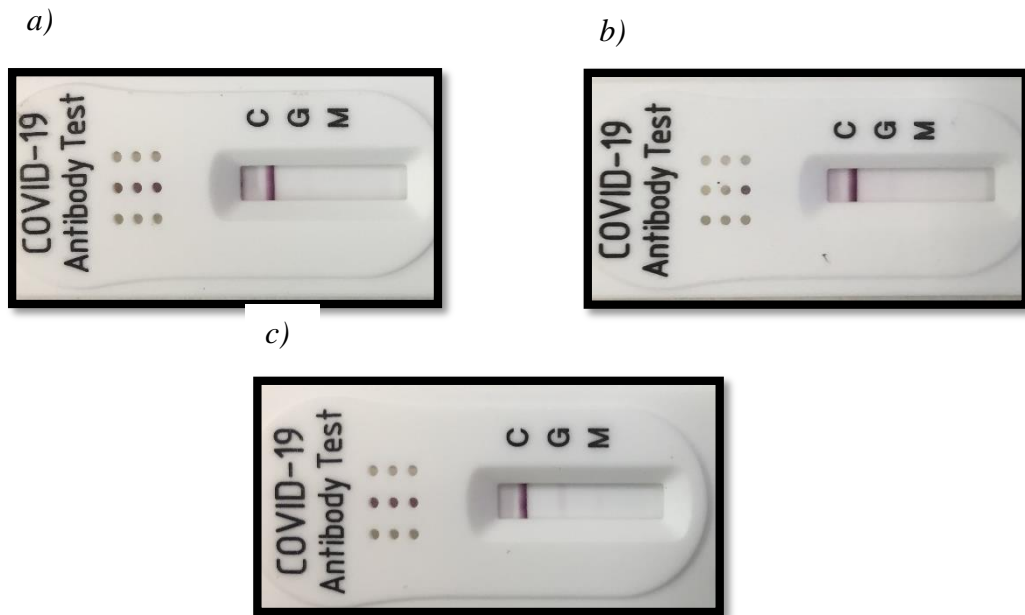


Figura 15. Resultados das amostras 10 (a), 29 (b) e 36 (c). Resultados das amostras 10 (a), 29 (b), 36 (c), positivas para IgG e IgM. Visualmente foi possível observar as linhas reagentes, para as fotografias há apenas sombra observada, exceto para a amostra 36, a qual a linha está com coloração mais intensa (c). Fonte: Fotografias tiradas pelo autor.

Para as amostras negativas, a presença de alterações com icterícias ou positivas para arboviroses não ocasionaram resultados reagentes para anticorpos IgG e IgM em nenhum dos testes realizados. Sendo observada uma especificidade de 100% nesse ensaio. Portanto, as amostras negativas testadas nesse ensaio foram de encontro ao esperado. Dessa forma, o total de amostras negativas no ensaio imunocromatográfico, das quais não apresentaram linhas testes reagentes para IgG e IgM foi de 30, representando 45% das amostras totais do banco CT Vacinas (figura 15). Por outro lado, os ensaios com amostras reagentes apresentaram alguns resultados com linhas reagentes fracas para o IgG e IgM no ensaio imunocromatográfico, representando 11,11% das amostras totais do CT-Vacinas utilizadas. Por fim, as amostras reagentes que apresentaram linhas testes com intensidade normal (rosadas fortes), representam 43,9% da totalidade de amostras desse ensaio (figura 16).

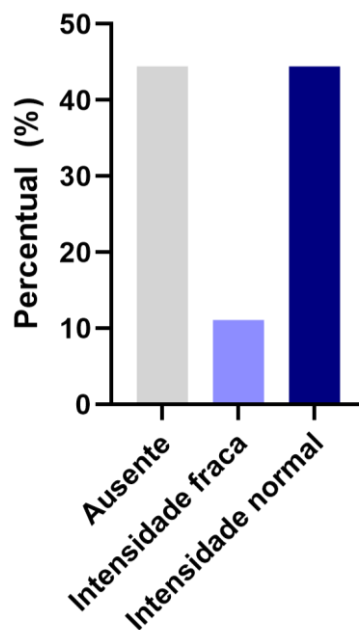


Figura 16 - Percentual de linhas testes IgG e IgM apresentadas nos testes rápidos de acordo com a intensidade de cor. Percentual de amostras do banco CT Vacinas com resultados não reagentes para anticorpos IgG e IgM no ensaio imunocromatográfico (45%), que apresentou linhas testes ausentes no dispositivo teste, amostras reagentes para IgG e IgM no ensaio imunocromatográfico que apresentou linhas com intensidade fraca (11,11%) e amostras reagentes nesse mesmo ensaio que apresentou resultados reagentes com linhas testes normais no dispositivo teste. Fonte: Criado pelo autor no GraphPad PRISM 9.

No ensaio de reprodutibilidade, todos os testes foram reproduzidos, as 5 amostras testadas foram positivas para IgG e IgM, contudo, os dois ensaios apresentaram linhas fracas na linha teste para IgG e IgM, tanto do primeiro operador quanto do segundo. Ainda, soros negativos que foram submetidos ao teste de reprodutibilidade foram não reagentes para os anticorpos IgG e IgM.

Os resultados observados na repetição por outro operador são comparáveis, dos quais nenhum deles apresentou divergência em relação ao primeiro ensaio, apresentando 100% de repetibilidade. Para a amostra 6, não houve reação na linha teste do anticorpo IgM quando o primeiro e o segundo operador efetuaram o ensaio imunocromatográfico e a linha teste para IgG mostrou-se muito fraca para essa mesma amostra em ambas execuções dos operadores. De outro lado, as amostras 39 e 40 também apresentaram resultados idênticos, sendo não reagentes nos testes rápidos do primeiro e segundo procedimento, apesar de apresentarem ELISA positivos para o IgG (tabela 2).

Tabela 2 – Resultados amostras reagentes para IgG e ou IgM e relação com índice ELISA

ID	IgM	IgG	Índice ELISA
4	Reagente	Reagente	8,8
5	Reagente	Reagente	2,5
6	Não reagente	Reagente	4,7
7	Reagente	Reagente	2,7
8	Reagente	Reagente	1,1
11	Reagente	Reagente	4,1
12	Reagente	Reagente	3,3
13	Reagente	Reagente	1,9
14	Reagente	Reagente	5,4
15	Reagente	Reagente	2,4
39	Não reagente	Não reagente	1,4
40	Não reagente	Não reagente	1,4

Legenda: ID -Identificação da amostra.

Complementarmente, os índices obtidos previamente por ELISA para IgG contra SARS-CoV-2 foram comparados com os resultados encontrados nos ensaios para detecção de IgG nos testes rápidos. Nesse contexto, é importante destacar que os resultados dos testes imunocromatográficos são qualitativos e as amostras são classificadas como reagentes ou não reagentes. Além disso, para interpretação do índice ELISA valores $\leq 1,1$ são considerados reagentes, valores $< 0,8$ não reagentes e os valores dentro dessa faixa ($0,8 \leq I < 1,1$) são considerados indeterminados. Desse modo, na figura 16, as amostras foram discriminadas conforme a classificação citada anteriormente e relacionadas com índice (I) apresentado no ensaio imunoenzimático.

Assim, pode-se observar que amostras com índices abaixo de $\sim 0,8$ no ELISA também foram determinadas como negativas e todas acima desse valor foram reagentes pelo teste rápido para anticorpos IgG (figura 17). Evidenciando que há uma relação direta entre o índice ELISA e a positividade nos ensaios para detecção de IgG nos testes rápidos. Ainda, é demonstrado que a diferença encontrada entre os grupos classificados como reagente e não reagente é significativa ($p = 0001$) pela aplicação do teste de Mann-Whitney (****).

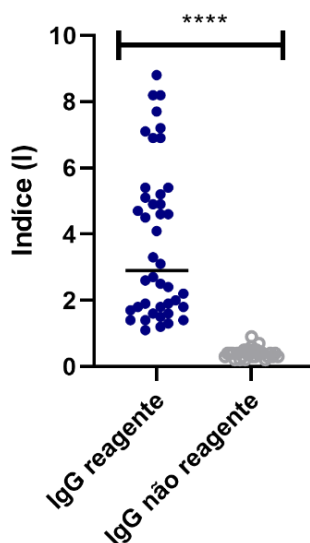


Figura 17. Índice ELISA IgG x Resultados IgG testes rápidos. Amostras com índices abaixo de $\sim 0,8$ no ELISA estão determinadas como não reagentes para IgG e todas acima desse valor foram reagentes pelo teste rápido para anticorpos IgG. A relação direta entre o índice ELISA e a positividade nos ensaios para detecção de IgG nos testes rápidos pode ser inferida nessa análise. Fonte: Criado pelo autor no GraphPad PRISM 9.

Os resultados obtidos a partir das análises dos dados pelo Teste exato de McNemar vão de encontro aos dados descritos anteriormente e demonstram que não há diferença nas proporções de resultados obtidos pelos métodos de ELISA IgG e testes imunocromatográficos, ambos para detecção de IgG ($p = 0,125$), para as 72 amostras analisadas com nível de confiança de 0,05 (tabela 3 e 4).

Tabela 3 - Tabulação cruzada - McNemar ELISA IgG x Teste rápido IgG/IgM

		Teste Rápido IgG/IgM			
		NR	R	Total	
ELISA IgG	NR	Contagem	30	0	30
		% ELISA IgG	100,0	0,0	100,0
		% Teste rápido	88,2	0,0	41,7
		Contagem	4	38	42
Total	R	% ELISA IgG	9,5	90,5	100,0
		% Teste rápido	11,8	100,0	58,3
		Contagem	34	38	72
		% ELISA IgG	47,2	52,8	100,0
	% Teste rápido	100,0	100,0	100,0	

Legenda: NR - não-reagente; R (reagente)

Tabela 4 - Amostras relacionadas de Resumo de Teste de Mudança de McNemar

N total	72
Estatística de teste	2,250 ^a
Grau de Liberdade	1
Sinal assintótico (teste de dois lados)	0,134
Exact Sig. (teste de dois lados)	0,125

Legenda: N total- número total de amostras. a. O valor p exato é calculado com base na distribuição binomial, pois existem 25 registros ou menos. N Total -número de amostras total.

Além disso, o índice Kappa refletiu uma forte confiabilidade entre os resultados obtidos por ELISA IgG e testes rápidos IgG ($k = 0,888$; $p = <0,001$) (tabela 5 e 6).

Tabela 5 - Tabulação cruzada -Kappa ELISA IgG x Teste Rápido IgG

		Teste rápido IgG			
		NR	R	Total	
ELISA IgG	NR	Contagem	30	0	30
		Contagem Esperada	14,2	15,8	30,0
		% do Total	41,7	0,0	41,7
	R	Contagem	4	38	42
		Contagem Esperada	19,8	22,2	42,0
		% do Total	5,6	52,8	58,3
Total	Contagem	34	38	72	
	Contagem Esperada	34,0	38,0	72,0	
	% do Total	47,2	52,8	100,0	

Legenda: NR - não-reagente; R (reagente)

Tabela 6 - Amostras relacionadas de Resumo de Teste Kappa

	Valor	Erro Padrão Assimétrico ^a	T Aproximado ^b	Significância aproximada
Medida de concordância Kappa	0,888	0,054	7,581	<0,001
Nº de casos Válidos	72			

Legenda: N° - número. a. Não considerando a hipótese nula. b. Uso de erro padrão assintótico considerando a hipótese nula.

8.2. Amostras de indivíduos vacinados

Os ensaios realizados com as amostras de vacinados com Coronavac foram significativos quanto a sensibilidade, especificidade e confiabilidade. Sendo encontrados 9 resultados IgG positivos para os testes rápidos e 10 IgG anti-RBD positivos para os ensaios de imunofluorescência no total de 28 amostras disponibilizados. Desse modo, tem-se a especificidade dos testes imunocromatográficos em relação aos de imunofluorescência de 90%. Por outro lado, a sensibilidade foi de 72,22% do qual houve maior discordância entre os resultados, sendo um deles positivo para IgG no teste rápido e na imunofluorescência não reagente. Ainda, foram observados seis resultados não reagentes para os testes imunocromatográficos IgG e reagentes na imunofluorescência. Entretanto, a maioria dessas amostras apresentaram sinal analítico de fluorescência abaixo de 4, exceto uma que apresentou valor 6,5.

A intensidade de fluorescência captada pelo equipamento de imunofluorescência está atrelada à reação positiva ou negativa do ensaio. Essa intensidade é dividida pelo valor de *cutt-off* e um sinal analítico de forma numérica é emitido no resultado. No entanto, esse valor não tem significância diagnóstica, segundo a bula do fabricante. Por outro lado, a interpretação está atrelada a esse sinal, sendo considerado reagente quando ≥ 1.00 e não reagente quando < 1.0 (tabela 7 e 8).

Tabela 7 - Resultados Teste Rápido IgG x Índice RBD FIA 1-14

Amostra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Índice Imunofluorescência	<0.5	4.4	0.5	12.5	<0.5	1.2	<0.5	<0.5	7.4	5.1	7.4	<0.5	<0.5	16.9
Resultado Teste rápido IgG	NR	R	R	R	NR	R	NR	NR	R	R	R	NR	NR	R

Legenda: NR - não-reagente; R (reagente)

Tabela 8 - Resultados Teste Rápido IgG x Índice RBD FIA 15-28

Amostra	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Índice Imunofluorescência	14.1	2.0	<0.5	3.6	6.5	2.6	19.5	1.3	2.3	1.1	1.1	12.9	<0.5	0.8
Resultado Teste rápido IgG	R	NR	NR	NR	NR	R	R	R	NR	NR	NR	R	NR	NR

Legenda: NR - não-reagente; R (reagente)

É possível verificar que o sinal analítico apresentado na imunofluorescência tem relação com a positividade no teste imunocromatográfico para anticorpos IgG (figura 18), sugerindo que valores maiores de sinal analítico estão associados a tendência do teste imunocromatográfico ser reagente. Além disso, foi demonstrado que a discriminação entre amostras reagentes e não reagentes para IgG (teste rápido) pelo teste de fluorescência é significativa ($p=0001$) pela aplicação do teste de *Mann-Whitney* (****).

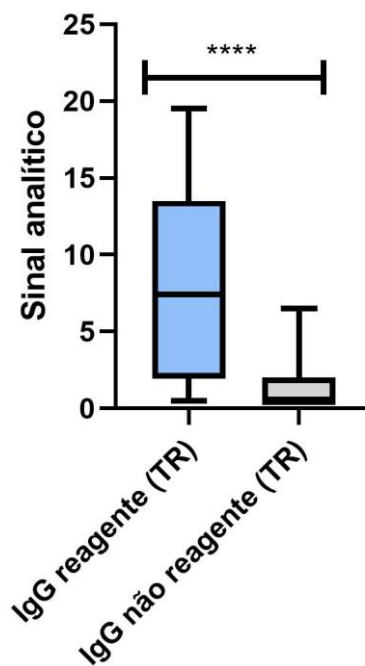


Figura 18. Relação entre sinal analítico Imunofluorescência e resultados obtidos nos testes rápidos IgG. É possível verificar que o sinal analítico apresentado na imunofluorescência tem relação com a positividade no teste imunocromatográfico para anticorpos IgG, sugerindo que valores maiores de sinal analítico estão associados a tendência do teste imunocromatográfico ser reagente. Fonte: Criado pelo autor no GraphPad PRISM 9.

Ao observar os dados a seguir (figura 19), todas as amostras reagentes para Coronavac apresentaram um sinal acima de 1, conforme mencionado na interpretação dos resultados. Por outro lado, em relação as amostras de indivíduos vacinados com Coronavac, 18 amostras foram reagentes para anticorpos IgG anti-RBD e 10 amostras foram não reagentes para os mesmos anticorpos. Com a aplicação do teste de *Mann-Whitney* foi comprovado que o método diferencia de forma significativa ($p=0001$) as amostras positivas e negativas no grupo de vacinados com Coronavac, representado por ****.

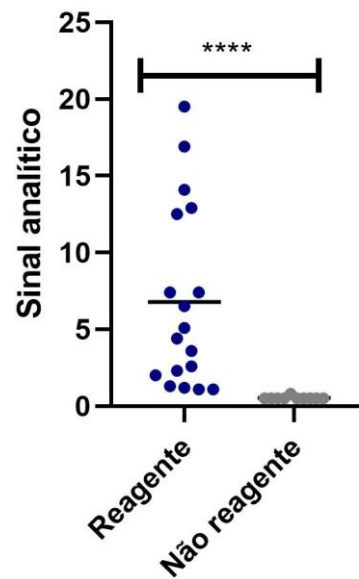


Figura 19. Relação sinal analítico e resultados da imunofluorescência IgG anti-RBD. Nessa observação verifica-se que todas as amostras reagentes para Coronavac apresentaram um sinal acima de 1. 18 amostras foram reagentes para anticorpos IgG anti RBD e 10 amostras foram não reagentes para os mesmos anticorpos. Fonte: Criado pelo autor no GraphPad PRISM 9.

Por fim, os resultados obtidos a partir das análises dos dados pelo Teste Exato de McNemar demonstram que não há diferença nas proporções de resultados obtidos pelos métodos de imunofluorescência para detecção de anticorpos IgG anti-RBD e testes rápidos IgG ($X^2 p= 0,125$), para as amostras de vacinados com Coronavac analisadas (28) em um nível de confiança 0,05 (tabelas 9 e 10).

Tabela 9 - Tabulação cruzada - McNemar RBD IgG * Teste rápido IgG

		Teste Rápido			
		NR	R	Total	
RBD IgG	Contagem	9	1	10	
	NR	% RBD IgG	90,0	10,0	100,0
	% Teste Rápido	60,0	7,7	35,7	
	Contagem	6	12	18	
	R	% RDB IgG	33,3	66,7	100,0
	% Teste Rápido	40,0	92,3	64,3	
Total	Contagem	15	13	28	
	% RBD IgG	53,6	46,4	100,0	
	% Teste Rápido	100,0	100,0	100,0	

Legenda: NR - não-reagente; R (reagente) Fonte: Criado pelo autor no IBM SPSS Statistics

Tabela 10 - Amostras relacionadas de Resumo de Teste de Mudança de McNemar

N total	28
Estatística de teste	2,286 ^a
Grau de Liberdade	1
Sinal assintótico (teste de dois lados)	0,131
Exact Sig. (teste de dois lados)	0,125

Legenda: N total – número total de amostras

E o teste de kappa mostrou que há uma confiabilidade moderada entre os resultados dos testes imunocromatográficos e na imunofluorescência para detecção de IgG ($k = 0,510$ $p = 0,004$) para essas mesmas amostras relacionadas (tabelas 11 e 12).

Tabela 11 - Tabulação cruzada - Kappa RBD IgG * Teste rápido IgG

		Teste Rápido IgG			
		NR	R	Total	
RBD IgG	NR	Contagem	9	1	10
		Contagem Esperada	5,4	4,6	10,0
		% do Total	32,1	3,6	35,7
RBD IgG	R	Contagem	6	12	18
		Contagem Esperada	9,6	8,4	18,0
		% do Total	21,4	4,9	64,3
Total		Contagem	15	13	28
		Contagem Esperada	15,0	13,0	28,0
		% do Total	53,6	46,4	100,0

Legenda: NR - não-reagente; R (reagente)

Tabela 12 - Amostras relacionadas de Resumo de Teste de Mudança de McNemar

	Valor	Erro Padrão Assimétrico ^a	T Aproximado ^b	Significância aproximada
Medida de concordância Kappa	0,888	0,054	7,581	<0,001
Nº de casos Válidos	72			

Legenda: a. Não considerando a hipótese nula. b. Uso de erro padrão assintótico considerando a hipótese nula.

9 DISCUSSÃO

Apesar da metodologia de RT-PCR ser a indicação prioritária para o diagnóstico de COVID-19, os testes sorológicos, que são indicados para detectar anticorpos contra o SARS-CoV-2, são fundamentais à saúde pública para fornecer dados epidemiológicos que viabilizam o monitoramento frente a pandemia (WONTAKAL et al., 2021), auxiliam na tomada de decisões quanto às diretrizes relacionadas ao cuidado de pacientes, ajudam no entendimento sobre a disseminação da COVID-19 e avaliar o impacto das medidas de contenção e como priorizar os grupos para vacinação (CDC, 2021). Além disso, após muito tempo do início dos sintomas da doença, podem atuar como ferramentas complementares na avaliação médica. Porém, muitas tecnologias para esse fim podem não apresentar os requisitos necessários para obtenção de resultados realmente confiáveis. De modo que, alguns países ensaiam testes disponíveis no mercado para averiguar a performance dos mesmos relacionadas a sensibilidade, especificidade e precisão, para garantir que sua população está sendo testada de forma segura (FDA, 2021). Ainda, é possível verificar, no monitoramento pós-mercado do Brasil, uma quantidade significativa de diferentes marcas de testes rápidos sorológicos submetidos ao monitoramento da qualidade pós-mercado, os quais apresentaram performance abaixo do exigido, resultando em interdições e recolhimento dos lotes envolvidos (ANVISA, 2021b). Assim, esse estudo consistiu em realizar ensaios com um teste rápido para detecção de anticorpos IgG e IgM e avaliar seu desempenho quanto aos parâmetros exigidos pelas normas sanitárias e de saúde. Para isso, amostras positivas e negativas para anticorpos IgG e IgM foram utilizadas. E, amostras coletadas durante a pandemia, de indivíduos vacinados também foram inseridas no estudo.

Os ensaios realizados nesse estudo com 42 amostras positivas e 30 negativas para anticorpos anti SARS-CoV-2 resultaram em boa sensibilidade (95,22) 40/42 e especificidade (100%) 30/30 quando comparadas aos testes de ELISA para IgG e/ou testes rápidos de Bio-Manguinhos e dos pesquisadores da USP. Embora as amostras não tenham sido ensaiadas por metodologia padrão ouro para detecção de anticorpos, todas utilizadas apresentaram resultados que foram de encontro ao esperado. Resultados esses, que vão de encontro a outros achados em estudos de desempenho com testes imunocromatográficos, sinalizando que há maior especificidade em relação à sensibilidade desses kits (DE ASSIS et al., 2022). E, apesar de 2 amostras positivas não ser reagentes para o teste rápido de IgG, o índice ELISA dessas amostras (ambas 1,4) pode indicar que havia concentração de anticorpos abaixo da quantidade mínima

de detecção do teste rápido. Além disso, apesar de controvérsias relacionadas à sensibilidade do ELISA para detecção de anticorpos anti SARS-CoV-2, pesquisadores demonstraram em geral, que há melhor limite de detecção para esse método em comparação aos testes imunocromatográficos (ONG et al., 2020). E, apesar de o PRNT (ensaio de neutralização por redução em placa) ser o mais indicado para detecção de anticorpos neutralizantes, é importante ressaltar que sua execução é muito mais trabalhosa, de custo elevado e necessita de estrutura laboratorial BSL-3 impossibilitando seu uso em grande escala (MUKHERJEE et al., 2014). Dessa forma, se faz necessário que métodos com maior facilidade de uso e menor custo sejam desenvolvidos e validados para atender maior número de populações possível.

Por outro lado, o uso dos testes sorológicos para detecção da infecção aguda é inadequada, porém, nesse ensaio pode-se observar concordância entre as amostras positivas para COVID-19 por RT-qPCR, que de certa forma, pode indicar um melhor desempenho em relação a outros kits em outras validações (BRUNO et al., 2020; ONG et al., 2020). Ou ainda, pode fortalecer a hipótese de que os testes para detecção de anticorpos podem complementar o ensaio molecular e garantir uma abordagem diagnóstica mais eficiente (SINGH et al., 2021). É importante ressaltar que outros estudos indicam que há variabilidade de performance entre os testes sorológicos (COTA et al., 2020) (VAN ELSLANDE et al., 2020) e apesar das limitações impostas por esse ensaio, como moderada amostragem e falta de outras metodologias para comparação, há indícios que o teste em questão possui alta performance quanto a detecção de anticorpos por infecção natural por SARS-CoV-2 e atende aos requisitos de desempenho impostos pelos órgãos sanitários de saúde. Além disso, a não reatividade das amostras coletadas nos testes rápidos antes da pandemia, sugere confiança estabelecida para seu uso, quando atualmente, várias doenças e patologias distintas podem acometer à população com sintomatologia semelhante (COTA et al., 2020). Em geral, os testes sorológicos sofrem interferências de inúmeros anticorpos presentes em amostras, como por exemplo, contato dos indivíduos com outros coronavírus (JIANG; HILLYER; DU, 2020) e infecções com o vírus da dengue podem desencadear resposta com produção de anticorpos que se ligam aos antígenos presentes nos imunoenaios resultando em falsos positivos (LUSTIG et al., 2020). Por isso, foi fundamental que amostras positivas para outras doenças como dengue e Chikungunya tenham sido acrescentadas a esse trabalho, pois aumenta a evidência de busca específica para os anticorpos contra o SARS-CoV-2 do teste rápido ensaiado.

Quanto ao requisito de repetibilidade do ensaio imunocromatográfico, os resultados foram atribuídos em 100% de concordância. As amostras utilizadas em duplicata apresentaram resultados idênticos. De forma que, duas delas foram falsamente negativas para IgG, outras 9 foram reagentes para IgG e IgM e apenas uma foi não reagente para IgM, repetindo o primeiro resultado obtido. Por outro lado, quando outro operador realizou a testagem de 10 amostras, 50% positivas e 50% negativas para anticorpos IgG e IgM, foram totalmente reproduzidos (100%) quando comparados aos resultados do primeiro operador. Entretanto, há uma limitação nesse ensaio, pois foram feitos em menor quantidade de vezes para representar uma precisão efetiva, sendo mais aceita como precisão intermediária, da qual tem-se um bom resultado (ANVISA, 2003). Ainda que, estudos mostrem que há influência da variação de temperatura em testes rápidos, quando submetidos a temperaturas baixas podem interferir na especificidade e em temperaturas mais altas na sensibilidade (HAAGE et al., 2021), não houve diferença entre os resultados obtidos nesse ensaio, quando os dispositivos testes foram submetidos a baixa temperatura ($\sim 4^{\circ}\text{C}$) e logo depois a temperatura ambiente ($\sim 21^{\circ}\text{C}$).

A correlação entre o índice do ELISA IgG e resultados emitidos por testes imunocromatográficos de IgG não é usual, pois sua interpretação é semi-quantitativa. Visto que, geralmente, encontramos trabalhos os quais utilizam testes quantitativos para fazer essa análise (ALBERT et al., 2021; LANDAAS et al., 2021). Porém, é interessante salientar que para esse estudo, a observação é que há indícios de alguma relação entre o índice ELISA e os resultados do IgG para o teste rápido. De toda forma, estudos mais aprimorados devem ser feitos para confirmar essas informações. Além disso, corroborando para que fosse efetiva a avaliação do desempenho do teste analisado, para detecção de anticorpos IgG, as análises estatísticas com kappa ($k = 0,888$; $p < 0,001$) e Mcnemar ($p = 0,125$) mostrou confiabilidade alta entre os resultados obtidos com o método comparativo. O que vai de encontro, até mesmo apresenta achados estatísticos relevantes quando observamos outros estudos de avaliação de testes quantitativos como de quimioluminescência, RT-PCR e ELISA, usando comparações diretas entre os resultados de amostras com presença ou ausência de anticorpos IgM, IgG e IgA, que obtiveram uma concordância geral de 90% ($kappa = 0,64$ $p < 0,001$) (LIPPI et al., 2020b).

As amostras de indivíduos vacinados com Coronavac apresentaram perfis diferentes nesse estudo, com sensibilidade boa (73,22%) e com alta especificidade (90%) em relação ao imunoensaio de fluorescência. Apesar dos achados há complexas interpretações as quais não foram abordadas neste estudo, como a caracterização completa das amostras coletadas, bem

como, idade, doenças pré-existentes, sexo, infecção natural pelo SARS-CoV-2 e outras diferenças amostrais das quais poderiam interferir nesse ensaio (BICHARA et al., 2021). Ainda, estudos demonstram que apesar de vários imunoenaios com a finalidade de detectar anticorpos, um dos desafios é garantir um resultado definitivo, pois a maior parte desses kits demonstram diferenças de desempenho em cenários variados (GHAFARI; MEURANT; ARDAKANI, 2020). E, é importante ressaltar que a afinidade entre os antígenos e anticorpos estão associados à escolha do epítipo de ligação usado na matéria-prima do dispositivo teste, influenciando diretamente na sensibilidade do ensaio (WANG et al., 2020b) e, nesse caso, pode-se inferir que há diferença significativa entre os epítipos utilizados no ensaio imunocromatográfico e no de fluorescência. Além disso, outras metodologias como ELISA IgG ou neutralização em placa seriam ferramentas importantes para obtenção de dados específicos para essa comparação, das quais não houve oportunidade de execução nesse presente estudo.

De toda forma, sabe-se que as vacinas tem matérias primas distintas (FIOCRUZ; NINOMIYA; 2021) e os testes diagnósticos também possuem particularidades em sua composição que se liga ao alvo específico. Os kits imunocromatográficos utilizados nesse estudo, detectam anticorpos IgG e IgM que se ligam à proteína N, e os testes de imunofluorescência detectam IgG anti-RBD. Dessa forma, são alvos distintos dos quais podem interferir na ligação entre os anticorpos presentes nas amostras e o antígeno presente no dispositivo teste. A vacina Coronavac é composta por vírus inativado, a qual desencadeia uma resposta imunológica para vários antígenos do SARS-CoV-2, e apesar de algumas amostras reagentes para IgG anti RBD (6) não apresentarem resultados reagentes no teste avaliado, a maioria dos resultados mostrou-se compatível com a imunofluorescência, com uma confiabilidade moderada (0,510) da qual o valor estatístico foi semelhante aos de estudos comparativos com ensaio ELISA e neutralização de redução em placa ($\kappa = 0,591$ $p < 0,0001$) (DOLSCHEID-POMMERICH et al., 2021). Ainda que os achados sejam preliminares, é interessante avaliar a utilização dos testes rápidos de detecção de anticorpos em pessoas vacinadas, pois, esses resultados não são suficientes para demonstrar se os anticorpos reagentes são induzidos ou não pela vacinação, mas podem ter utilidade complementar em análises de dados obtidos por outras metodologias.

10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É possível afirmar pelo estudo que há qualidade empregada no teste avaliado, quanto à sensibilidade e especificidade para detecção de anticorpos IgG e IgM em infecção natural pelo SARS-CoV-2. Embora tenha sido limitado os recursos utilizados no trabalho, também é possível observar certa concordância nos resultados de amostras de indivíduos vacinados com Coronavac. Apesar dos achados, é crucial que análises mais aprofundadas sejam feitas, como aumentar o número de amostras e caracterizá-las com outros métodos, além de incluir amostras de diferentes resultados em RT-PCR, e realizar ensaios em campo para verificar o funcionamento em ambientes diversos.

REFERÊNCIAS

- AFZAL, A. Molecular diagnostic technologies for COVID-19: Limitations and challenges. **Journal of Advanced Research**, v. 26, p. 149–159, 2020.
- ALBANI, P. J. R. **Structure and Dynamics of Macromolecules: Absorption and Fluorescence Studies**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=9CiMA3K1aPkC&pg=PA388&lpg=PA388&dq=Albani,+JR,+Absorption+et+Fluorescence:+Principes+et+Ap>>.
- ALBERT, E. et al. Field evaluation of a rapid antigen test (Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device) for COVID-19 diagnosis in primary healthcare centres. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 27, n. 3, p. 472.e7-472.e10, 1 mar. 2021.
- ANGELINI, M. M. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural proteins 3, 4, and 6 induce double-membrane vesicles. **mBio**, v. 4, n. 4, 13 ago. 2013.
- ANVISA. Monitoramento pós-mercado da qualidade de dispositivos para diagnóstico in vitro da COVID-19: análises laboratoriais. p. 2021, 2021a.
- ANVISA. Monitoramento pós-mercado da qualidade de produtos sujeitos à vigilância sanitária COVID-19. 2021b. ANVISA. [s.d.].
- AZKUR, A. K. et al. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 75, n. 7, p. 1564–1581, 2020a.
- AZKUR, A. K. et al. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 75, n. 7, p. 1564–1581, 2020b.
- BICHARA, C. D. A. et al. Assessment of Anti-SARS-CoV-2 Antibodies Post-Coronavac Vaccination in the Amazon Region of Brazil. **Vaccines**, v. 9, n. 10, p. 1169, 12 out. 2021.
- BRASIL. Janssen Vaccine (Janssen-Cilag). 2021.
- BRUNO, R. et al. **Performance of VivaDiag COVID-19 IgM/IgG Rapid Test is inadequate for diagnosis of COVID-19 in acute patients referring to emergency room department** *Journal of Medical Virology* John Wiley and Sons Inc, , 1 out. 2020.
- BÜNZLI, J. C. G.; PIGUET, C. **Taking advantage of luminescent lanthanide ions** *Chemical Society Reviews*, dez. 2005.
- CDC. 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time rRT-PCR Panel Primer and Probes Note : Oligonucleotide sequences are subject to future changes as the 2019-Novel Coronavirus. 2020.
- CDC. Interim Guidelines for COVID-19 Antibody Testing. **Centers for Disease Control and Prevention**, 2021.
- CHERRY, S. R. , S. J. A. , & P. M. E. Physics in nuclear medicine. In: [s.l.: s.n.].
- CORNILLEZ-TY, C. T. et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nonstructural Protein 2 Interacts with a Host Protein Complex Involved in Mitochondrial Biogenesis and Intracellular Signaling. **Journal of Virology**, v. 83, n. 19, p. 10314–10318, out. 2009.
- COTA, G. et al. Diagnostic performance of commercially available COVID-19 serology tests in Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 101, p. 382–390, 1 dez. 2020.
- COUTARD, B. et al. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ’ s public news and information . n. January, 2020.
- DE ASSIS, T. S. M. et al. Cost-effectiveness of anti-SARS-CoV-2 antibody diagnostic tests in Brazil. **PLOS ONE**, v. 17, n. 2, p. e0264159, 25 fev. 2022.
- DE GROOT, R. J. et al. Coronaviridae family. **International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)**, n. 2011, 2020.
- DE WILDE, A. ET AL. **Host Factors in Coronavirus Replication**. [s.l.] Springer International Publishing, 2012. v. 37
- DHAMA, K. et al. Update on COVID-19, 10-2020. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 4, p. 1–48, 2020.
- DOLSCHIED-POMMERICH, R. et al. Correlation between a quantitative anti-SARS-CoV-2 IgG ELISA and neutralization activity. **Journal of Medical Virology**, v. 94, n. 1, p. 388–392, 1 jan. 2021.
- DRUMMEN, G. P. C. **Fluorescent probes and fluorescence (microscopy) techniques-illuminating biological and biomedical research** *Molecules*, dez. 2012.
- FDA, 2021. [s.d.].
- FIOCRUZ. Como é feita a vacina candidata da Covid-19 da Universidade de Oxford / AstraZeneca ? p. 2020–2021, 2021.
- FREEMAN. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2018.

- FU, Y. Z. et al. SARS-CoV-2 membrane glycoprotein M antagonizes the MAVS-mediated innate antiviral response. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 18, n. 3, p. 613–620, 1 mar. 2021.
- GHAFFARI, A.; MEURANT, R.; ARDAKANI, A. COVID-19 serological tests: how well do they actually perform? **Diagnostics**, v. 10, n. 7, p. 1–14, 2020a.
- GHAFFARI, A.; MEURANT, R.; ARDAKANI, A. **COVID-19 serological tests: how well do they actually perform?** **Diagnostics** MDPI AG, , 1 jul. 2020b.
- HAAGE, V. et al. Impaired performance of SARS-CoV-2 antigen-detecting rapid diagnostic tests at elevated and low temperatures. **Journal of Clinical Virology**, v. 138, 1 maio 2021.
- HOFFMANN, M. et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 271–280.e8, 2020.
- HU, T. et al. A comparison of COVID-19, SARS and MERS. **PeerJ**, v. 8, p. 1–30, 2020.
- HUANG, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497–506, 2020.
- JANSEN, J. M. et al. Influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cell-mediated immunity induced by infection and vaccination. **Journal of Clinical Virology**, v. 119, n. June, p. 44–52, 2019.
- JIANG, S.; HILLYER, C.; DU, L. Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 and Other Human Coronaviruses. **Trends in Immunology**, v. 41, n. 5, p. 355–359, 2020.
- JIANG, S.; HILLYER, C.; DU, L. **Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 and Other Human Coronaviruses**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://biorender.com/>>.
- KADAM, S. B. et al. SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. **Journal of Basic Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 180–202, 2021a.
- KADAM, S. B. et al. **SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights** **Journal of Basic Microbiology** Wiley-VCH Verlag, , 1 mar. 2021b.
- KAUR, S. P.; GUPTA, V. **COVID-19 Vaccine: A comprehensive status report** **Virus Research** Elsevier B.V., , 15 out. 2020.
- KIM, Y. et al. Crystal structure of Nsp15 endoribonuclease NendoU from SARS-CoV-2. **Protein Science**, v. 29, n. 7, p. 1596–1605, 1 jul. 2020.
- KUBA, K.; IMAI, Y.; PENNINGER, J. M. Angiotensin-converting enzyme 2 in lung diseases. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 6, n. 3, p. 271–276, 2006.
- KUBINA, R.; DZIEDZIC, A. Molecular and serological tests for COVID-19. A comparative review of SARS-CoV-2 coronavirus laboratory and point-of-care diagnostics. **Diagnostics**, v. 10, n. 6, 2020.
- LANDAAS, E. T. et al. Diagnostic performance of a SARS-CoV-2 rapid antigen test in a large, Norwegian cohort. **Journal of Clinical Virology**, v. 137, 1 abr. 2021.
- LI, G. et al. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19. The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect, the company's public news and information. n. January, 2020a.
- LI, Q. et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 13, p. 1199–1207, 2020b.
- LIPPI, G. et al. Do genetic polymorphisms in angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) gene play a role in coronavirus disease 2019 (COVID-19)? **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 58, n. 9, p. 1415–1422, 2020a.
- LIPPI, G. et al. Assessment of immune response to SARS-CoV-2 with fully automated MAGLUMI 2019-nCoV IgG and IgM chemiluminescence immunoassays. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine** De Gruyter, , 1 jul. 2020b.
- LUSTIG, Y. et al. Potential antigenic cross-reactivity between SARS-CoV-2 and Dengue viruses. [s.l: s.n.].
- MALIK, Y. A. Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. [s.l: s.n.].
- MASON, R. J. Thoughts on the alveolar phase of covid-19. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 319, n. 1, p. L115–L120, 2020.
- MAZUMDER, R. et al. Detection of novel members, structure±function analysis and evolutionary classification of the 2H phosphoesterase superfamily. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.avatar.se/molscript/>.
- MERK. Merck-and-Ridgebacks-Investigational-Oral-Antiviral-Molnupiravir-Reduced-the-Risk-of-Hospitalization-or-Death-by-Approximately-50-Per-C1CSM. 1 out. 2021.
- MILLER, E.; SIKES, H. D. Addressing Barriers to the Development and Adoption of Rapid Diagnostic Tests in Global Health. **Nanobiomedicine**, v. 2, p. 1–21, 2015.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, B. **Covid-19 Casos e Óbitos Brasil**, 2021a. Disponível em: <https://susanalitico.saude.gov.br/extensions/covid-19_html/covid-19_html.html>
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, B. Anvisa aprova registro de segunda vacina contra o coronavírus. p. 4–6, 2021b.

- MUKHERJEE, S. et al. Mechanism and Significance of Cell Type-Dependent Neutralization of Flaviviruses. **Journal of Virology**, v. 88, n. 13, p. 7210–7220, 1 jul. 2014.
- NI, L. et al. Detection of SARS-CoV-2-Specific Humoral and Cellular Immunity in COVID-19 Convalescent Individuals. **Immunity**, v. 52, n. 6, p. 971- 977.e3, 2020a.
- NI, L. et al. Detection of SARS-CoV-2-Specific Humoral and Cellular Immunity in COVID-19 Convalescent Individuals. **Immunity**, v. 52, n. 6, p. 971- 977.e3, 2020b.
- NINOMIYA, V. Y. VACINAÇÃO COVID-19 : CORONAVAC E ASTRAZENECA / OXFORD. v. 155, p. 1–7, 2021.
- ONG, D. S. Y. et al. Comparison of diagnostic accuracies of rapid serological tests and ELISA to molecular diagnostics in patients with suspected coronavirus disease 2019 presenting to the hospital. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 8, p. 1094.e7-1094.e10, 1 ago. 2020.
- OPAS/OMS. Interpretação dos resultados laboratoriais para o diagnóstico da COVID-19. n. Figura 1, 2020.
- PFIZER. BioNTech and Pfizer Initiate Rolling Submission to European Medicines Agency for SARS-CoV-2 Vaccine Candidate BNT162b2 Nasdaq:BNTX. p. 2–7, 2020.
- PFIZER. PFIZER'S NOVEL COVID-19 ORAL ANTIVIRAL TREATMENT CANDIDATE REDUCED RISK OF HOSPITALIZATION OR DEATH BY 89% IN INTERIM ANALYSIS OF PHASE 2/3 EPIC-HR STUDY. 2021.
- POLAND, G. A.; OVSYANNIKOVA, I. G.; KENNEDY, R. B. SARS-CoV-2 immunity: review and applications to phase 3 vaccine candidates. **The Lancet**, v. 396, n. 10262, p. 1595–1606, 2020.
- RABAAN, A. A. et al. SARS-CoV-2/COVID-19 and advances in developing potential therapeutics and vaccines to counter this emerging pandemic. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 19, n. 1, p. 1–37, 2020.
- RIPHAGEN, S. et al. Hyperinflammatory shock in children during COVID-19 pandemic. **The Lancet**, v. 395, n. 10237, p. 1607–1608, 2020.
- ROMANO, M. et al. **A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping** CellsNLM (Medline), , 20 maio 2020.
- SBPC. Métodos Laboratoriais para Diagnóstico da Infecção pelo SARS-CoV-2 Métodos Laboratoriais para Diagnóstico da Infecção pelo SARS-CoV-2. n. 21, p. 21–23, 2020.
- SCHOEMAN, D.; FIELDING, B. C. **Coronavirus envelope protein: Current knowledge** Virology JournalBioMed Central Ltd., , 27 maio 2019.
- SCHUBERT, K. et al. SARS-CoV-2 Nsp1 binds the ribosomal mRNA channel to inhibit translation. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 27, n. 10, p. 959–966, 1 out. 2020.
- SINGH, R. et al. **COVID-19: Current knowledge in clinical features, immunological responses, and vaccine development** FASEB JournalJohn Wiley and Sons Inc, , 1 mar. 2021.
- SONG, P. et al. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information . n. January, 2020a.
- SONG, P. et al. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information . n. January, 2020b.
- SU, S. et al. **Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses** Trends in MicrobiologyElsevier Ltd, , 1 jun. 2016.
- TAY, M. Z. et al. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 6, p. 363–374, 2020a.
- TAY, M. Z. et al. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 6, p. 363–374, 2020b.
- TO, K. K. W. et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 5, p. 565–574, 2020.
- VAN ELSLANDE, J. et al. Diagnostic performance of seven rapid IgG/IgM antibody tests and the Euroimmun IgA/IgG ELISA in COVID-19 patients. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 8, p. 1082–1087, 1 ago. 2020.
- VANDELLI, A. et al. Structural analysis of SARS-CoV-2 genome and predictions of the human interactome. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. 20, p. 11270–11283, 18 nov. 2020.
- WANG, D. et al. Europium Nanospheres-Based Time-Resolved Fluorescence for Rapid and Ultrasensitive Determination of Total Aflatoxin in Feed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 47, p. 10313–10318, 12 nov. 2015.

- WANG, H. et al. Development of an Inactivated Vaccine Candidate, BBIBP-CorV, with Potent Protection against SARS-CoV-2. **Cell**, v. 182, n. 3, p. 713- 721.e9, 2020a.
- WANG, H. et al. SARS-CoV-2 Proteome Microarray for Mapping COVID-19 Antibody Interactions at Amino Acid Resolution. **ACS Central Science**, v. 6, n. 12, p. 2238–2249, 23 dez. 2020b.
- WHO. Mers Situation Update September 2019. **World Health Organization**, n. September, p. 22765492, 2019.
- WHO. Covid-19 Response Fund. **World Health Organization**, p. 1–6, 2021.
- WONTAKAL, S. N. et al. Approaching the Interpretation of Discordances in SARS-CoV-2 Testing. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 8, n. 7, 1 jul. 2021.
- WU, R. et al. **An Update on Current Therapeutic Drugs Treating COVID-19** **Current Pharmacology Reports** Springer, , 1 jun. 2020.
- ZAKI, A. M. et al. Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 19, p. 1814–1820, 2012.
- ZHOU, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 270–273, 2020.