

Tiago Peralta Cordeiro

**Diagnóstico Laboratorial da Infecção e Determinação do Estado Imune para o
SARS-CoV-2**

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2021

Tiago Peralta Cordeiro

**Diagnóstico Laboratorial da Infecção e Determinação do Estado Imune para o
SARS-CoV-2**

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2021

Tiago Peralta Cordeiro

**Diagnóstico Laboratorial da Infecção e Determinação do Estado Imune para o
SARS-CoV-2**

Trabalho apresentado à Universidade
Fernando Pessoa como parte dos requisitos
para obtenção de grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.

Faculdade Ciências da Saúde
Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2021

Resumo

A pandemia originada pelo *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2) levou a alterações profundas no statu quo da população mundial, que se sentiu coagida a adaptar-se às medidas de segurança impostas, como forma de travar a sua expansão. Efectivamente, o contexto pandémico gerou um esforço redobrado na investigação científica e no desenvolvimento de novas terapêuticas anti-virais, vacinas profiláticas, e em particular aqueles que foram o objecto de estudo desta dissertação, isto é, os testes de diagnóstico da infecção por SARS-CoV-2 e os testes de imunidade.

Com efeito, a revisão bibliográfica aqui apresentada, incide num tema bastante actual e de importância global, pelo que muitos testes de diagnóstico para a infecção por SARS-CoV-2 e de determinação do estado imune, continuam a ser desenvolvidos e aprimorados, à medida que tem vindo a evoluir o conhecimento sobre este vírus e as manifestações da doença causada por este, que é a *Coronavirus Disease 2019* (COVID-19).

Nesta dissertação, discutiu-se o estado da arte relativamente aos diferentes tipos de testes de diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 (moleculares e de antigénio) e de imunidade (que têm por base a resposta humoral ou celular). Nesta análise, teve-se em conta o princípio do método dos testes, a forma como têm sido usados na pandemia e como se complementam entre si, considerando o contexto em que cada um deve ser utilizado e as limitações inerentes aos mesmos.

Concluiu-se que actualmente os testes moleculares são aqueles que apresentam maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico da infecção aguda por SARS-CoV-2. Contudo, os testes rápidos de antigénio, ainda que menos sensíveis e específicos, são mais adequados enquanto testes *Point-Of-Care* (POC) e possibilitam uma resposta mais rápida no combate à pandemia. Realça-se ainda a importância dos testes de imunidade, fundamentais para aferir o estado imune de cada indivíduo relativamente à infecção por

SARS-CoV-2 e para monitorizar a eficácia das vacinas na prevenção da COVID-19.

Porém, é de relevar que o conhecimento científico sobre este tema está em constante atualização, com bastantes avanços e recuos, sendo que no momento de início da dissertação existiam muitas mais questões do que respostas.

Palavras-chave: *coronavirus*; SARS-CoV-2; COVID-19; testes de diagnóstico; RT-PCR em tempo real; RT-LAMP; testes serológicos; testes de antígeno.

Abstract

The pandemic caused by the Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) led to profound alterations in the status quo of the world population that felt compelled to adapt to the imposed safety measures as a form of halting its expansion. The pandemic context generated a reinforced effort in scientific research and development of new antiviral therapies, prophylactic vaccines, and, in particular, those that were the object of study of this dissertation, that is, the diagnostic tests for SARS-CoV-2 infection and immunity tests.

Indeed, the bibliographic review here presented focuses on a very current and of global importance theme, fact by which many diagnostic tests for SARS-CoV-2 infection and tests that determine the immune status continue to be developed and improved, as knowledge about this virus and the manifestations of the related disease, which is Coronavirus Disease 2019 (COVID 19), has been evolving.

This dissertation has discussed the state-of-the-art regarding different types of diagnostic tests for SARS-CoV-2 infection (molecular and antigen) and immunity (based on the humoral or cellular response). The analysis of each test acknowledged the context of usage, their inherent limitations, the method's principle, the application during the pandemic, and how they complement each other.

In conclusion, currently, molecular tests present greater sensitivity and specificity in diagnosing acute SARS-CoV-2 infection. However, although less sensitive and specific, rapid antigen tests are more suitable as Point-Of-Care (POC) tests and enable faster response in combating the pandemic. The importance of immunity tests is also highlighted as fundamental to assess the immune status of each individual concerning SARS-CoV-2 infection and to monitor the effectiveness of vaccines in preventing COVID-19.

However, the scientific knowledge on the topic is constantly being updated, with many advances and setbacks. At the time the dissertation began, there were many more questions than answers.

Keywords: *coronavirus; SARS-CoV-2; COVID-19; diagnostic tests; real-time RT-PCR; RT-LAMP; serological tests; antigen tests.*

Dedicatória

Dedico esta dissertação ao meu querido irmão Diogo Cordeiro, o melhor irmão que alguém podia ter.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais e avós pelo apoio e carinho. Agradeço sobretudo ao meu irmão pelos mesmos motivos e ainda pelo seu apoio informático.

Agradeço à minha orientadora Professora Doutora Fátima Cerqueira por me ter guiado na realização desta dissertação.

Agradeço aos colegas e docentes que me acompanharam neste percurso.

Índice Geral

| | |
|---|------------|
| Lista de Figuras | iii |
| Lista de Tabelas | iv |
| Abreviaturas | v |
| I Introdução | 1 |
| II Desenvolvimento | 7 |
| 1 SARS-CoV-2 | 7 |
| i Nota Histórica | 7 |
| ii Taxonomia e Caracterização do SARS-CoV-2 | 12 |
| iii Patogénese da Infecção por SARS-CoV-2 | 16 |
| 2 Diagnóstico da infecção por SARS-CoV-2 e Determinação do estado imune | 20 |
| i Colheita e Processamento de Amostras | 20 |
| ii Introdução aos Testes de Diagnóstico | 28 |
| iii Diagnóstico Molecular | 29 |
| 1 NGS | 29 |
| 2 PCR | 32 |
| 3 RT-LAMP | 40 |
| 4 CRISPR | 44 |
| 5 Outros Testes Moleculares | 47 |
| iv Testes de Antígeno | 48 |

| | | |
|----|---|-----------|
| v | Testes Serológicos | 51 |
| 1 | Introdução aos Testes Serológicos | 51 |
| 2 | ELISA | 54 |
| 3 | CLIA | 57 |
| 4 | Imunocromatografia de Fluxo Lateral | 59 |
| 5 | Testes de Neutralização | 62 |
| vi | Testes de Imunidade Celular | 63 |
| | III Conclusão | 65 |
| | IV Referências | 67 |

Lista de Figuras

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1 | Fotografias de Microscopia Electrónica de Coronavírus Humanos por Almeida | 8 |
| Figura 2 | Representação Esquemática da Estrutura do SARS-CoV-2 | 16 |
| Figura 3 | Representação Esquemática do Ciclo de Replicação do Sars-Cov-2 | 18 |
| Figura 4 | Representação Esquemática da Colheita por Zaragatoa Nasofaríngea | 23 |
| Figura 5 | Representação Esquemática do Sistema de Embalagem Tripla . . . | 27 |
| Figura 6 | Representação Esquemática do Princípio da Técnica de rRT-PCR . | 34 |
| Figura 7 | Representação Esquemática do Princípio da Técnica de RT-LAMP . | 43 |
| Figura 8 | Representação Esquemática do Mecanismo de Acção do CRISPR . | 45 |
| Figura 9 | Representação Esquemática do Princípio dos Testes Rápidos de Antígeno | 50 |
| Figura 10 | Representação Esquemática do Princípio da Técnica de ELISA . . . | 56 |
| Figura 11 | Representação Esquemática do Princípio dos Testes Rápidos Sero-lógicos | 61 |

Lista de Tabelas

| | | |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Epidemiologia e Apresentação Clínica do SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2 | 13 |
|----------|--|----|

Abreviaturas

| | |
|----------|---|
| Bst | <i>Bacillus stearothermophilus</i> |
| Cas | CRISPR-associated (Associados ao CRISPR) |
| CDC | <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (Centros de Controle e Prevenção de Doenças) |
| cDNA | <i>complementary DNA</i> (DNA complementar) |
| CLIA | <i>Chemiluminescence Immunoassay</i> (Imunoensaio por Quimioluminescência) |
| CMIA | <i>Chemiluminescent Magnetic Microparticle Immunoassay</i> (Imunoensaio de Micropartículas por Quimioluminescência) |
| COVID-19 | <i>Coronavirus Disease 2019</i> |
| CRISPR | <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> (Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespçadas) |
| crRNA | RNA-CRISPR |
| CSG | <i>Coronaviridae Study Group</i> |
| Ct | <i>Cycle threshold</i> |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico) |
| ECA-2 | Enzima Conversora da Angiotensina-2 |
| ELISA | <i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i> (Ensaio de Imun absorção Enzimática) |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| GICA | <i>Colloidal Gold Immunochromatographic Assay</i> (Ensaio Imunocromatográfico de Ouro Coloidal) |
| IL-6 | <i>Interleukin 6</i> (Interleucina 6) |

| | |
|----------|--|
| LAMP | <i>Loop-Mediated Isothermal Amplification</i> (Amplificação Isotérmica Mediada por <i>Loop</i>) |
| LCV | <i>Leuco Crystal Violet</i> (Violeta de Cristal Leuco) |
| LoD | <i>Limit of Detection</i> (Limite de Detecção) |
| MCLIA | <i>Magnetic Chemiluminescence Enzyme Immunoassay</i> (Imunoensaio Enzimático de Quimioluminescência Magnética) |
| MERS-CoV | <i>Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus</i> |
| NAAT | <i>Nucleic Acid Amplification Test</i> (Teste de Amplificação de Ácidos Nucleicos) |
| NGS | <i>Next-Generation Sequencing</i> |
| nsp | <i>nonstructural protein</i> (proteína não estrutural) |
| NTC | <i>Negative Template Control</i> |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| ORF | <i>Open Reading Frame</i> |
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão Fosfato Salino) |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| PHEIC | <i>Public Health Emergency of International Concern</i> (Emergência de Saúde Pública de Âmbito Internacional) |
| POC | <i>Point-Of-Care</i> |
| PRNT | <i>Plaque Reduction Neutralization Test</i> (Teste de Neutralização por Redução de Placas) |
| PTC | <i>Positive Template Control</i> |
| RBD | <i>Receptor-Binding Domain</i> (Domínio de Ligação ao Receptor) |
| RAMP | <i>Rapid Amplification</i> (Amplificação Rápida) |
| RdRP | <i>RNA-dependent RNA Polymerase</i> (RNA Polimerase dependente do RNA) |

| | |
|------------|---|
| RNA | <i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico) |
| RPA | <i>Recombinase Polymerase Amplification</i> (Amplificação de Polimerase por Recombinase) |
| rRT-PCR | <i>Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> (RT-PCR em tempo real) |
| RT-PCR | <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> |
| RT-LAMP | <i>Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification</i> (Amplificação Isotérmica Mediada por <i>Loop</i> com Transcrição Reversa) |
| SARS | <i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i> (Síndrome Respiratória Aguda Grave) |
| SARS-CoV | <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus</i> |
| SARS-CoV-2 | <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i> |
| SENSR | <i>SENSitive Splint-based one-step isothermal RNA detection</i> |
| SL-CoV | <i>SARS-like Coronavirus</i> |
| TC | Tomografia Computadorizada |
| TCR | <i>T-cell receptor</i> |
| VOC | <i>Variant Of Concern</i> (Variante Preocupante) |
| VPP | Valor Preditivo Positivo |
| VTM | <i>Viral Transport Media</i> (Meio de Transporte Viral) |

I Introdução

Em Dezembro de 2019, foi diagnosticada pneumonia de etiologia desconhecida num grupo de pacientes de Wuhan (China), sendo que a causa desse surto de pneumonia viria a ser atribuída a um novo coronavírus, detectado nas amostras recolhidas por lavagem broncoalveolar dos pacientes internados (Zhu *et al.*, 2020b). O isolamento do vírus concretizou-se a 7 de Janeiro de 2020 (Chau *et al.*, 2020) e foi realizado a partir de células epiteliais da via aérea (Zhu *et al.*, 2020b). O ácido ribonucleico (RNA), extraído daquelas amostras, permitiu o sequenciamento do genoma completo do vírus através da combinação de técnicas de *Next-Generation Sequencing* (NGS) (Zhu *et al.*, 2020b). O novo coronavírus foi temporariamente denominado de 2019-nCoV (Zhu *et al.*, 2020b).

No início de 2020, registaram-se vários surtos pelo novo coronavírus noutros países além da China (Rodriguez-Morales *et al.*, 2020). O rápido agravamento da epidemia levou a que a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarasse emergência de saúde pública de âmbito internacional (PHEIC), a 30 de Janeiro de 2020 (World Health Organization, 2020e).

O vírus inicialmente denominado 2019-nCoV, viria a ser renomeado *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2) pelo *Coronaviridae Study Group* (CSG) do *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) (Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2020), sendo a doença provocada por este denominada de *Coronavirus Disease 2019* (COVID-19) pela OMS (World Health Organization, 2020c). O rápido e contínuo aumento do número de casos de infecção por SARS-CoV-2 a nível global, levou a que a OMS decretasse a 11 de Março de 2020, que a epidemia tinha atingido o nível de pandemia (World Health Organization, 2020g).

A pandemia pelo SARS-CoV-2, além do elevado impacto que teve na saúde pública, devido a vários factores, tais como a inexistência inicial de vacinas profiláticas, bem como de um tratamento específico, reflectiu-se ainda em termos económicos e sociais, como consequência das diversas medidas restritivas impostas pelos diferentes governos de cada país às respectivas populações, visando a promoção do distanciamento físico e, conseqüente, redução da taxa de contágio (Sanchez-Duque *et al.*, 2020; Nicola *et al.*, 2020). Dentro das medidas mais restritivas, destacam-se os confinamentos gerais e parciais e o fecho das fronteiras (Sanchez-Duque *et al.*, 2020; Nicola *et al.*, 2020). Medidas estas que em alguns países foram adoptadas somente na iminência do colapso do sistema nacional de saúde, quer por motivos de interpretação legal (até que ponto era eticamente aceitável confinar), quer por receios económicos (pois muitas actividades não podiam ser realizadas por teletrabalho) (Sanchez-Duque *et al.*, 2020; Nicola *et al.*, 2020). Evidenciaram-se assim, conflitos de "economia vs saúde", em particular, dúvidas no quanto ambas não seriam interdependentes (Sanchez-Duque *et al.*, 2020; Nicola *et al.*, 2020; Xiong *et al.*, 2020). Por um lado, estas medidas representam fechos de espaços de trabalho, conseqüente aumento do desemprego e conseqüentes danos à saúde mental de muitos dos directamente afectados (Sanchez-Duque *et al.*, 2020; Nicola *et al.*, 2020; Xiong *et al.*, 2020). Por outro lado, sem estas medidas, verificava-se um aumento da taxa de contágio, conforme acima referido (Sanchez-Duque *et al.*, 2020; Nicola *et al.*, 2020). De entre os locais que são considerados de elevado risco de contágio, destacam-se os restaurantes, hotéis, cafetarias, entre outros, daí que alguns dos dos sectores mais afectados pelas medidas que visaram mitigar a pandemia, tenham sido justamente a restauração, a hotelaria e o turismo (Chang *et al.*, 2020; Nicola *et al.*, 2020).

Actualmente, a transmissão de pessoa para pessoa é considerada a principal forma de contágio do SARS-CoV-2, podendo esta ocorrer pelo contacto físico, assim como por via aérea através de aerossóis (partículas com diâmetro inferior a 5 µm que podem permanecer suspensas no ar, por longos períodos de tempo e deslocarem-se distâncias superiores a

um metro), ou gotículas respiratórias (partículas com diâmetro superior a 5 µm e que conseqüentemente, permanecem suspensas no ar por um período de tempo muito mais reduzido do que os aerossóis, pelo que para que ocorra transmissão viral através destas, o distanciamento físico deverá ser menor), disseminadas pela tosse ou estornutos (Comber *et al.*, 2020; Hassan *et al.*, 2020; World Health Organization, 2020f). No que respeita aos infectados assintomáticos, uma vez que apresentam uma muito baixa carga viral quando comparados com os sintomáticos, supõe-se que o risco de transmissão por parte destes seja mais reduzido (Cao *et al.*, 2020).

Os quadros clínicos de infecção pelo vírus SARS-CoV-2 podem ser muito distintos, na medida em que, em muitos dos casos os portadores permanecem assintomáticos, enquanto que, nas situações mais graves a infecção pode traduzir-se na falência de múltiplos órgãos e choque séptico (Hassan *et al.*, 2020). Contudo, nos portadores sintomáticos, as manifestações clínicas descritas inicialmente como sendo as mais comuns foram febre, tosse não produtiva e astenia (Wang *et al.*, 2020b). No entanto, em estudos posteriores, sintomas como anosmia e disgeusia foram também descritos como sendo bastante frequentes e, além disso, apresentaram um elevado valor preditivo positivo (VPP) (Luers *et al.*, 2020).

O amplo espectro clínico da infecção por SARS-CoV-2, associado à inespecificidade dos sintomas mais comuns decorrentes desta, leva assim a dificuldades de diagnóstico baseado no quadro clínico (Cheng *et al.*, 2020). Desta forma, os testes de diagnóstico laboratorial têm um papel muito relevante no controlo da pandemia, dado que permitem a identificação dos infectados e o seu conseqüente isolamento profilático, com a finalidade de interromper as cadeias de transmissão do vírus e de proporcionar um atendimento rápido por parte dos serviços de saúde numa fase precoce da doença, naqueles que manifestarem sintomas de COVID-19 (Cheng *et al.*, 2020), além de permitir rastrear outros casos possíveis de infecção entre os contactos próximos de um caso índice (Li *et al.*, 2020c). Isto é, rastrear os contactos próximos do primeiro indivíduo infectado a ser detectado pelos profissionais de saúde, num potencial novo surto (Giesecke, 2014).

Os testes mais utilizados actualmente, têm por base a detecção de componentes virais (métodos directos), que pode consistir em material genético ou antigénico, bem como dos anticorpos anti-SARS-CoV-2 produzidos na resposta imune (métodos indirectos) (Direção-Geral da Saúde and INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P. and Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2020a; Gurbuz, 2020). Os testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs), que detectam e amplificam o RNA do SARS-CoV-2, são considerados os testes de diagnóstico mais específicos (Porte *et al.*, 2020; Ravi *et al.*, 2020), nomeadamente a *Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (rRT-PCR) que é a actual técnica *gold standard* de diagnóstico para o SARS-CoV-2 (Direção-Geral da Saúde, 2020b; Li *et al.*, 2020d; Rahbari *et al.*, 2021; World Health Organization, 2020b). Os testes rápidos de detecção de antigénios, surgem como uma alternativa aos testes moleculares, com potenciais vantagens na velocidade de obtenção de resultados e na exigência de maquinaria mais simples (Porte *et al.*, 2020). Os testes serológicos, por oposição aos testes de biologia molecular e de detecção de antigénios, detectam a resposta imune ao vírus em vez do vírus em si (Direção-Geral da Saúde and INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P. and Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2020a; Gurbuz, 2020). Uma vez que muitos portadores do vírus são assintomáticos, os testes serológicos revelam-se assim, como um importante meio de identificar indivíduos, que já estiveram previamente expostos ao SARS-CoV-2, permitindo desse modo, uma maior vigilância epidemiológica (Direção-Geral da Saúde and INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P. and Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2020a; Gurbuz, 2020). Outro objectivo dos estudos serológicos, é a identificação de indivíduos que já apresentam imunidade à infecção por SARS-CoV-2, dados que podem influenciar os planos de vacinação (Gurbuz, 2020).

Esta dissertação foca-se num tema que tem sido um dos principais alvos de investigação nos últimos dois anos, desde o início da pandemia, existindo imensos estudos visando

o desenvolvimento de novos testes de diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 e de imunidade. Isto é, procuram-se criar testes ideais que apresentem todas as características desejadas: simples de executar, rápidos, económicos e fidedignos. Assim, nos testes de diagnóstico, pretende-se que estes apresentem uma elevada especificidade e sensibilidade na detecção de infecção por SARS-CoV-2. Paralelamente, nos testes de imunidade procura-se averiguar de forma rigorosa, o grau de imunidade que um indivíduo apresenta após a recuperação de uma infecção ou após a vacinação, algo bastante relevante, pois um dos principais objectivos que se deseja atingir é o da imunidade de grupo. Neste contexto, pretende-se na revisão bibliográfica aqui desenvolvida, apresentar o estado da arte a respeito desta temática, na qual se expõem as "metas" já alcançadas e as "barreiras" que ainda se pretendem ultrapassar para o desenvolvimento de testes ideais.

A investigação efectuada nesta dissertação consiste numa revisão bibliográfica, que foi realizada no período compreendido entre Outubro de 2020 e Julho de 2021, com o recurso à pesquisa em motores de busca como o Google Scholar, a Biblioteca do Conhecimento Online (b-on), a MEDLINE e a LUBsearch, tendo sido utilizadas as seguintes palavras-chave: *coronavirus*; SARS-CoV-2; COVID-19; *diagnostic tests*; *real-time* RT-PCR; RT-LAMP; *serological tests* e *antigen tests*.

Para a concretização da produção de texto exercida no trabalho de pesquisa e recolha de informação, patente à elaboração de uma dissertação, elegeu-se o LaTeX como uma ferramenta adequada à preparação do documento síntese. Recorreu-se ainda ao BibTex para sistematizar o processo de referenciação nos moldes dos critérios formalizados pelo Manual de Elaboração de Trabalhos Científicos da Universidade Fernando Pessoa.

O capítulo de "Desenvolvimento" desta dissertação, encontra-se dividido em dois subcapítulos. O primeiro subcapítulo aborda o SARS-CoV-2 em si, uma vez que para o desenvolvimento de testes, seja com o objectivo de detecção do vírus, seja com o objectivo de averiguar o grau de imunidade à infecção por este, é crucial conhecer o "inimigo".

Assim, este subcapítulo encontra-se subdividido em três alíneas, consistindo a primeira alínea numa breve nota histórica sobre os "antepassados" do SARS-CoV-2, a segunda alínea incide na taxonomia e estrutura do SARS-CoV-2 e a terceira na sua patogénese. O segundo subcapítulo aborda os testes de diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 e de determinação do estado imune propriamente ditos, encontrando-se organizado em seis alíneas. A primeira alínea, consiste numa revisão das técnicas de colheita e processamento das amostras que se destinam a ser analisadas nos testes discutidos nesta dissertação. A segunda alínea, constitui uma breve introdução aos testes de diagnóstico, na qual se explica a ineficiência das técnicas clássicas, para o diagnóstico do SARS-CoV-2 e a consequente necessidade de serem substituídas pelos testes moleculares (abordados na terceira alínea). A terceira, quarta, quinta e sexta alíneas dizem respeito aos testes moleculares, testes de antigénio, testes serológicos e testes de imunidade celular, respectivamente. No que respeita aos testes referidos, esta dissertação irá centrar-se nos mais utilizados, nomeadamente nos seus fundamentos, vantagens e limitações.

Por fim, o capítulo de "Conclusão", consiste numa breve reflexão final sobre a revisão bibliográfica aqui realizada, na qual se discute a evolução dos testes de diagnóstico e de imunidade, desde o início da pandemia. Abordam-se ainda, os desafios que se pretendem superar e os objectivos a alcançar no futuro.

II Desenvolvimento

1 SARS-CoV-2

i Nota Histórica

Em 1931, uma nova doença respiratória foi descrita por Schalk e Hawn em pintos com duas a três semanas de idade, tendo-se verificado que a doença transmitia-se facilmente para pintos saudáveis, quer por contacto físico, quer pela transferência de exsudados brônquicos, contudo na época não foi possível identificar o agente etiológico responsável (Fabricant, 1998; Schalk & Hawn, 1931). O agente etiológico viria a ser identificado em 1933 por Bushnell e Brandly, como tratando-se de um vírus filtrável e a doença causada por este foi definida como uma laringotraqueíte infecciosa (Bushnell & Brandly, 1933). No entanto, em 1936, Beach e Schalm demonstraram através de estudos de imunidade cruzada que existiam duas estirpes diferentes de vírus que causavam doença respiratória nos pintos, sendo uma destas responsável pela laringotraqueíte infecciosa, enquanto a outra provocava bronquite infecciosa (Beach & Schalm, 1936). Beaudette e Hudson, em 1937, isolaram o vírus responsável pela bronquite infecciosa aviária, tendo este consistido no primeiro coronavírus a ser isolado (Beaudette & Hudson, 1937; Henry, 2020).

Em 1962, foi isolado um vírus humano responsável por doenças respiratórias leves das vias aéreas superiores, ao qual foi atribuído a designação de 229E (Hamre & Procknow, 1966). Em 1965, Tyrrel e Bynoe isolaram um outro vírus humano que foi denominado na época como B814, tendo este sido associado a constipações vulgares (Tyrrell & Bynoe, 1965). Em 1967, Almeida e Tyrrel, através da técnica de Microscopia Electrónica de Mancha Negativa, verificaram que a morfologia dos vírus 229E e B814, era idêntica à do vírus da bronquite infecciosa aviária (Almeida & Tyrrell, 1967). Em 1968, o conjunto de vírus que inclui o vírus da bronquite infecciosa aviária, o vírus 229E, o vírus B814 e

o vírus da hepatite murina, recebeu a designação de coronavírus por um grupo de virologistas, tendo sido esta atribuída devido à semelhança existente entre a morfologia das partículas virais quando visualizadas por microscopia electrónica e a coroa solar, daí a escolha do termo latino *corona* que significa coroa, para se referirem a esses vírus (Figura 1) (Almeida *et al.*, 1968; Henry, 2020). Essa morfologia característica dos coronavírus é resultado das projecções da glicoproteína *spike* através do envelope viral (Henry, 2020).

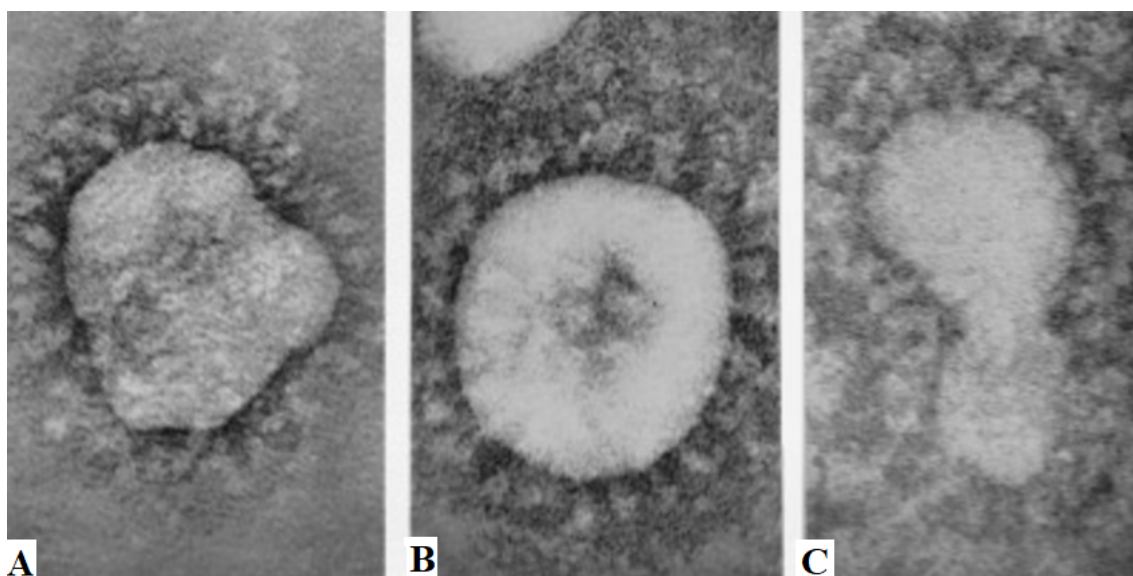


Figura 1: Fotografias de Microscopia Electrónica de Coronavírus Humanos por Almeida. A - 229E; B - B814; C - B814. Adaptado de Lalchhandama (2020)

Em Novembro de 2002, ocorreram vários surtos na China de uma doença que se manifestava inicialmente com sintomas respiratórios leves e febre alta, mas que rapidamente evoluía para uma pneumonia atípica, na medida em que os pacientes não respondiam ao tratamento com antibacterianos e nenhum agente etiológico responsável pelas pneumonias conhecidas até então, havia sido identificado (Peiris *et al.*, 2003; Zhong *et al.*, 2003). A doença foi designada *Severe Acute Respiratory Syndrome* (SARS) e o primeiro caso registado a enquadrar-se na definição da OMS, foi em Novembro de 2002, em Foshan (Cherry & Krogstad, 2004; Zhong *et al.*, 2003). No final de Fevereiro de 2003, a SARS já se havia espalhado para outros países, tendo-se tornado uma epidemia (Vijayanand *et al.*, 2004).

De facto, vários grupos de investigadores estudaram amostras dos pacientes com SARS, das quais se isolou um vírus, que através da análise por microscopia electrónica e de estudos serológicos conjugados com estudos de biologia molecular, foi identificado como sendo pertencente à família *Coronaviridae* e havia a suspeita de que este poderia ser o agente etiológico da doença (Ksiazek *et al.*, 2003; Peiris *et al.*, 2003). Para a confirmação de que o novo coronavírus detectado era definitivamente o agente responsável pela SARS, foram realizados estudos para se verificar se este atendia aos postulados de Koch modificados por Rivers para doenças virais, que comprovam a relação causal entre um determinado vírus e uma doença (Fouchier *et al.*, 2003). Assim, nos estudos efectuados, observou-se que o coronavírus era detectado frequentemente nos indivíduos com SARS, tendo sido isolado de pacientes e cultivado em linhas celulares, nas quais se observou o efeito citopático induzido pela replicação do vírus (Ksiazek *et al.*, 2003). Com a finalidade de se verificar se o coronavírus reproduzia a doença quando inoculado em um hospedeiro susceptível e se induzia uma resposta imune, inocularam-se células Vero contendo o vírus em macacos saudáveis, tendo-se observado sintomas característicos de SARS nestes, cerca de quatro dias após a inoculação (Fouchier *et al.*, 2003). Além disso, através de microscopia electrónica e do método de *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR), averiguou-se que as características do vírus mantiveram-se as mesmas do vírus inoculado, após o seu reisolamento em cultura pura (Fouchier *et al.*, 2003). Recorrendo à técnica de imunofluorescência indirecta, constatou-se que era efectivamente produzida uma resposta imunológica específica para o vírus (Fouchier *et al.*, 2003). Desta forma, verificou-se que o vírus obedecia aos postulados de Koch modificados por Rivers, na medida em que era detectado frequentemente nos indivíduos doentes e tinha a capacidade de induzir a doença em questão em indivíduos saudáveis; daí o coronavírus ter sido estabelecido como o agente etiológico da SARS (Fouchier *et al.*, 2003; Rivers, 1937). Com efeito, o vírus pertencente à família *Coronaviridae* associado à SARS, ficou conhecido como *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus* (SARS-CoV) (Li, 2005).

A sequência nucleotídica do SARS-CoV, diferia consideravelmente da sequência nucleotídica de todos os outros coronavírus conhecidos até então, pelo que se excluía as hipóteses de o novo coronavírus resultar da mutação ou recombinação de algum desses coronavírus (Holmes, 2003). Dessa forma, a teoria mais provável era a de que o SARS-CoV fosse inicialmente um coronavírus não-humano até então desconhecido, que cruzou a barreira entre as espécies e adquiriu assim a capacidade de infectar humanos (Holmes, 2003). Essa hipótese foi reforçada com o isolamento de um coronavírus, com sequências nucleotídicas muito semelhantes às do SARS-CoV humano, na civeta de palmeira asiática (Guan, 2003). Todavia, após a realização de estudos em que se inocularam SARS-CoV humanos em civetas, estas apresentaram sintomas como febre e letargia, o que colocava em causa a teoria de serem o hospedeiro natural dos vírus semelhantes ao SARS-CoV, sendo mais provavelmente um hospedeiro intermediário (Wu *et al.*, 2005). O hospedeiro natural viria a ser identificado como sendo o morcego, animal que é infectado frequentemente por diversos vírus sem apresentar sintomas, no qual se detectaram *SARS-like Coronavirus* (SL-CoVs) (Li, 2005). O isolamento de um SL-CoV das amostras fecais de um morcego, que utiliza a Enzima Conversora da Angiotensina-2 (ECA-2) como receptor para a invasão celular, ou seja, o mesmo receptor utilizado pelo SARS-CoV, não só fortaleceu a teoria de o morcego ser o reservatório natural, como ainda levantou a hipótese de nem mesmo serem necessários hospedeiros intermediários para a infecção de seres humanos (Ge *et al.*, 2013).

Até 2003, os coronavírus humanos estavam associados somente a infecções respiratórias leves, de natureza auto-limitada, porém esse paradigma foi significativamente alterado com a epidemia provocada pelo SARS-CoV (Rabaan *et al.*, 2020).

A cadeia de transmissão do SARS-CoV foi interrompida através de medidas que promoviam o distanciamento físico da população, como o isolamento profilático dos indivíduos infectados, bem como daqueles que estiveram em contacto com estes, o que impediu que a infecção se alastrasse (Rabaan *et al.*, 2020).

Em 2012, ocorreu um novo surto por coronavírus no Médio Oriente (Arábia Saudita) (Rabaan *et al.*, 2020). O agente etiológico foi o sexto coronavírus identificado em humanos (Rabaan *et al.*, 2020), tendo sido denominado temporariamente de *Human Coronavirus-Erasmus Medical Center* (HCoV-EMC), até receber a designação definitiva de *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus* (MERS-CoV) por parte do CSG (de Groot *et al.*, 2013). O espectro clínico da infecção por MERS-CoV é muito amplo, podendo variar de infecção assintomática a letal, sendo que os quadros clínicos mais graves estão geralmente associados a pacientes de idade mais avançada, imunodeprimidos ou que apresentem patologias crónicas (Chafekar & Fielding, 2018). Apesar de os conhecimentos adquiridos até à data e de estudos de sequenciamento genético de coronavírus detectados no morcego, apontarem este animal como sendo o provável hospedeiro natural do MERS-CoV, a disseminação da infecção na espécie humana levava a crer que existia um hospedeiro intermediário (de Groot *et al.*, 2013). Através do isolamento e sequenciamento de MERS-CoVs de um paciente infectado e de um dos quatro dromedários infectados, dos quais o paciente era o proprietário, verificou-se que as sequências genómicas dos vírus de ambos eram idênticas (Azhar *et al.*, 2014). A pesquisa de anticorpos específicos para o MERS-CoV realizada por recurso à técnica de imunofluorescência, permitiu observar que enquanto que todos os quatro dromedários infectados apresentavam um elevado nível de anticorpos específicos para o MERS-CoV tanto na primeira amostra de soro, como na segunda colhida duas semanas mais tarde, no paciente só se detectaram os anticorpos na segunda colheita, ou seja, os dromedários apresentaram uma resposta imune para o coronavírus primeiro do que o seu dono, pelo que provavelmente tinham sido infectados antes deste (Azhar *et al.*, 2014). Os resultados desse estudo indicam assim, que os dromedários tenham sido os responsáveis pela transmissão do MERS-CoV para os humanos e não o contrário (Azhar *et al.*, 2014). A eliminação do vírus do organismo dos dromedários, após o período de infecção aguda, reforçou a hipótese de os dromedários poderem exercer o papel de hospedeiro intermediário, mas não o de hospedeiro natural (Azhar *et al.*, 2014).

Como se observa na tabela 1, algumas das manifestações clínicas mais comuns da doença provocada pela infecção por SARS-CoV, são similares às da COVID-19, existindo menos semelhanças com os sintomas provocados pela infecção por MERS-CoV (Rabaan *et al.*, 2020). Contudo, verifica-se também nessa tabela que o SARS-CoV-2 é consideravelmente mais infeccioso que o SARS-CoV ou o MERS-CoV, apesar de apresentarem formas semelhantes de transmissão (Rabaan *et al.*, 2020).

A actual pandemia por SARS-CoV-2, em conjunto com os dois outros surtos por coronavírus que ocorreram neste século, alertam para a capacidade que estes vírus têm de mutar ou recombinarem-se, de modo a adquirirem a capacidade de atravessar a barreira entre as espécies, tornando-se patogénicos para o ser humano, o que leva desta forma, à necessidade da aquisição de conhecimentos sobre este grupo de vírus, que promovam o desenvolvimento de vacinas e tratamentos eficazes, que permitam o controlo de eventuais surtos futuros (Rabaan *et al.*, 2020).

ii Taxonomia e Caracterização do SARS-CoV-2

A estirpe SARS-CoV-2 pertence ao domínio *Riboviria*, à ordem *Nidovirales*, à subordem *Cornidovirineae*, à família *Coronaviridae*, à subfamília *Orthocoronavirinae*, ao género *Betacoronavirus*, ao subgénero *Sarbecovirus* e à espécie *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus* (Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2020). É uma das sete estirpes de coronavírus conhecidas com capacidade de infectar humanos, ou seja, é um *human coronavirus* (HCoV) e pertence ao mesmo subgénero que os outros dois coronavírus responsáveis por desencadear surtos epidémicos em humanos no passado (SARS-CoV e MERS-CoV), sendo da mesma espécie que o SARS-CoV (Chaudhry & Bamola, 2020).

Estudos de homologia demonstraram que o SARS-CoV-2 tinha uma similaridade de 96 % com a estirpe RaTG13, um SL-CoV isolado dos morcegos, no entanto, nenhum outro

Tabela 1: Epidemiologia e Apresentação Clínica do SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2. Adaptado de Rabaan *et al.* (2020).

| | Coronavírus | | |
|---|--|--|--|
| | SARS-CoV | MERS-CoV | SARS-CoV-2 |
| Epidemiologia | | | |
| Data de início do surto | Novembro de 2002 | Abril de 2012 | Dezembro de 2019 |
| Localização do primeiro caso conhecido de infecção | Guangdong, China | Arábia Saudita | Wuhan, China |
| Número de casos confirmados | 8096 | 2574 (até 31 de Maio de 2021) * | 189331356 (até 16 de Julho de 2021) ** |
| Tempo desde o início do surto até 1000 casos de infecção detectados | 130 dias | 903 dias | 48 dias |
| Período de incubação | 2-7 dias | 5-6 dias | 4-14 dias |
| Formas de transmissão do vírus | Contacto com animais infectados ou sua ingestão; de pessoa para pessoa | Contacto com animais infectados ou sua ingestão; de pessoa para pessoa | Contacto com animais infectados ou sua ingestão; de pessoa para pessoa |
| Apresentação Clínica | | | |
| Rácio Homem:Mulher | 1:1,25 | 2,03:1 | 1,39:1 |
| Febre | 99-100 % | 77 ± 6 % | 88,7 % |
| Astenia | 31,2 % | | 29,4 % |
| Tosse não produtiva | 25-75 % | 80 ± 5 % | 67,7 % |
| Mialgia | 49,3-60,9 % | ND | 14,8 % |
| Dispneia | 40-42 % | ND | 45,6 % |
| Expectoração | ND | ND | 13,3 % |
| Dor de garganta | 12,5 % | 39 ± 11 % | 13,9 % |
| Diarreia | 20-25 % | 10-20 % | 6,1 % |
| Náuseas e/ou vômitos | 19,4-19,6 % | ND | 5,0 % |
| Tonturas | 4,2-42,8 % | ND | 3,7 % |
| Cefaleias | 35,4-55,8 % | ND | 8,0 % |

* Dados obtidos de World Health Organization (2021a).

** Dados obtidos de Johns Hopkins University of Medicine (2021).

ND: Valores não disponíveis na literatura.

coronavírus isolado dos morcegos apresentou homologia superior a 80 % (Wang *et al.*, 2020a). Apesar de os morcegos serem o presumível hospedeiro natural, a transmissão do vírus para os humanos seria um evento raro sem a existência de hospedeiros intermediários (Xiao *et al.*, 2020). Assim, em outras análises homológicas, verificou-se que o SARS-CoV-2 apresenta uma similaridade de 99 % com uma estirpe isolada de pangolins (Wang *et al.*, 2020a) e que pode ter sido originado por fenómenos de recombinação genética entre o *Pangolin-CoV-like virus* e o *Bat-CoV-RaTG13-like virus*, o que aponta o pangolim como provável hospedeiro intermediário (Xiao *et al.*, 2020).

O SARS-CoV-2, tal como todos os outros coronavírus, é um vírus RNA de cadeia simples positiva (+ssRNA virus) (V'kovski *et al.*, 2020). Este vírus apresenta uma morfologia semelhante à dos demais coronavírus, isto é, uma morfologia esférica, no entanto, uma vez que se tratam de vírus com envelope, apresentam algum pleomorfismo devido às projeções deste (Weiss & Navas-Martin, 2005). Os coronavírus são os vírus com o genoma RNA mais extenso de entre os que foram descobertos até aos dias de hoje (Schoeman & Fielding, 2019), sendo que, no caso do SARS-CoV-2, este é de aproximadamente 30000 nt (Firth, 2020). Na extremidade 5', cerca de dois terços do seu genoma contém duas *open reading frames* (ORFs); a ORF1a e a ORF1b que codificam as poliproteínas pp1a e pp1ab (Firth, 2020). A clivagem dessas poliproteínas gera 16 proteínas não estruturais (nsps) (Finkel *et al.*, 2020), que são fundamentais para o processo de replicação viral (Firth, 2020). Na extremidade 3', o outro terço do genoma contém várias ORFs responsáveis por codificar as proteínas estruturais e acessórias (Firth, 2020). As proteínas estruturais do SARS-CoV-2 são a proteína de superfície *spike* (S), a proteína do envelope (E), a proteína da membrana (M) e a proteína da nucleocápside (N), que são codificadas pelas ORFs S, E, M e N, respectivamente (Figura 2) (Firth, 2020). Assim, um virião de coronavírus consiste num envelope lipoproteico (que tem na sua constituição as proteínas M, S e E), a envolver uma nucleocápside (formada pelo RNA e proteína N) (Narayanan *et al.*, 2000). A glicoproteína M é a proteína estrutural que se encontra em maior quan-

tidade no envelope viral (Schoeman & Fielding, 2019) e é considerada, como sendo a mais importante para a montagem viral, ainda que para que esse processo ocorra, seja necessário que esta interaja com as outras proteínas estruturais (Masters, 2006). Contudo, a interação entre a proteína M com a proteína E por si só, já permite a formação de *Virus-like particles* (VLPs) de superfície lisa (Mortola & Roy, 2004). A proteína *spike* é a segunda glicoproteína mais abundante no envelope dos coronavírus (Mortola & Roy, 2004) e a sua composição consiste em 3 segmentos: o ectodomínio, a região transmembrana e o domínio intracelular (Zehra *et al.*, 2020). Por sua vez, o ectodomínio divide-se em duas subunidades, sendo que a subunidade S1 tem a função de se ligar ao receptor da célula alvo, enquanto que a subunidade S2 tem a função de mediar a fusão entre a membrana viral e a membrana celular (Li, 2016). Deste modo, a proteína *spike* determina o tropismo que os coronavírus têm para com as células que infectam no hospedeiro (Li, 2016). A proteína E é a mais pequena das proteínas estruturais nos coronavírus, mas está envolvida nos processos de montagem e maturação dos viriões, formação do envelope viral, libertação das partículas virais e também em mecanismos de patogénese (Schoeman & Fielding, 2019). As interações da proteína M com as proteínas S e N, regulam o tamanho e a forma do virião (Neuman *et al.*, 2011), enquanto a ligação da proteína M à proteína N, estabiliza a nucleocápside e contribui para a conclusão do processo de montagem do virião (Schoeman & Fielding, 2019). A proteína N divide-se em três regiões altamente conservadas: um domínio de ligação ao RNA N-terminal, uma zona central rica em serina e arginina e um domínio de dimerização C-terminal (Kang *et al.*, 2020). A principal função da proteína N nos coronavírus é o empacotamento do genoma viral em capsídeos, como forma de garantir a sua protecção (McBride *et al.*, 2014). As proteínas acessórias dos coronavírus, apesar de serem aparentemente irrelevantes para o processo de replicação, são importantes nos mecanismos de patogénese, sendo assim factores de virulência, na medida em que permitem interferir com a resposta imune do hospedeiro (Snijder *et al.*, 2016).

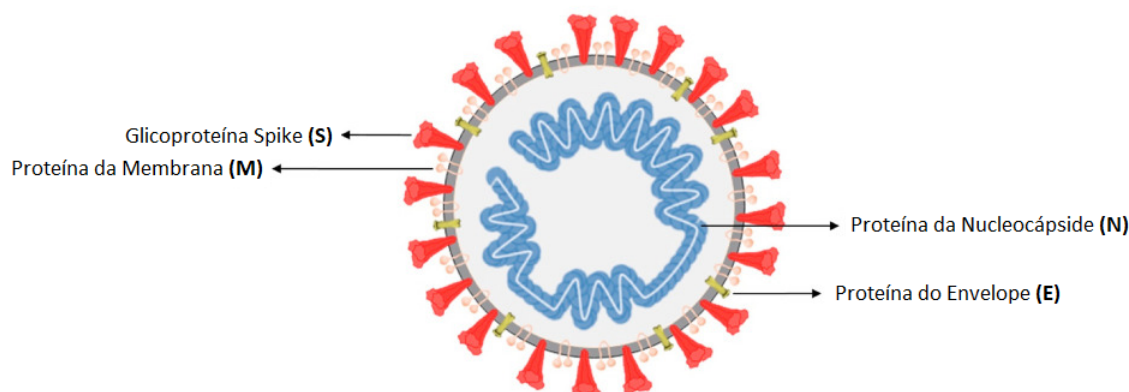


Figura 2: Representação Esquemática da Estrutura do SARS-CoV-2. Adaptado de Taleghani & Taghipour (2021)

iii Patogénese da Infecção por SARS-CoV-2

Estudos em que foram utilizadas células HeLa, indicaram que o SARS-CoV-2 poderia usar a ECA-2 como receptor, hipótese que foi reforçada devido à semelhança estrutural que se verificou entre os domínios de ligação ao receptor (RBDs) do SARS-CoV-2 e do SARS-CoV em estudos de modelagem molecular (Lu *et al.*, 2020), tendo-se vindo a comprovar que a afinidade do SARS-CoV-2 para a ECA-2, era consideravelmente superior à do SARS-CoV, o que pode contribuir para a sua maior infecciosidade (Wrapp *et al.*, 2020). A proteína *spike* do SARS-CoV-2, apresenta um local de clivagem polibásico S1/S2 que necessita de ser clivado pela enzima furina, para que de seguida a proteína S seja activada pela *transmembrane serine protease 2* (TMPRSS2) (Hoffmann *et al.*, 2020). Estudos de modelação por homologia e de bioinformática, indicaram que o local S1/S2 no qual actuava a furina, consistia em quatro aminoácidos redundantes Arginina-Arginina-Alanina-Arginina (RRAR) (Wu *et al.*, 2020). É uma diferença que se observa relativamente ao mecanismo de infecção pelo SARS-CoV, uma vez que este não apresenta o local de clivagem S1/S2, daí que a sua activação dependa apenas da TMPRSS2 (Hoffmann *et al.*, 2020). Num estudo em que foi efectuada a comparação dos níveis de expressão de ECA-2 em diferentes tecidos e órgãos, observou-se que os níveis

de expressão da enzima foram mais elevados nos rins, tecido adiposo, intestino delgado, testículos, coração e glândula tiróide, enquanto que nos pulmões, cólon, fígado, bexiga e glândula adrenal, foram observados níveis de expressão da enzima mais moderados (Li *et al.*, 2020b). Onde se verificaram os níveis mais reduzidos de expressão da enzima, foi no sangue, baço, medula óssea, vasos sanguíneos, cérebro e tecido muscular (Li *et al.*, 2020b). Em teoria, todos os tecidos com níveis de expressão altos ou moderados de ECA-2 são susceptíveis à infecção pelo SARS-CoV-2, algo para o qual, pode contribuir a distribuição ubiquitária da furina em muitos tecidos do organismo (Li *et al.*, 2020c). Não se verificaram diferenças significativas nos níveis de expressão de ECA-2 entre indivíduos de diferentes raças, sexos ou idades, pelo que o risco de infecção por SARS-CoV-2 em princípio é semelhante nesses casos, contudo a gravidade da infecção depende de outros factores, como por exemplo do estado imune (Li *et al.*, 2020b). Todavia, a gravidade da infecção não está tão relacionada com a carga viral como inicialmente seria expectável, conforme se averiguou em estudos nos quais se avaliou o desempenho de tratamentos com fármacos que inibem a replicação viral, como o remdesivir, a hidroxicloroquina e o lopinavir em doentes internados com COVID-19, não se tendo notado eficácia por parte destas terapêuticas anti-virais (World Health Organization, 2021b). Após a invasão das células permissivas, os mecanismos de replicação, transcrição, montagem e libertação do SARS-CoV-2 (Figura 3), assemelham-se aos do ciclo de vida do SARS-CoV (Li *et al.*, 2020c).

Uma hipótese explicativa para a indução de alguns sintomas semelhantes aos da SARS pelo SARS-CoV-2, que já havia sido associada no passado ao SARS-CoV, diz respeito à internalização dos receptores ECA-2 por endocitose, que ocorre durante a entrada dos coronavírus nas células permissivas (Duarte *et al.*, 2021; Kuba *et al.*, 2005). Segundo essa teoria, a diminuição da expressão de receptores ECA-2 nas membranas citoplasmáticas, resulta no aumento dos níveis de angiotensina-2, que consiste num mediador inflamatório que provoca a expressão de várias citocinas inflamatórias, situação essa que pode originar

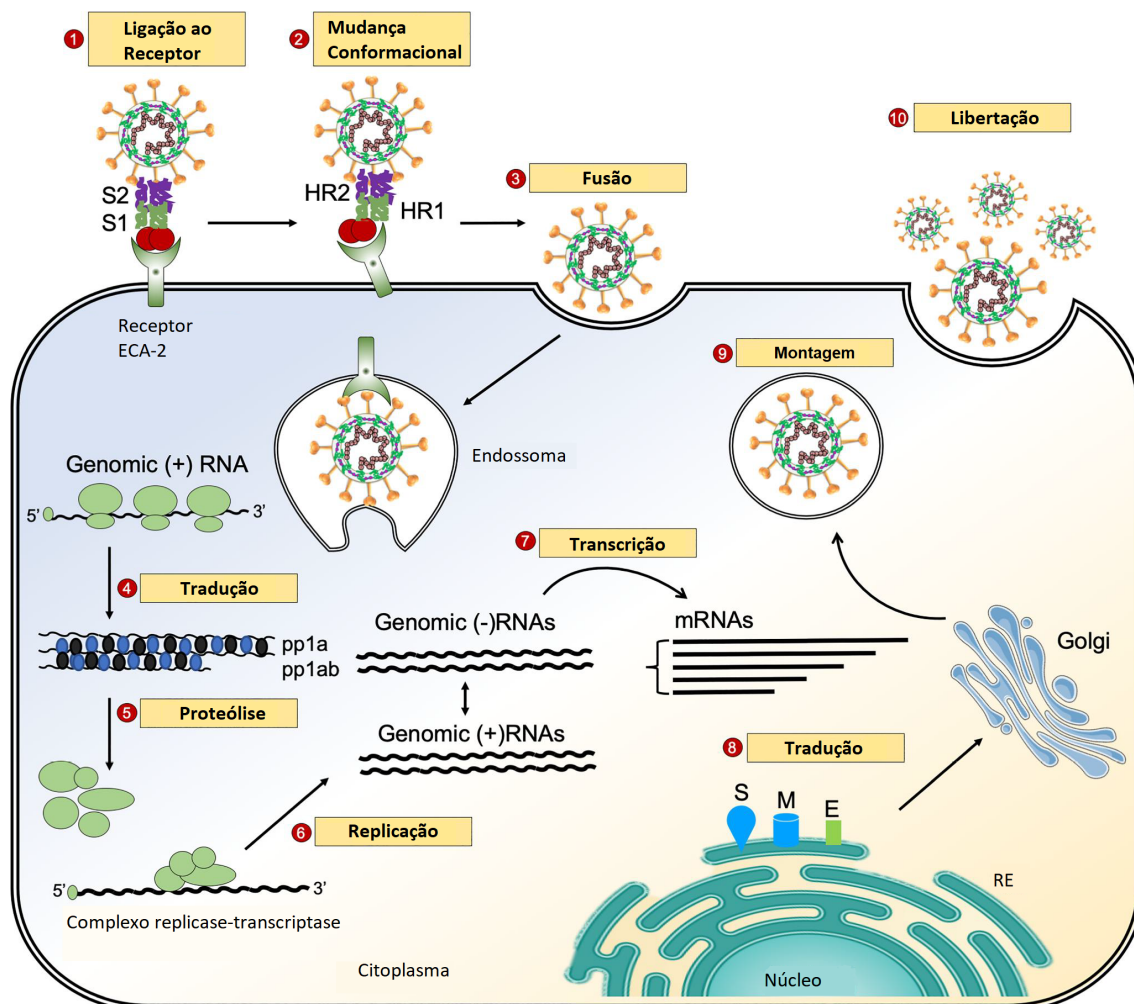


Figura 3: Representação Esquemática do Ciclo de Replicação do Sars-Cov-2. A subunidade S1 da proteína S, reconhece e liga-se ao receptor ECA-2 da membrana celular, enquanto que duas regiões *heptad* de repetição altamente conservadas da subunidade S2, medeiam a fusão entre o vírus e a membrana celular. O SARS-CoV-2 entra no interior da célula através de endocitose, levando à consequente internalização do receptor ECA-2. O RNA viral é libertado no citoplasma, as regiões que codificam as poliproteínas pp1a e pp1ab são traduzidas e de seguida as poliproteínas resultantes sofrem clivagem permitindo a formação de um complexo replicase-transcriptase, que conduz os processos de replicação e transcrição que originam (-)RNA, que por sua vez vai servir de molde para a formação de (+)RNA. Ocorre ainda a tradução das regiões do genoma viral responsáveis por codificar as proteínas estruturais, que permitem a montagem viral. As partículas virais são por fim libertadas da célula por exocitose. Adaptado de Li *et al.* (2020c).

um processo inflamatório nos órgãos mais susceptíveis à infecção pelo coronavírus e que poderia desta forma, explicar a inflamação e/ou fibrose pulmonar, que se pode manifestar num quadro clínico de SARS, assim como esclarecer muitos outros sintomas da COVID-19 (Duarte *et al.*, 2021; Kuba *et al.*, 2005).

O SARS-CoV-2 tem vindo a sofrer várias mutações que se traduzem em novas variantes, tendo sido algumas descritas como variantes preocupantes (VOCs), devido a apresentarem características que as tornavam potencialmente mais infecciosas e/ou mais virulentas, que podiam reduzir a eficácia da vacinação e/ou diminuir a eficiência dos testes de diagnóstico, sendo a variante B.1.1.7. um exemplo de VOC na qual se observou uma maior afinidade para com o receptor ECA-2, bem como uma maior transmissibilidade relativamente ao SARS-CoV-2 original (Davies *et al.*, 2021).

Num estudo efectuado por Lauer *et al.*, com o intuito de conhecer o período de incubação do SARS-CoV-2, ou seja, o tempo que decorria desde a exposição ao SARS-CoV-2 até ao início dos sintomas resultantes da infecção por este, determinou-se que o seu período médio de incubação é de 5,1 dias (Lauer *et al.*, 2020). Estimou-se também que na maioria dos infectados que venham a revelar-se como casos sintomáticos, as manifestações clínicas surgirão nos doze dias após a exposição ao vírus, justificando-se desta forma o período de catorze dias aconselhado pela agência americana Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), para o isolamento e monitorização nos casos em que existam suspeitas de exposição ao SARS-CoV-2 (Centers for Disease Control and Prevention, 2021a; Lauer *et al.*, 2020).

2 Diagnóstico da infecção por SARS-CoV-2 e Determinação do estado imune

i Colheita e Processamento de Amostras

Num estudo realizado por Pan *et al*, que visava comparar através da técnica de rRT-PCR, as cargas virais de amostras de exsudados nasofaríngeos, de expectoração, de fezes e de urina em pacientes infectados com SARS-CoV-2, observou-se que a carga viral era maior nas amostras de expectoração do que nas de exsudados nasofaríngeos (Pan *et al.*, 2020). Nas amostras de fezes não se conseguiu detectar RNA viral em todos os pacientes e naqueles cujas amostras fecais, foram positivas para a presença do vírus, a carga viral era inferior à das amostras nasofaríngeas (Pan *et al.*, 2020). Nas amostras de urina não se detectou a presença de RNA viral em nenhum dos pacientes (Pan *et al.*, 2020). Os resultados do estudo de Pan *et al* vão de encontro aos obtidos num estudo realizado por Wang *et al*, numa maior amostra populacional de pacientes infectados por SARS-CoV-2, visando a detecção do vírus pela técnica de rRT-PCR em diferentes amostras clínicas, tendo-se verificado que, a percentagem de detecção nas amostras de expectoração foi de 72 %, nos exsudados nasofaríngeos de 63 %, nas fezes de 29 % e na urina de 0 % (Wang *et al.*, 2020c). Wang *et al* analisaram ainda nesse estudo, a percentagem de detecção do vírus noutros tipos de amostras clínicas, como sangue, exsudados orofaríngeos, fluido obtido por lavagem broncoalveolar, amostras colhidas por broncoscopia com biópsia, sendo que as amostras nas quais se verificaram maiores percentagens de detecção do SARS-CoV-2, foram nas de fluido obtido através de lavagem broncoalveolar (93 %), seguidas pelas de expectoração (Wang *et al.*, 2020c). Todavia, a recolha de amostras por lavagem broncoalveolar e de expectoração, envolvem um maior risco para a segurança dos profissionais de saúde, uma vez que levam à formação de gotículas e aerossóis, que podem disseminar a infecção (Loeffelholz & Tang, 2020). Paralelamente, nas amostras reco-

lhidas por broncoscopia, a percentagem de detecção do SARS-CoV-2 observada foi de 46 %, isto é, inferior à observada nas amostras recolhidas pela técnica de zaragatoa nasofaríngea (Wang *et al.*, 2020c). Além disso, a broncoscopia consiste num procedimento complexo e demorado que exige equipamento de elevado custo, assim como pessoal especializado, o que leva a que a sua utilização em larga escala seja pouco viável (Loeffelholz & Tang, 2020). Verificou-se também, que apesar de após o surto de SARS-CoV-2 na China, o método mais utilizado inicialmente ter sido a colheita de exsudado orofaríngeo, a percentagem de detecção do vírus nestas amostras (32 %), foi consideravelmente inferior à observada nos exsudados nasofaríngeos (Wang *et al.*, 2020c). Assim, a colheita por zaragatoa nasofaríngea viria a tornar-se o método de colheita de amostras clínicas mais frequentemente utilizado para a realização de testes de diagnóstico da infecção por SARS-CoV-2 (Loeffelholz & Tang, 2020). É de salientar, que no estudo de Pan *et al* detectou-se o vírus nas amostras de expectoração e nasofaríngeas de dois indivíduos que participaram nesse estudo, apenas pelo seu histórico de exposição a casos positivos para a infecção, um dia antes de apresentarem qualquer sintoma, o que alerta para a hipótese de indivíduos pré-sintomáticos, poderem transmitir a infecção (Pan *et al.*, 2020).

Para proceder à colheita do exsudado nasofaríngeo (Figura 4), o profissional de saúde deve inclinar a cabeça do paciente 70 graus para trás e de seguida, introduzir uma zaragatoa estéril numa das suas fossas nasais, paralelamente ao palato, até sentir uma leve resistência exercida pela parede posterior da nasofaringe (Centers for Disease Control and Prevention, 2021b; Direção-Geral da Saúde, 2020b; Pondaven-Letourmy *et al.*, 2020). Após surgir essa resistência, a zaragatoa deve permanecer no local durante cerca de dez segundos, enquanto é rodada pelo menos três vezes, por forma a permitir que esta, absorva as secreções (Centers for Disease Control and Prevention, 2021b; Direção-Geral da Saúde, 2020b; Tang *et al.*, 2020) e de seguida, deve ser retirada lentamente com movimentos suaves de rotação (Centers for Disease Control and Prevention, 2021b; Direção-Geral da Saúde, 2020b; Pondaven-Letourmy *et al.*, 2020). Pode-se repetir o procedimento de

colheita na outra narina, contudo será desnecessário se a ponta da zaragatoa já se encontrar saturada de fluido amostral da primeira colheita (Centers for Disease Control and Prevention, 2021b; Direção-Geral da Saúde, 2020b; Pondaven-Letourmy *et al.*, 2020). Idealmente, devem ser utilizadas zaragatoas com ponta de fibras sintéticas não tóxicas (Centers for Disease Control and Prevention, 2021b; Priyadarshi *et al.*, 2020; Tang *et al.*, 2020) e haste de plástico ou alumínio, enquanto que as zaragatoas que contenham na sua composição madeira, alginato de cálcio ou algodão, devem ser evitadas, uma vez que podem conter substâncias que interferem com a técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Centers for Disease Control and Prevention, 2021b; Cheng *et al.*, 2020).

A colheita do exsudado orofaríngeo surge como uma alternativa, no caso de existir algum impedimento da obtenção de amostras da região nasofaríngea, como por exemplo em pacientes com predisposição para epistaxis, tais como, aqueles que apresentam a síndrome de Rendu-Osler-Weber (Pagella *et al.*, 2020). No entanto, uma vez que se trata de um método menos sensível, deve ser realizada uma segunda colheita, sobretudo nos indivíduos que apresentarem manifestações clínicas características de COVID-19 (Pagella *et al.*, 2020).

Outra alternativa, menos invasiva que a colheita nasofaríngea, ainda que também menos sensível, é a colheita nasal (Péré *et al.*, 2020). As técnicas de colheita por zaragatoa nasal podem-se dividir em zaragatoa das narinas anteriores ou zaragatoa do corneto nasal médio, distinguindo-se estas, pela profundidade a que a zaragatoa é introduzida nas fossas nasais, no entanto, não foram verificadas diferenças significativas em termos de sensibilidade e especificidade, entre ambas as técnicas (Lee *et al.*, 2021). As técnicas de colheita de amostras por zaragatoa nasal ou zaragatoa orofaríngea, além de serem mais confortáveis, quando comparadas com a técnica de zaragatoa nasofaríngea, apresentam ainda potencial para auto-colheita e conseqüente auto-testagem, por testes de diagnóstico *Point-Of-Care* (POC) rápidos, pelo que são vantajosas no contexto de testagem em massa, uma vez que, a técnica de zaragatoa nasofaríngea apesar de mais sensível, requer

um profissional de saúde para a sua execução, o que gera um risco de contaminação até mesmo para o próprio profissional de saúde (Lee *et al.*, 2021). Num estudo comparativo efectuado por Desmet *et al.*, verificou-se que a análise por teste molecular de uma amostra colhida pela combinação das técnicas de zaragatoa nasal e zaragatoa orofaríngea, apresentava resultados similares aos das amostras obtidas pela técnica de colheita padrão (zaragatoa nasofaríngea), pelo que o exsudado combinado, é uma alternativa com potencial para contornar as limitações de sensibilidade das técnicas de recolha separadas (Desmet *et al.*, 2021). A obtenção do exsudado combinado, é conseguida através da passagem da zaragatoa em ambos os lados da úvula no espaço orofaríngeo e de seguida introduzir a mesma zaragatoa em ambas as fossas nasais, até sentir a resistência do corneto médio, sendo este método combinado uma técnica com potencial para auto-colheita, contudo é mais desconfortável do que as técnicas de colheita separadas (Desmet *et al.*, 2021; Direção-Geral da Saúde, 2020b).

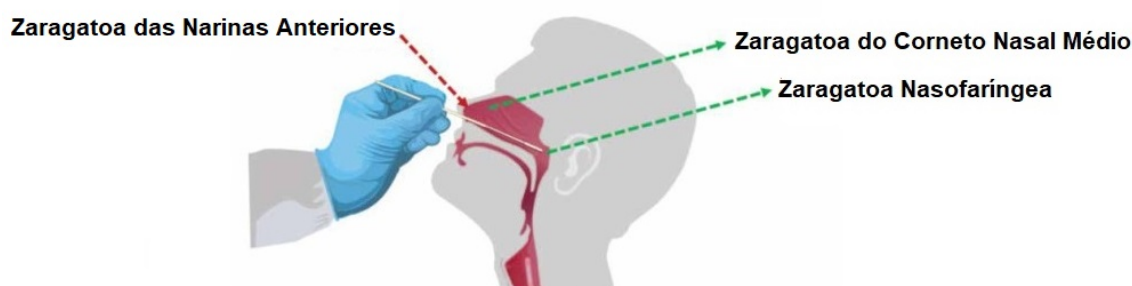


Figura 4: Representação Esquemática da Colheita por Zaragatoa Nasofaríngea. Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (2021b)

A saliva foi um tipo de amostra bastante estudado, devido ao seu procedimento de recolha ser bastante simples, rápido e não invasivo, podendo ser obtida pelo esputo de um paciente num frasco estéril de recolha, permitindo a auto-colheita de forma pouco desconfortável (Santosh *et al.*, 2020). Foram realizados vários estudos para avaliar a sensibilidade e especificidade das amostras de saliva oral, quando analisadas pela técnica de rRT-PCR utilizando-se as amostras nasofaríngeas como padrão de referência, tendo-se observado que a especificidade era acima de 90 % na maior parte dos estudos, enquanto que os

resultados relativos à sensibilidade foram bastante variáveis, o que pode ter ocorrido como consequência da sensibilidade da técnica de recolha utilizada como referência ser apenas de aproximadamente 70 % (Azzi *et al.*, 2020). A saliva também pode ser utilizada nos testes serológicos, com a vantagem relativamente às outras amostras analisadas nesses testes como sangue total, soro e plasma, de dispensar a etapa de punção na sua recolha (Javaid *et al.*, 2016), distinguindo-se ainda dessas amostras pelos resultados obtidos, uma vez que as imunoglobulinas detectadas em maior concentração na saliva, são normalmente as IgA, enquanto que, nas outras amostras são comumente as IgM ou IgG (Azzi *et al.*, 2020).

Na realização do procedimento de recolha das amostras clínicas, os profissionais de saúde devem utilizar equipamento de proteção individual como máscaras *Filtering Facepiece Level 2* (FFP2), com capacidade para filtrar pelo menos 94 % das partículas suspensas no ar ou de nível superior de filtração, óculos ou viseira de protecção, luvas descartáveis, touca e uma bata comprida, impermeável e descartável (Direção-Geral da Saúde, 2020c). Estas técnicas de colheita são simples, seguras e de rápida execução, o que permite a sua realização em praticamente qualquer local (Pagella *et al.*, 2020).

O método mais comum de transporte das amostras biológicas é o transporte em tubos estanques que contêm meio de transporte viral (VTM), no entanto, existem meios alternativos de transporte, como o soro fisiológico ou o tampão fosfato salino (PBS), aos quais se pode recorrer em situações de escassez do VTM (Direção-Geral da Saúde, 2020b; Food and Drug Administration, 2020c; Rodino *et al.*, 2020). Todavia, o VTM é considerado o meio de eleição, devido ao facto de apresentar na sua composição, uma mistura de soluções tampão que preservam o vírus, com antibióticos e antifúngicos que evitam a contaminação das amostras, sendo compatível com os diferentes testes de diagnóstico laboratorial, possibilitando até mesmo a realização de diferentes testes na mesma amostra biológica (Ford *et al.*, 2020; World Health Organization, 2020b).

As amostras clínicas devem ser transportadas a uma temperatura que se encontre no intervalo entre os 2 °C e os 8 °C (Direção-Geral da Saúde, 2020b; López *et al.*, 2020; World Health Organization, 2020b) e armazenadas nesse mesmo intervalo de temperaturas, desde que o tempo de armazenamento não exceda os cinco dias no caso de se tratarem de amostras colhidas pelas técnicas de zaragatoa nasofaríngea ou orofaríngea, amostras de sangue, amostras de soro, amostras fecais e amostras de urina (Direção-Geral da Saúde, 2020b; Priyadarshi *et al.*, 2020; World Health Organization, 2020b). Contudo, caso se tratem de amostras recolhidas por lavagem broncoalveolar, amostras de expectoração ou amostras colhidas por aspiração endotraqueal ou nasofaríngea, o período de armazenamento não deve exceder os dois dias (Direção-Geral da Saúde, 2020b; Priyadarshi *et al.*, 2020; World Health Organization, 2020b). Na impossibilidade do cumprimento desses prazos de armazenamento, as amostras clínicas deverão ser conservadas a –70 °C (Direção-Geral da Saúde, 2020b; World Health Organization, 2020b). Na eventualidade de as amostras clínicas necessitarem de ser transportadas por uma curta distância, os tubos que contêm essas amostras, devem ser devidamente rotulados e selados num saco de risco biológico com zíper, ou num contentor criogénico à prova de água (Karthik *et al.*, 2020). Contudo, se for necessário um transporte de longa distância, deve ser utilizado o sistema de embalagem tripla (Figura 5), seguindo as especificações da instrução P650 para embalagem, segundo as quais os recipientes impermeáveis devidamente identificados que contêm as amostras, consistem nos contentores primários, que são transportados no interior de um contentor secundário impermeável, que contém material amortecedor e absorvente a separá-los, para evitar colisões entre estes (Direção-Geral da Saúde, 2020a; Hong *et al.*, 2020; Karthik *et al.*, 2020; World Health Organization, 2019). O contentor exterior apresenta um material de acolchoamento, que confere protecção às amostras biológicas e trata-se do mais resistente dos recipientes, que constituem o sistema de embalagem tripla (Direção-Geral da Saúde, 2020a; Karthik *et al.*, 2020). Este contentor deve apresentar na sua superfície externa, os dados relativos à empresa de transporte e ao receptor, bem como uma etiqueta UN 3373, que qualifica as amostras clínicas transportadas,

como substâncias biológicas infecciosas de categoria B (Direção-Geral da Saúde, 2020a; Hong *et al.*, 2020; World Health Organization, 2019). A superfície exterior do recipiente primário deve ser desinfectada com uma solução de hipoclorito de sódio a 5 % e de seguida, por etanol a 70 % (Direção-Geral da Saúde, 2020a). O contentor secundário deve ser fixado no contentor exterior de modo a evitar oscilações durante o transporte (Hong *et al.*, 2020). O transporte dos produtos biológicos deve ser realizado por uma empresa certificada e autorizada para esse fim, ou alternativamente por um transporte da própria unidade de saúde (Direção-Geral da Saúde, 2020a). Estes cuidados no transporte e conservação são ainda mais relevantes devido ao facto de o SARS-CoV-2 ser um vírus RNA, uma vez que este ácido nucleico é mais instável que o ácido desoxirribonucleico (DNA), e dado que as amostras clínicas, que se destinam a ser analisadas em testes moleculares, necessitam usualmente de ser processadas para que se extraia o seu ácido nucleico, o risco de se obterem falsos negativos será mais elevado (López *et al.*, 2020; Ravi *et al.*, 2020). Porém, estão a realizar-se estudos com a finalidade de se tentar evitar esta etapa de processamento, sem que ocorram perdas substanciais na sensibilidade e especificidade dos testes moleculares (Arumugam & Wong, 2020).

O procedimento de isolamento do RNA das amostras clínicas, nos testes moleculares de diagnóstico de SARS-CoV-2, pode ser realizado por diferentes métodos, dos quais são considerados os principais: o método das esferas magnéticas de purificação, o método de isolamento pela coluna giratória e o método de extracção orgânica com fenol ou clorofórmio, sendo este último tido como o método *gold standard* de extracção de RNA (Ravi *et al.*, 2020). Todos estes três métodos têm em comum as etapas de lise celular, desnaturação das ribonucleases e desnaturação proteica (Ravi *et al.*, 2020). No entanto, as amostras que se destinam a ser analisadas por testes serológicos, tais como o soro, plasma, ou sangue total, normalmente dispensam essa etapa de extracção do ácido nucleico e podem ser utilizadas directamente (Ravi *et al.*, 2020). A obtenção de plasma a partir de sangue total é conseguida a partir da adição de anticoagulantes, como a heparina ou o EDTA à

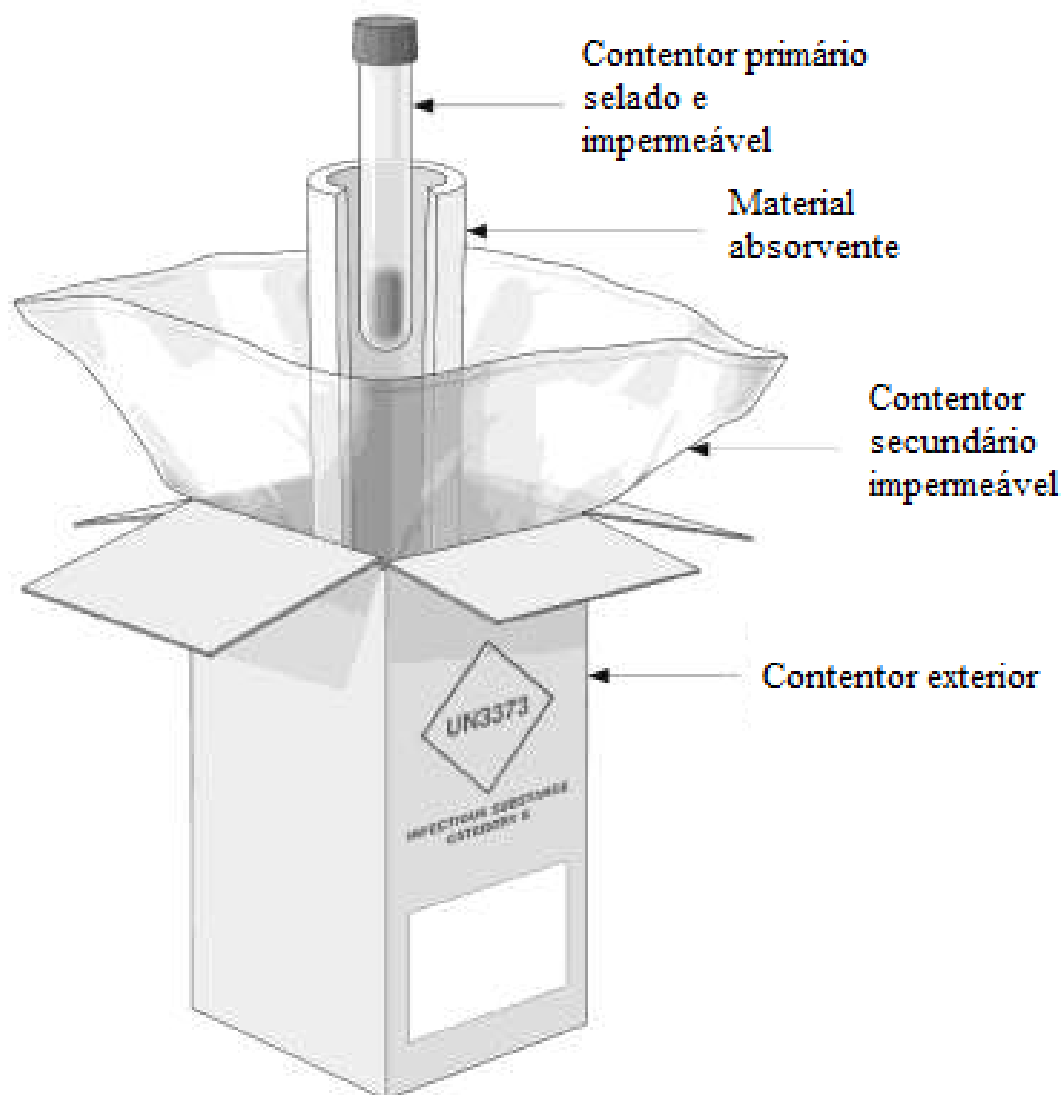


Figura 5: Representação Esquemática do Sistema de Embalagem Tripla. Adaptado de World Health Organization (2019)

amostra de sangue, seguida de uma etapa de centrifugação que permite a separação das células sanguíneas do plasma (Yu *et al.*, 2011). O procedimento de obtenção de soro é bastante similar, contudo é obtido a partir de sangue coagulado (dispensa assim o passo de adição de anticoagulantes à amostra sanguínea), pelo que a centrifugação separa as células sanguíneas e os factores de coagulação do soro (Yu *et al.*, 2011).

ii Introdução aos Testes de Diagnóstico

As infecções respiratórias, sejam de etiologia viral ou bacteriana, normalmente apresentam muitos sintomas em comum, o que gera dificuldades na identificação do agente etiológico de uma infecção respiratória, tendo por base somente a apresentação clínica, apesar de a clínica proporcionar um contributo significativo para a detecção da infecção em si, nos casos de infecção sintomática (Fox, 2007).

A técnica de isolamento viral em cultura celular apesar de ser a técnica *gold standard* para diagnóstico virológico (Li *et al.*, 2020a), como consequência do reduzido crescimento dos coronavírus em cultura celular (Ieven & Goossens, 1997), da ausência de um efeito citopático característico destes (Vabret *et al.*, 2001) e de se tratar de uma técnica complexa com baixa especificidade e sensibilidade, é inadequada para o diagnóstico da infecção por coronavírus (Vijgen *et al.*, 2005).

A microscopia electrónica é outra técnica que apresenta reduzida sensibilidade, devido às dificuldades na distinção entre os coronavírus e outras estruturas que podem estar presentes nas células, pelo que requer observadores treinados para a sua execução (Vabret *et al.*, 2001). Assim, é igualmente pouco aconselhável o recurso a esta técnica, para o diagnóstico de infecção por coronavírus (Vabret *et al.*, 2001).

Deste modo, as limitações inerentes aos métodos clássicos, no que respeita ao diagnóstico de infecções respiratórias por coronavírus, levou a que estes fossem preteridos, em prol dos testes moleculares, que demonstraram uma sensibilidade bastante superior (Ieven &

Goossens, 1997), tendo sido efectuado o primeiro diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2, a partir de técnicas de NGS (Tang *et al.*, 2020). Contudo, uma vez que os surtos por SARS-CoV-2 são imprevisíveis e estas técnicas exigem muitos recursos, não são as mais adequadas para a testagem em massa (Pillay *et al.*, 2020). No entanto, os dados obtidos pelo sequenciamento completo do genoma viral através das técnicas de NGS, permitiram o desenvolvimento das técnicas de RT-PCR, que funcionaram como o padrão de referência dos testes de diagnóstico utilizados para o controle da pandemia por SARS-CoV-2 (Bull *et al.*, 2020; Charre *et al.*, 2020), além de terem contribuído para a elaboração de novas terapêuticas anti-virais e vacinas preventivas (Charre *et al.*, 2020).

A detecção de sequências virais específicas por NAATs tornou-se o método de rotina para a confirmação do diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 (Tang *et al.*, 2020; World Health Organization, 2020b), tratando-se o rRT-PCR, considerado o actual teste *gold standard* de diagnóstico da infecção por SARS-CoV-2 (Direção-Geral da Saúde, 2020b; Li *et al.*, 2020d; Rahbari *et al.*, 2021; World Health Organization, 2020b), do NAAT mais utilizado, seguido pelas técnicas de amplificação isotérmica, das quais a Amplificação Isotérmica Mediada por *Loop* com Transcrição Reversa (RT-Lamp), é a mais frequentemente aplicada (Tang *et al.*, 2020). Os testes moleculares devem ser realizados em laboratórios com biossegurança no mínimo de nível 2, que apresentem câmaras de fluxo laminar classe II (Direção-Geral da Saúde, 2020b; Priyadarshi *et al.*, 2020; World Health Organization, 2020b).

iii Diagnóstico Molecular

1 NGS

As técnicas de NGS, também conhecidas como técnicas de sequenciamento de elevado rendimento, têm a capacidade de sequenciar centenas de milhões de moléculas de DNA em simultâneo (Behjati & Tarpey, 2013; Churko *et al.*, 2013). Deste modo, tornam pos-

sível o sequenciamento completo de um genoma humano, no espaço de apenas um dia, inclusive do seu exoma (todas as sequências codificantes), bem como, de apenas alguns genes em específico (Behjati & Tarpey, 2013; Churko *et al.*, 2013). Assim, permitem obter imensos dados sobre determinadas doenças e identificar os seus agentes etiológicos (Behjati & Tarpey, 2013; Churko *et al.*, 2013). Estas técnicas permitiram ainda, que se começasse a caracterizar os patógenos pelas suas sequências genéticas, em vez da caracterização tradicional baseada na sua morfologia, metabolismo e propriedades de coloração (Behjati & Tarpey, 2013).

As técnicas de NGS, mais concretamente as técnicas de sequenciação por Illumina e nanopore, foram essenciais na identificação do SARS-CoV-2, como o agente responsável pela doença COVID-19 (Zhu *et al.*, 2020b).

Na medida em que o SARS-CoV-2 consiste num vírus RNA, é necessária a transcrição reversa do seu genoma, para que seja possível o seu subsequente sequenciamento pelas técnicas de NGS (Bull *et al.*, 2020).

A sequenciação por Illumina tem como base uma técnica de "amplificação em ponte", na qual sequências de DNA ligadas a adaptadores específicos, são utilizadas como substrato para reacções repetitivas de amplificação de DNA previamente fragmentado, num suporte sólido que contém sequências complementares aos adaptadores (Slatko *et al.*, 2018). Um único suporte sólido tem a capacidade de suportar milhões de reacções paralelas, nas quais são geradas múltiplas cópias de cada fragmento de DNA (Slatko *et al.*, 2018). Durante as reacções de síntese de DNA, ocorre a incorporação de nucleótidos modificados e marcados por fluorescência, que actuam como terminadores de síntese para cada reacção (Slatko *et al.*, 2018). Deste modo, é possível a detecção de sinais que permitem a sequenciação das cadeias curtas de DNA (Slatko *et al.*, 2018).

Paralelamente, a sequenciação por nanopore baseia-se na condução de cadeias completas de DNA através de nanoporos, aos quais foi aplicada uma corrente eléctrica (Slatko

et al., 2018). Essa corrente eléctrica sofre uma interrupção por cada nucleótido que atravessa o nanoporo, o que resulta num sinal eléctrico, que quando captado pelos detectores apropriados, permite discriminar os diferentes nucleótidos (Slatko *et al.*, 2018). Assim, na medida em que é possível mover dezenas de milhares de nucleótidos a um ritmo constante por entre os nanoporos, esta técnica proporciona o sequenciamento de cadeias longas de DNA, através da análise das alterações na corrente eléctrica (Slatko *et al.*, 2018).

O sequenciamento de cadeias curtas por Illumina é actualmente a técnica "gold standard" para a maioria dos projectos de sequenciação clínica, ainda que apresente algumas fontes de erro, tais como, as dificuldades no alinhamento das cadeias curtas derivadas de sequências repetitivas de DNA (Roberts *et al.*, 2021). As técnicas de sequenciação de cadeias longas, como as desenvolvidas pela *Oxford Nanopore Technologies* (ONT), contribuíram para ultrapassar essas limitações e demonstraram ainda vantagens em termos de tempo, portabilidade e custo (Roberts *et al.*, 2021). Porém, as técnicas de sequenciamento de cadeias longas, também apresentam desvantagens, tratando-se de técnicas menos específicas e sensíveis do que as técnicas de sequenciamento de cadeias curtas (Roberts *et al.*, 2021).

O Illumina COVIDSeq Test foi o primeiro teste baseado em técnicas de NGS a receber a autorização da *Food and Drug Administration* (FDA) (concedida a 10 de Junho de 2020), para ser utilizado no diagnóstico da infecção por SARS-CoV-2, tendo como finalidade a obtenção de mais dados sobre o coronavírus e a detecção de novas mutações e variantes deste (Food and Drug Administration, 2020a).

No entanto, as técnicas de NGS apresentam algumas condicionantes, como a necessidade de uma grande capacidade de armazenamento de dados, serem bastante dispendiosas e exigirem profissionais experientes para a sua execução e interpretação, não sendo as mais práticas para a testagem em larga escala numa situação pandémica, daí a necessidade de outros testes mais simples e baratos (Behjati & Tarpey, 2013).

2 PCR

O rRT-PCR, também conhecido como *Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR), engloba várias etapas após a extracção e purificação do RNA das amostras biológicas, tais como, a transcrição reversa que permite converter o RNA extraído em DNA, e a *quantitative Polymerase Chain Reaction* (qPCR) em tempo real, ou seja, a amplificação do DNA resultante da etapa anterior e a sua quantificação em tempo real (Gurbuz, 2020), por oposição ao que ocorre no *Polymerase Chain Reaction* (PCR) convencional que consiste numa técnica somente qualitativa (STAGGE-MEIER *et al.*, 2015). Desta forma, o RNA do SARS-CoV-2 presente nas amostras clínicas é convertido em DNA complementar (cDNA), pela enzima transcriptase reversa (Afzal, 2020; Carter *et al.*, 2020), num processo normalmente realizado a uma temperatura de aproximadamente 60 °C, o que permite que se possa aplicar de seguida, qualquer uma das metodologias que têm por base a técnica de PCR (Zhu *et al.*, 2020a). Assim sendo, aplica-se uma temperatura superior a 90 °C, temperatura essa, que promove a desnaturação da enzima transcriptase reversa, do RNA, da molécula de DNA (ocorre a separação da cadeia dupla) e activa a DNA polimerase (Green & Sambrook, 2019; Zhu *et al.*, 2020a). Os *primers* (oligonucleótidos de cadeia curta de DNA, normalmente com comprimento entre os 20 e 25 nt, que se vão ligar a sequências específicas do cDNA alvo), são adicionados ao cDNA a uma temperatura normalmente situada entre os 55 °C e os 65 °C, num passo designado hibridação ou *annealing*, promovendo desta forma o início da replicação do DNA, ou seja, permitindo que a DNA polimerase continue a síntese de novo DNA, a partir da adição de nucleótidos livres ao cDNA por complementaridade, etapa esta, que se denomina de extensão ou polimerização e que ocorre, a uma temperatura de aproximadamente 72 °C (Green & Sambrook, 2019; Zhu *et al.*, 2020a). A actividade da DNA polimerase depende da concentração de MgCl₂, uma vez que o magnésio é um co-factor dessa enzima (Lorenz, 2012). Todavia, apesar de a actividade desta aumentar proporcionalmente à concentração desse sal bivalente, um excesso de magnésio pode estabilizar

a cadeia dupla de DNA e impedir que se consiga a sua desnaturação completa (Lorenz, 2012). Normalmente a amplificação do ácido nucleico é concluída após 35-45 ciclos (Zhu *et al.*, 2020a), nos quais se utilizam termocicladores que controlam a temperatura à qual ocorre cada etapa (Green & Sambrook, 2019). A quantificação do DNA em tempo real pode ser conseguida através de um corante fluorescente que se liga ao DNA, como por exemplo o SYBR *Green* (Marinowic *et al.*, 2021), ou recorrendo a sondas TaqMan, que consistem em oligonucleótidos de DNA de cadeia simples específicos para as sequências de interesse (Afzal, 2020). As sondas TaqMan encontram-se marcadas na extremidade 5', com um fluoróforo e, na extremidade 3', com um *quencher* que inibe o sinal do fluoróforo até que ocorra a clivagem da sonda pela enzima DNA polimerase, resultando na libertação do fluoróforo e consequente emissão de sinal de fluorescência (Figura 6) (Afzal, 2020). Apesar de a detecção baseada na coloração com SYBR *Green* ser a técnica mais utilizada nos NAATs, devido a apresentar vantagens em termos de simplicidade e custo, o teste TaqMan é mais sensível e específico, pelo que é considerado, como o método mais adequado para a detecção e quantificação de agentes patogénicos com baixo número de cópias, o que sucede nos vírus como o SARS-CoV-2 (Marinowic *et al.*, 2021). Uma corrida analítica típica, dura aproximadamente uma hora e meia (Bustin & Nolan, 2020), contudo, é possível aumentar consideravelmente a velocidade do teste, através de uma simples mudança de protocolo, sem compromisso da sua especificidade ou sensibilidade (Bustin, 2017). Os *primers* e sondas utilizados no teste, devem ser armazenados a uma temperatura de sensivelmente -20°C (Rahbari *et al.*, 2021). Os reagentes necessários para a extracção do RNA, bem como para a realização do rRT-PCR propriamente dito, existem em elevadas quantidades e apesar de muitos testes serem realizados num volume de reacção de 25 μL , a mesma precisão e sensibilidade podem ser conseguidas com um volume final de reacção de 5 μL , o que permite poupanças em termos de reagentes e materiais (Bustin & Nolan, 2020). Este é um teste de elevada especificidade e bastante sensível, pelo que não necessita de grandes quantidades de amostra, sendo capaz de detectar e amplificar uma única molécula (Palmer *et al.*, 2003; Ravi *et al.*, 2020). A maioria

dos equipamentos de rRT-PCR apresentam capacidade para analisar 96 amostras clínicas em simultâneo, todavia alguns instrumentos já conseguem analisar até 1536 amostras numa única corrida analítica (Bustin & Nolan, 2020).

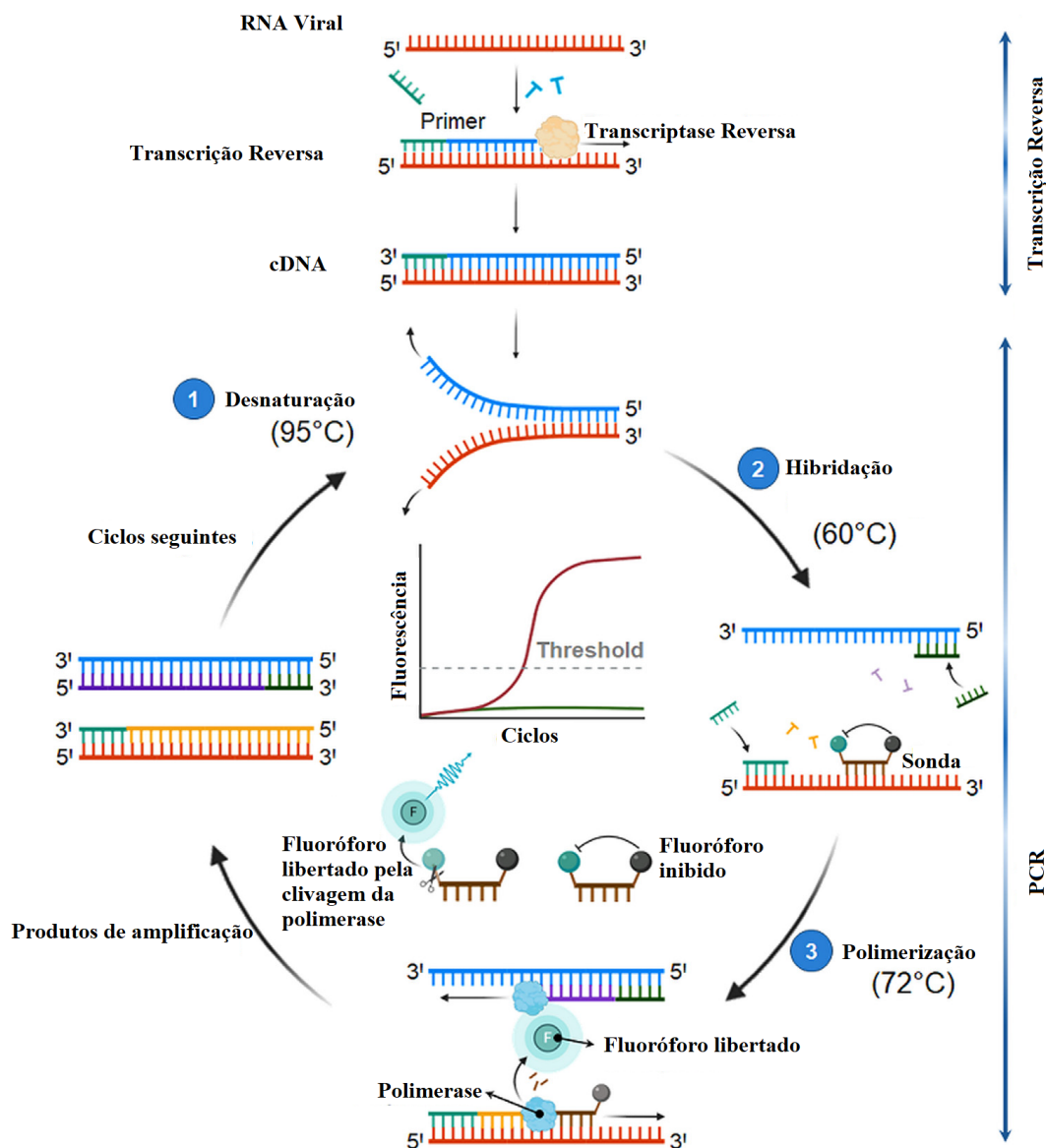


Figura 6: Representação Esquemática do Princípio da Técnica de rRT-PCR. Adaptado de Afzal (2020)

As técnicas de rRT-PCR podem-se dividir em técnicas *Two-Step*, nas quais o RNA é previamente convertido em DNA pela transcriptase reversa num tubo e subsequentemente é amplificado e quantificado noutro tubo, ou em técnicas *One-Step*, nas quais todos os

processos catalisados por enzimas, inerentes ao teste rRT-PCR, decorrem no mesmo tubo (Wong & Medrano, 2005). Apesar das técnicas *Two-Step* serem mais sensíveis e flexíveis (Wong & Medrano, 2005), as técnicas *One-Step* são as mais frequentemente utilizadas no diagnóstico da infecção pelo SARS-CoV-2, devido a apresentarem outras vantagens, nomeadamente, uma maior velocidade de execução, necessitarem de uma menor manipulação das amostras e diminuírem o risco de erros de pipetagem ou de contaminação cruzada entre as etapas de transcrição reversa e de PCR em tempo real (Carter *et al.*, 2020).

Desde o início da pandemia, foram lançados muitos kits que visam a detecção do SARS-CoV-2, tendo sido a ORF1a, a ORF1b, o gene que codifica a RNA polimerase dependente do RNA e os genes que codificam as proteínas estruturais S, E e N, os alvos moleculares mais utilizados nesses kits para o diagnóstico de infecção viral (van Kasteren *et al.*, 2020).

A OMS desenvolveu o primeiro protocolo para a detecção do SARS-CoV-2 através do rRT-PCR, cujos *primers* e respectivas sondas de detecção se destinam a pequenas regiões do gene viral que codifica a RNA polimerase dependente do RNA (RdRp) e do gene responsável por codificar a proteína E (Corman *et al.*, 2020; World Health Organization, 2020d). A agência CDC americana foi responsável pela elaboração do teste molecular mais utilizado actualmente no diagnóstico da infecção por SARS-CoV-2, que difere do anterior nos alvos dos *primers* e sondas, tratando-se neste caso, de pequenas sequências de duas regiões codificantes da proteína da nucleocápside viral presentes no gene N (regiões N1 e N2) e também de uma pequena porção do gene humano que codifica a RdRp, este último, para confirmar que o procedimento de extracção do RNA das amostras biológicas foi bem sucedido (Centers for Disease Control and Prevention, 2020; Cheng *et al.*, 2020).

Ainda que a maioria dos testes moleculares tenha como base a detecção de pelo menos duas sequências genéticas constantes do SARS-CoV-2, a detecção de apenas um alvo, pode ser considerado o bastante para diagnóstico de infecção numa região endémica (Gur-

buz, 2020). No entanto, uma vez que mutações nos alvos moleculares podem traduzir-se em falsos negativos, é aconselhável os testes de diagnóstico apresentarem várias regiões alvo para evitarem essa fonte de erro (Tahamtan & Ardebili, 2020).

Muitos dos testes rRT-PCR realizados com a finalidade de diagnóstico da infecção por SARS-Cov-2, partilham do critério de que um valor de *Cycle threshold* (Ct), também designado de *quantification Cycle* (Cq), quando inferior a 40, é indicativo da presença de SARS-CoV-2 na amostra biológica, enquanto que se for superior, classifica-se a amostra como sendo negativa para a detecção viral (Tom & Mina, 2020). O valor de Ct representa o número de ciclos de amplificação necessários, para que o sinal de fluorescência produzido, atinja um valor pré-determinado e uma vez que esse sinal é directamente proporcional à quantidade de material genético, significa que a sequência de interesse foi amplificada, até atingir o valor estabelecido como sendo significativo (Tom & Mina, 2020). Desta forma, entende-se que o valor de Ct seja inversamente proporcional à carga viral das amostras clínicas analisadas (Tom & Mina, 2020). O valor de Ct definido como 40, é um valor elevado, o que torna os testes muito sensíveis, contudo, essa elevada sensibilidade pode resultar em consequências como isolamentos prolongados, mesmo quando já não existe um risco real de transmissão da infecção por parte dos portadores (Tom & Mina, 2020). A agência CDC da China estipulou que um valor de Ct entre 37 e 40 é um resultado equívoco, pelo que se deve repetir o teste de diagnóstico, sendo a amostra considerada positiva para a infecção por SARS-CoV-2, caso na repetição se obtenha um pico bem definido e um valor de Ct inferior a 40 ou simplesmente um valor de Ct menor que 37 (Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2020; Hu *et al.*, 2021).

O Limite de Detecção (LoD), é uma medida de sensibilidade analítica que na maior parte dos testes moleculares para o SARS-CoV-2, foi definido como a concentração viral mínima para a qual o alvo molecular pode ser detectado com uma confiança de 95 % (Arnaut *et al.*, 2020; Centers for Disease Control and Prevention, 2020), sendo que por exemplo no teste disponibilizado pela agência CDC americana, o LoD é de aproximada-

mente dez cópias de RNA viral por microlitro de meio de transporte (Centers for Disease Control and Prevention, 2020; Ravi *et al.*, 2020).

O protocolo concebido pela agência CDC americana, apresenta três alvos moleculares distintos, o que significa que exige três reacções RT-PCR por amostra e conseqüentemente, um maior gasto de reagentes, uma maior demora na obtenção de resultados e um aumento do risco de erros durante o procedimento (Centers for Disease Control and Prevention, 2020; Kudo *et al.*, 2020). Um método de ultrapassar essas limitações seria a substituição do rRT-PCR singleplex pelo rRT-PCR multiplex que permite a amplificação/deteção de todos os alvos moleculares numa só reacção, tendo-se verificado que a sensibilidade e especificidade permaneciam similares às do ensaio singleplex (Kudo *et al.*, 2020). Contudo, as concentrações dos *primers* e sondas devem ser optimizadas de acordo com as condições específicas de cada laboratório em que se pretenda realizar o rRT-PCR multiplex (Kudo *et al.*, 2020).

Uma vez que a possibilidade de co-infecção entre o SARS-CoV-2 e outros agentes patogénicos não pode ser excluída, o SARS-CoV-2 foi acrescentado aos painéis multiplex síndromicos já existentes para o diagnóstico de infecções respiratórias, como por exemplo ao painel QIASTAT-DX da empresa Qiagen, que permite efectuar testes moleculares inteiramente automatizados e assim, obter o diagnóstico de várias infecções respiratórias em simultâneo (Lai *et al.*, 2020). Além disso, os testes automatizados acarretam vantagens como diminuir o erro humano, aumentar a velocidade e reprodutibilidade dos testes e promovem poupanças ao nível de reagentes, amostras, bem como no número de profissionais de saúde necessários à sua execução (Ravi *et al.*, 2020).

O ensaio de controlo de qualidade para o rRT-PCR, deve incluir *Negative Template Controls* (NTCs) e *Positive Template Controls* (PTCs), para as etapas de extracção e corrida analítica, e um controlo de extracção interno (como por exemplo o gene humano que codifica a enzima RNase P) (Priyadarshi *et al.*, 2020). Os NTCs nunca devem apresen-

tar níveis de fluorescência que ultrapassem o Ct padronizado como positivo, pois pode ser indicativo de contaminação (Priyadarshi *et al.*, 2020). No que respeita aos PTCs, espera-se que estes apresentem resultado positivo entre os 20 e 35 ciclos de amplificação (Priyadarshi *et al.*, 2020). Já no que concerne ao controlo de extracção interno, este deve apresentar um resultado positivo em cerca de 35 ciclos, o que será um sinal de que a amostra clínica tem qualidade aceitável para a realização do teste, uma vez que apresenta a quantidade de RNA humano necessária (Priyadarshi *et al.*, 2020). Caso tal não ocorra, deve-se investigar a origem da anomalia, que pode ser devido à má qualidade da amostra biológica, à má qualidade dos reagentes, a uma falha na etapa de processamento das amostras, danos no equipamento, erros na execução da técnica, instrumentos não calibrados, a presença de inibidores de RT-PCR, entre outras causas possíveis (Priyadarshi *et al.*, 2020; World Health Organization, 2020b).

A etapa de isolamento do RNA, pode contribuir para que o teste de rRT-PCR seja mais moroso do que o pretendido, levando que a duração do teste seja normalmente entre 4 a 6 horas (Sheridan, 2020), daí que Arumugam e Wong tenham realizado um estudo no qual se usaram amostras clínicas contendo o vírus SARS-CoV-2, o vírus influenza e o vírus sincicial respiratório, com o objectivo de avaliar a sensibilidade do rRT-PCR quando realizado directamente nas amostras não processadas (Arumugam & Wong, 2020). Os resultados do estudo foram sugestivos de que, mesmo não se efectuando o processamento prévio das amostras biológicas, a sensibilidade do teste molecular não seria significativamente alterada, o que permitiria poupar tempo na sua execução (Arumugam & Wong, 2020). Todavia, é de salientar, que o estudo de Arumugam e Wong ainda não foi certificado por revisão por pares.

O teste SalivaDirect desenvolvido por Vogels *et al.*, que recebeu a autorização de uso de emergência por parte da FDA em 15 de Agosto de 2020 (Food and Drug Administration, 2020b; Vogels *et al.*, 2021), procura contornar algumas das limitações do rRT-PCR, inclusive a da duração da etapa de isolamento do ácido nucleico (Food and Drug Admi-

nistration, 2020b; Vogels *et al.*, 2021). Este teste molecular utiliza a saliva como amostra clínica, pelo que dispensa as amostras recolhidas de forma mais invasiva por zaragatoa nasal (Food and Drug Administration, 2020b; Vogels *et al.*, 2021). Durante o desenvolvimento desse teste, avaliou-se a estabilidade do SARS-CoV-2 nas amostras de saliva, a diferentes temperaturas e sem adição de soluções conservantes, tendo-se verificado que o RNA alvo (RNA de uma região responsável pela codificação da nucleocápside viral), se encontrava estável às temperaturas de 4 °C, temperatura ambiente e 30 °C durante pelo menos sete dias (Vogels *et al.*, 2021). Neste método, também foram substituídos os métodos tradicionais de extracção de ácidos nucleicos, por um método alternativo, no qual se utiliza a proteínase k e a inactivação por calor (Vogels *et al.*, 2021). O método alternativo de extracção do ácido nucleico, resultou numa ligeira diminuição de sensibilidade, mas tem a vantagem de ser um método mais rápido e barato do que as técnicas tradicionais (Vogels *et al.*, 2021). De seguida, a amostra pode ser analisada por rRT-PCR ou por outros testes moleculares, como os testes de amplificação isotérmica (Vogels *et al.*, 2021).

Numa análise estatística realizada por Kucirka *et al.*, com o objectivo de averiguar a variação do valor preditivo do RT-PCR ao longo do tempo, observou-se que a taxa de falsos negativos era mais baixa, oito dias após a exposição ao agente infeccioso e três dias após o início dos sintomas, pelo que se aconselha a esperar esse período temporal antes da realização do teste de diagnóstico, por forma a que seja efectuado no momento em que se verificou apresentar VPP mais elevado (Kucirka *et al.*, 2020). Devido ao risco de falsos negativos, aconselha-se também, a nunca excluir a possibilidade de infecção com base no resultado negativo de um único teste, na situação de o paciente apresentar sintomas característicos da COVID-19 (Kucirka *et al.*, 2020). O recurso a exames complementares imagiológicos como a tomografia computadorizada (TC) pode auxiliar no diagnóstico desses casos inconclusivos (Tahamtan & Ardebili, 2020). No entanto, não obstante a TC da região torácica se ter revelado como um método de elevada sensibilidade para a COVID-19 (Ai *et al.*, 2020), apresenta baixa especificidade, não sendo adequada para

identificar o agente etiológico da infecção e como tal, não deve ser utilizada de forma isolada para esse fim (Li & Xia, 2020).

O *droplet digital* PCR (dd-PCR), é uma técnica que tem demonstrado em vários estudos uma sensibilidade superior à do teste rRT-PCR, para a detecção da presença do SARS-CoV-2 em amostras biológicas (Jiang *et al.*, 2020). No entanto, o rRT-PCR continua a ser utilizado como o teste de referência para o diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2, devido a apresentar vantagens, no sentido de ser menos complexo, mais económico e mais rápido (Tedim *et al.*, 2021).

Porém, o rRT-PCR apresenta algumas condicionantes, nomeadamente a exigência de equipamento dispendioso e complexo, como é o caso dos termocicladores, e consequentemente de pessoal habilitado para o seu manuseio, além de que, pode ser necessário esperar dias, para a obtenção de resultados devido a questões logísticas, daí que várias outras técnicas tenham sido exploradas e desenvolvidas com o propósito de contornar essas limitações (Carter *et al.*, 2020; Sheridan, 2020). Desde que o SARS-CoV-2, foi declarado como uma PHEIC, um dos grandes objectivos globais passou a ser o desenvolvimento de testes de diagnóstico POC rápidos, económicos e simples (evitando a necessidade de pessoal treinado), que aumentassem a capacidade de triagem, permitindo dessa forma, acelerar quer as decisões clínicas face aos pacientes, quer as decisões governamentais face à pandemia (Rezaei *et al.*, 2020).

3 RT-LAMP

A tecnologia de amplificação isotérmica mediada por *loop* (LAMP), desenvolvida por Notomi *et al.*, consiste num método de amplificação de ácidos nucleicos de elevada sensibilidade e especificidade em condições isotérmicas (Notomi, 2000). Esta técnica, tem por base pelo menos quatro *primers* (F3, B3, FIP e BIP), com a capacidade de reconhecer seis sequências genéticas alvo distintas (o que contribui para a elevada especificidade da técnica) e a actividade da enzima *Bacillus stearothermophilus* (Bst) DNA polimerase, que

além de sintetizar novo material genético, promove a abertura da cadeia dupla da molécula de DNA (Notomi, 2000; Tomita *et al.*, 2008). Os *primers* de domínio simples, F3 e B3, são complementares com apenas uma sequência alvo específica, sendo estas a F3c e B3c, respectivamente (Tomita *et al.*, 2008). Os *primers* de domínio duplo (FIP e BIP) podem reconhecer duas regiões da molécula alvo (Tomita *et al.*, 2008). O FIP contém a região F1c e a sequência complementar à sequência F2c, enquanto o BIP contém as regiões B1c e B2 (Notomi, 2000). Na etapa inicial, utilizam-se os quatro *primers* para possibilitar o início da acção da Bst DNA polimerase, que é activada a uma temperatura entre os 60 °C e 65 °C (Notomi, 2000). Dos quatro *primers*, o FIP é o primeiro a participar no início do processo de síntese de novo DNA caso este se inicie no sentido *sense* (já no caso de se iniciar no sentido *antisense* o primeiro é o BIP), e hibridiza com a sequência F2c na extremidade 3' da molécula, permitindo que a Bst DNA polimerase efectue a replicação do ácido nucleico (Notomi, 2000; Tomita *et al.*, 2008). De seguida, o *primer* F3 hibridiza com a sequência da qual é complementar (Notomi, 2000; Tomita *et al.*, 2008). Durante a reacção de síntese de DNA, ocorre também o deslocamento da cadeia complementar que pode formar um *loop* numa extremidade (Notomi, 2000; Tomita *et al.*, 2008). Esta cadeia simples, vai exercer o papel de molde para a síntese de novo DNA, que se inicia com a hibridização dos *primers* BIP e B3 com as suas regiões alvo, processo que origina uma cadeia simples com loops em ambas as extremidades (3' e 5'), permitindo o início da etapa de amplificação cíclica (Notomi, 2000; Tomita *et al.*, 2008). A etapa cíclica do LAMP é iniciada pela hibridização do FIP com a região F2c do loop da cadeia molde, o que possibilita o alongamento por acção da Bst DNA polimerase, enquanto o BIP inicia o alongamento pela Bst DNA polimerase na outra extremidade ao hibridizar com a sequência B2c (Notomi, 2000; Tomita *et al.*, 2008). Deste modo, forma-se uma estrutura intermédia com loops, que permitem um novo ciclo de amplificação do DNA alvo (Notomi, 2000; Tomita *et al.*, 2008). Na medida em que, apenas os *primers* FIP e BIP participam na etapa de amplificação cíclica, estes são necessários numa maior concentração que os *primers* F3 e B3 (Tomita *et al.*, 2008). Para que seja possível aplicar a

tecnologia LAMP à amplificação do RNA, é necessária a acção da transcriptase reversa para converter este em DNA (Figura 7) (Notomi, 2000; Tomita *et al.*, 2008).

Os testes que têm por base a tecnologia de LAMP, apresentam algumas vantagens sobre as técnicas de PCR convencionais, uma vez que são métodos isotérmicos, mais rápidos (com uma duração estimada de meia-hora), mais baratos e necessitam de equipamento menos complexo para a sua realização, pelo que podem ser efectuados em laboratórios com menos recursos técnicos e apresentam assim potencial para serem utilizados como testes POC (Wong *et al.*, 2018).

Normalmente, nas técnicas que utilizam a metodologia LAMP, um resultado positivo para a presença do analito de interesse nas amostras, pode ser evidenciado pelo surgimento de turvação, ou por uma mudança de coloração (Miyamoto *et al.*, 2015). Um método colorimétrico de LAMP, no qual é utilizado o violeta de cristal leuco (LCV) como corante, foi desenvolvido por Miyamoto *et al.*, no qual uma reacção positiva se traduz pelo surgimento de cor violeta (Miyamoto *et al.*, 2015). Park *et al.*, tendo por base esse método, desenvolveram um teste colorimétrico de RT-LAMP, em que se utiliza o LCV como corante e, no qual duas regiões codificantes da proteína nsp3, duas regiões codificantes da proteína *spike*, uma região codificante da proteína da nucleocápside e uma região da ORF8 foram escolhidas como alvos dos *primers* (Park *et al.*, 2020). Este teste permite a obtenção de resultados em cerca de meia-hora, sendo que um resultado positivo para a presença de SARS-CoV-2 na amostra é detectável pelo aparecimento de uma coloração violeta (Park *et al.*, 2020).

Um outro teste de RT-LAMP, denominado *isothermal LAMP based method for COVID-19* (iLACO), foi elaborado por Yu *et al.* e permite identificar as amostras que contêm o SARS-CoV-2, através do uso de seis *primers* destinados a regiões das ORF1a e ORF1b, bem como do corante SYBR *Green* que emite fluorescência nos casos positivos à infecção (Yu *et al.*, 2020b).

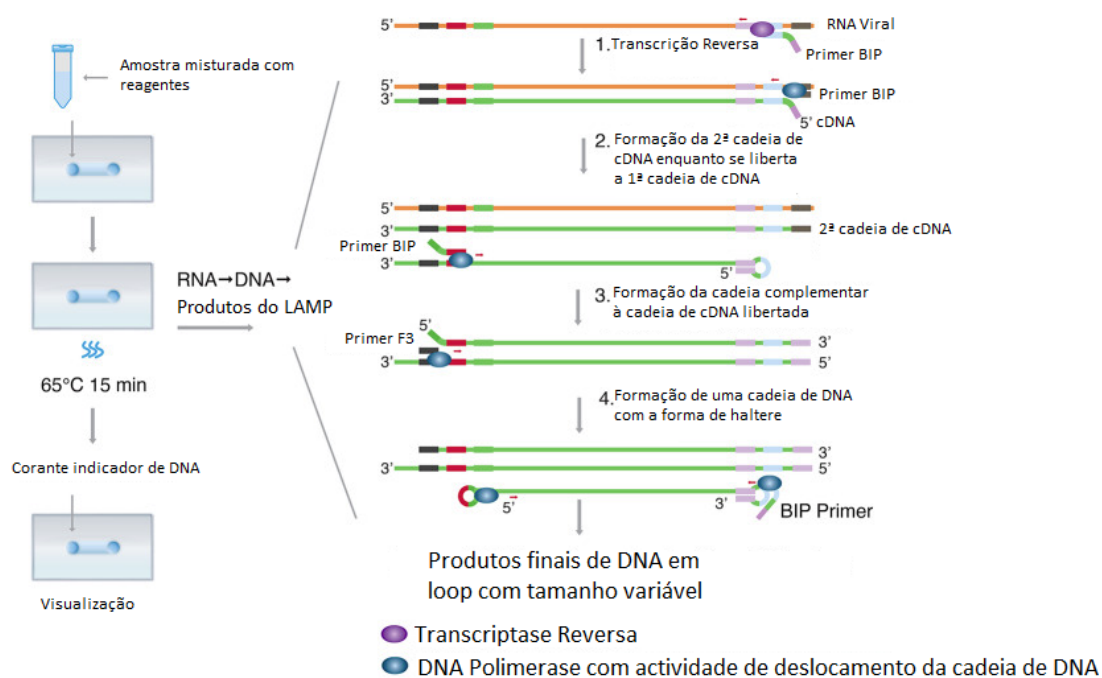


Figura 7: Representação Esquemática do Princípio da Técnica de RT-LAMP. Adaptado de Carter *et al.* (2020)

El-Tholoth *et al* descreveram uma técnica potencialmente mais sensível na detecção do SARS-CoV-2 que as técnicas de RT-LAMP ou RT-PCR convencionais, que recorre aos princípios da metodologia de amplificação rápida (RAMP) (El-Tholoth *et al.*, 2020). A técnica de RAMP, consiste na junção das técnicas de LAMP e amplificação de polimerase por recombinase (RPA), de modo a solucionar limitações inerentes a ambas as técnicas isoladas, pelo que é mais sensível que o LAMP e mais específico que o RPA (Song *et al.*, 2017). A técnica de RPA é um NAAT isotérmico, que requer complexos entre a enzima recombinase e os *primers*, a acção de uma DNA polimerase que actua na abertura da cadeia dupla de DNA e na fase de replicação do ácido nucleico e ainda, de proteínas ligantes ao DNA de cadeia simples que estabilizam a ligação dos *primers* a este, impedindo que sejam removidos durante os repetidos ciclos de amplificação do ácido nucleico (Piepenburg *et al.*, 2006). Assim, na técnica de RAMP, existe uma primeira fase de amplificação isotérmica por RPA a uma temperatura de cerca de 37 °C, que tem uma duração de 10 a 20 minutos e, uma segunda fase de amplificação por LAMP a uma temperatura entre os

60 °C e 65 °C que dura aproximadamente 30 minutos (Song *et al.*, 2017). O método que El-Tholoth *et al* designaram de Penn-RAMP em tubo fechado, combina os métodos de RT-LAMP e transcrição reversa seguida de amplificação de polimerase por recombinase (RT-RPA), permitindo a detecção do analito de interesse por fluorescência ou através de métodos colorimétricos, nos quais a mudança de coloração é visível até mesmo a olho nu (El-Tholoth *et al.*, 2020).

Contudo, as técnicas de LAMP, também apresentam algumas desvantagens relativamente às de PCR, como por exemplo, necessitarem de um maior número de *primers* para a sua realização, enquanto que é possível efectuar um teste PCR com apenas dois *primers* (Zhu *et al.*, 2020a).

4 CRISPR

Muitas arqueobactérias e bactérias, apresentam um sistema imunológico que as protege de agentes invasores como os bacteriófagos, que consiste em repetições palindrómicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas (CRISPR), bem como em genes associados ao CRISPR (Cas), que codificam as proteínas Cas (Hryhorowicz *et al.*, 2016). Os loci de CRISPR contêm deste modo, sequências palindrómicas repetitivas de RNA altamente conservadas e de tamanho variável, denominadas repetições directas, que se encontram separadas por sequências espaçadoras hipervariáveis (não repetitivas) (Jansen *et al.*, 2002). Adjacente a uma das extremidades dos loci, localiza-se uma sequência não codificante, designada sequência líder, que é formada por centenas de pares de bases, com predominância de bases AT (Jansen *et al.*, 2002). O mecanismo de acção do CRISPR (Figura 8) divide-se em três fases: uma primeira fase de adaptação, na qual após a exposição a um material genético estranho, ocorre a aquisição de novas sequências espaçadoras, que consistem em fragmentos do ácido nucleico invasor; uma segunda fase de expressão do CRISPR, isto é, da transcrição do CRISPR e consequente produção de RNA-CRISPRs (crRNAs) e, por fim uma terceira fase, na qual decorre o reconhecimento do ácido nu-

cleico invasor e a sua subsequente degradação pelas nucleases (Burmistrz & Pyrc, 2015). O reconhecimento do ácido nucleico invasor, é levado a cabo pelo complexo ribonuclear formado pela associação dos crRNAs com as proteínas Cas (Wiedenheft *et al.*, 2011). Deste modo, esses complexos exercem o papel de guia para as nucleases, que vão clivar a molécula invasora (Wiedenheft *et al.*, 2011).

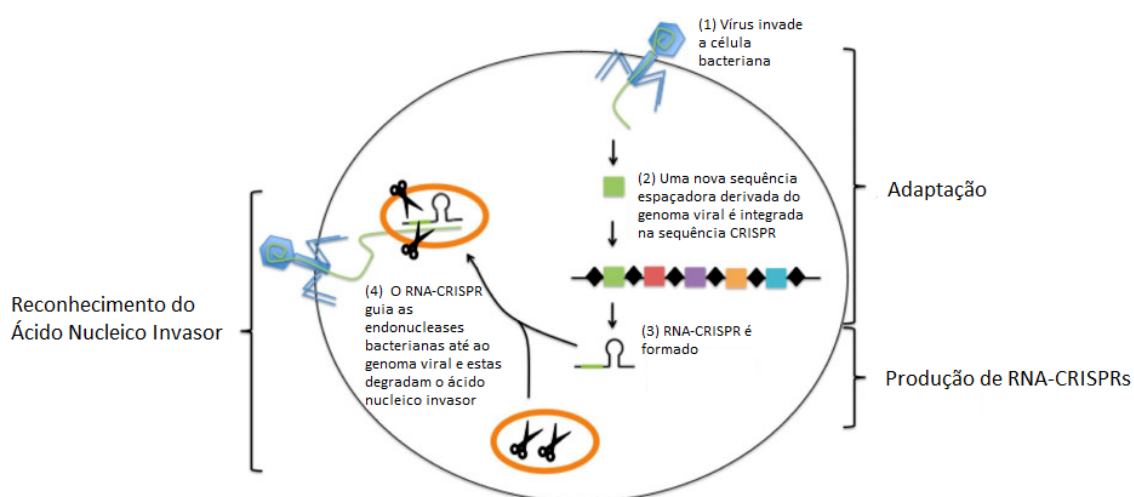


Figura 8: Representação Esquemática do Mecanismo de Acção do CRISPR. Adaptado de Nguyen *et al.* (2020)

O CRISPR/Cas tem vindo a ser utilizado essencialmente como uma ferramenta de edição genómica, sendo que, de entre as várias proteínas Cas, a Cas9 é a que tem sido mais explorada nessa área (Dara & Talebzadeh, 2020). Contudo, as proteínas Cas12a e Cas13a, revelaram-se mais eficientes para o propósito de diagnóstico de infecções, sendo a Cas13a a mais indicada para o diagnóstico de infecções por SARS-CoV-2, devido a ser específica para o RNA, enquanto que a Cas12a apresenta especificidade para o DNA (Dara & Talebzadeh, 2020).

O primeiro teste que tem por base o sistema CRISPR, a receber a autorização de emergência da FDA para ser utilizado no diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2, foi o kit CRISPR SARS-CoV-2 que utiliza a plataforma de detecção molecular *Specific High Sensivity Enzymatic Reporter UNLOCKing* (SHERLOCK) (Gootenberg *et al.*, 2017; Gugli-

elmi, 2020; Sherlock Biosciences, Inc, 2021). O kit SherlockTM CRISPR SARS-CoV-2, consiste num teste molecular isotérmico que se inicia com uma fase de amplificação do material genético presente na amostra por RT-LAMP, seguindo-se uma fase de transcrição, que permite obter o RNA que vai ser reconhecido e clivado pelos complexos CRISPR (Sherlock Biosciences, Inc, 2021). A clivagem dos RNA repórteres leva à emissão de um sinal fluorescente, que permite a detecção das sequências de interesse, que correspondem a regiões das ORF1a e ORF1b e do gene responsável por codificar a proteína N (Sherlock Biosciences, Inc, 2021).

Um outro teste que utiliza o sistema CRISPR/Cas, mas que tem por base a plataforma *DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter* (DETECTR), foi desenvolvido por Broughton *et al* e o seu princípio, consiste numa primeira fase de amplificação genética por RT-LAMP, seguida da detecção do DNA alvo pela enzima Cas12a (Broughton *et al.*, 2020). Os *primers* utilizados neste teste são específicos para sequências do gene codificante da proteína E e da região N2 do gene que codifica a proteína da nucleocápside viral (Broughton *et al.*, 2020). A clivagem do DNA repórter de cadeia simples, traduz-se na emissão de fluorescência que revela a presença do SARS-CoV-2 na amostra analisada (Broughton *et al.*, 2020).

Ambas as tecnologias, SHERLOCK e DETECTR, permitem a obtenção de resultados em aproximadamente uma hora, que podem ser lidos em tiras de fluxo lateral, pelo que apresentam potencial para serem utilizados como testes POC (Fozouni *et al.*, 2021).

Todavia, apesar de estes testes baseados no sistema CRISPR/Cas apresentarem níveis de sensibilidade e especificidade similares às técnicas de rRT-PCR e RT-LAMP, e da mesma forma que o RT-LAMP, dispensarem alguns equipamentos dispendiosos, como os termocicladores, são métodos que também exigem uma pré-amplificação do ácido nucleico para que seja possível a detecção do analito de interesse, motivo que impulsionou Ding *et al*, a conceberem o teste alternativo *All-in-One Dual CRISPR-Cas12a* (AIOD-CRISPR),

no qual todos os reagentes necessários à amplificação e detecção são reunidos num único sistema reactivo (Ding *et al.*, 2020).

Fozouni *et al* viriam ainda a desenvolver um teste que dispensa a etapa de amplificação do ácido nucleico (Fozouni *et al.*, 2021). Neste, utilizam-se vários crRNAs específicos para diferentes sequências do RNA viral, o que contribui para aumentar a especificidade e sensibilidade do teste (Fozouni *et al.*, 2021). A clivagem do RNA repórter pelas nucleases Cas13a induz a produção de fluorescência que pode ser detectada, até mesmo por uma câmara de telemóvel acoplada a um microscópio de fluorescência, o que comprova o potencial desta técnica como um teste POC (Fozouni *et al.*, 2021).

5 Outros Testes Moleculares

A técnica de amplificação mediada por transcrição (TMA), é uma outra alternativa ao RT-PCR no diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2, que consiste num NAAT isotérmico cuja metodologia se baseia na hibridização do *primer* T7, com a sequência de RNA alvo e subsequente acção da transcriptase reversa, que leva à formação de DNA complementar (Carter *et al.*, 2020). A transcriptase reversa apresenta uma função dupla neste método, pois além de promover a formação de cDNA, exerce ainda o papel de RNase H (H de híbrido), uma vez que degrada o RNA que serviu de molde, restando no fim da sua actuação somente uma molécula de DNA de cadeia simples (Carter *et al.*, 2020). A adição de um novo *primer* permite a síntese de DNA de cadeia dupla, que vai ser transcrito em amplicons pela RNA polimerase T7 (Carter *et al.*, 2020). Os amplicons formados, podem entrar em novos ciclos de amplificação e a detecção da sequência de RNA alvo do SARS-CoV-2, pode ser conseguida através do recurso a sondas, que emitem fluorescência após hibridização com os amplicons (Carter *et al.*, 2020).

Woo *et al* foram responsáveis pelo teste *SENSitive Splint-based one-step isothermal RNA detection* (SENSR), cujo princípio consiste em duas reacções enzimáticas: a primeira na ligação de duas sondas de DNA a uma sequência alvo de RNA, reacção essa catalisada

pela enzima SplintR ligase (uma Chlorella virus DNA ligase) e a segunda na transcrição dessa sequência pela T7 RNA polimerase, o que leva à síntese de um aptâmero de RNA, que após ligar-se a um corante fluorogénico origina fluorescência (Woo *et al.*, 2020). O SENSR revelou ser um ensaio de elevada sensibilidade e especificidade para múltiplos agentes patogénicos, inclusive para o SARS-CoV-2 (Woo *et al.*, 2020).

iv Testes de Antígeno

Apesar de inicialmente a maior parte dos testes POC de fluxo lateral serem testes serológicos, logo se desenvolveram métodos directos rápidos que permitiam a detecção do vírus em si (Rezaei *et al.*, 2020). Os testes rápidos de antígeno, da mesma forma que os testes rápidos para a detecção de anticorpos, consistem em imunoensaios que dispensam equipamento laboratorial complexo de elevado custo ou pessoal especializado para a sua execução, tratando-se assim de testes simples e económicos (Taleghani & Taghipour, 2021). Contudo, ao contrário dos testes serológicos, estes não proporcionam informações acerca de infecções passadas (Taleghani & Taghipour, 2021), todavia, apresentam uma maior especificidade e sensibilidade na detecção de infecção aguda por SARS-CoV-2 (Rezaei *et al.*, 2020).

A colheita de amostras clínicas para análise por teste de antígeno, é normalmente efectuada pela técnica de zaragatoa nasofaríngea ou de zaragatoa nasal (Nguyen *et al.*, 2020). De seguida, as amostras devem ser imersas numa solução extractiva, que promova a exposição das proteínas virais (Habli *et al.*, 2021).

Os testes de antígeno de fluxo lateral, têm por base o princípio da reacção antígeno-anticorpo, efectuando-se num dispositivo ou membrana que contém partículas de detecção (revestidas por anticorpos monoclonais anti-SARS-CoV-2 primários, específicos para uma proteína do SARS-CoV-2), na zona denominada almofada de conjugação, sendo as proteínas estruturais N ou S, as mais frequentemente escolhidas para esse efeito (Rezaei

et al., 2020; Taleghani & Taghipour, 2021). Desta forma, caso a amostra aplicada na almofada de amostra da plataforma de análise, contenha a proteína para a qual os anticorpos monoclonais primários são específicos, quando esta alcançar a almofada de conjugação, as partículas de detecção vão-se ligar à amostra por intermédio destes (Rezaei *et al.*, 2020). A amostra ao migrar por capilaridade através da membrana de nitrocelulose da tira de teste, vai atingir a zona de formação da linha de teste, onde se encontram anticorpos monoclonais anti-SARS-CoV-2 específicos para o mesmo antigénio (Rezaei *et al.*, 2020; Taleghani & Taghipour, 2021). Na eventualidade da amostra biológica ser positiva para a presença do SARS-CoV-2, os anticorpos imobilizados na zona de formação da linha de teste vão-se ligar também aos antigénios presentes nesta (Rezaei *et al.*, 2020; Taleghani & Taghipour, 2021). A almofada de absorção recolhe a amostra no final da tira de teste (Taleghani & Taghipour, 2021). A tira de teste apresenta ainda, uma zona de controlo de qualidade para a qual, durante o teste vão migrar anticorpos marcados, que se vão ligar aos anticorpos que se encontram já imobilizados nesta, sendo que o teste só pode ser considerado válido, se a linha de controlo se formar (Figura 9) (Taleghani & Taghipour, 2021). Estas imunocromatografias podem ser fluorescentes, em que o sinal é detectado e lido por um analisador digital, como sucede por exemplo nos testes Sofia 2 Antigen FIA e Lumi-rDX SARS-CoV-2 Ag Test, ou colorimétricas, nas quais a interpretação dos resultados é visual, como ocorre por exemplo, nos testes BD Veritor e BinaxNOW COVID-19 Ag Card (Habli *et al.*, 2021). Os testes de imunofluorescência apresentam sensibilidade superior aos imunoensaios colorimétricos, contudo, uma vez que necessitam de analisadores digitais, apresentam também um custo mais elevado (Habli *et al.*, 2021). As partículas de detecção mais utilizadas nestas imunocromatografias são as nanopartículas de ouro coloidal (Wen *et al.*, 2020), que apresentam características como elevada estabilidade e biocompatibilidade (Lai *et al.*, 2010).

O teste Sofia 2 Antigen FIA, lançado pela Quidel Corporation, foi o primeiro teste de antigénio a receber a aprovação da FDA para ser utilizado no combate à pandemia por

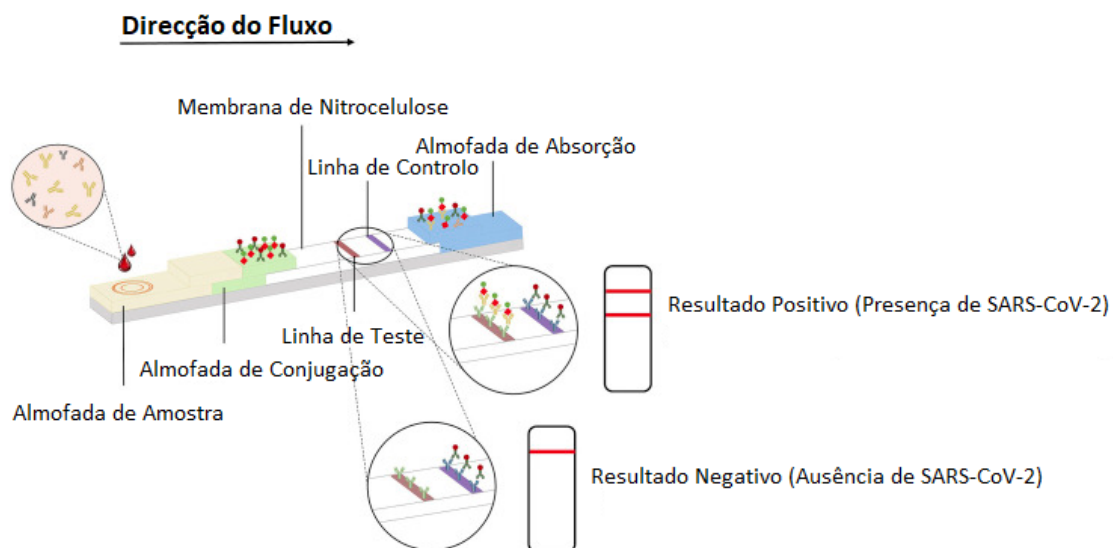


Figura 9: Representação Esquemática do Princípio dos Testes Rápidos de Antígeno. Adaptado de Taleghani & Taghipour (2021)

SARS-CoV-2, aprovação essa, que ocorreu a 8 de Maio de 2020 (Taleghani & Taghipour, 2021). Este teste consiste num ensaio em *sandwich* (o antígeno de interesse é "ensanduichado" entre anticorpos de captura e de detecção) de imunofluorescência de fluxo lateral automatizado, no qual se detecta a proteína da nucleocápside viral do SARS-CoV-2, sendo os resultados conhecidos num espaço temporal de quinze minutos (Taleghani & Taghipour, 2021).

Os testes rápidos de antígeno demonstram uma sensibilidade inferior aos testes moleculares como o RT-PCR, na medida em que nestes não ocorre uma etapa de amplificação dos alvos proteicos, pelo que revelam uma maior eficácia em indivíduos com elevada carga viral (Direção-Geral da Saúde and INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P. and Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2020b; Jääskeläinen *et al.*, 2021). No entanto, acarretam vantagens em termos económicos e de simplicidade, que os tornam mais adequados enquanto testes POC, ainda que devido à sensibilidade relativamente reduzida, se deva evitar utilizá-los como substitutos dos testes moleculares no papel de diagnóstico, exercendo antes o papel de auxiliares na triagem

(Jääskeläinen *et al.*, 2021). Todavia, a OMS recomendou a utilização de testes rápidos de antigénio (que atendessem aos critérios de sensibilidade igual ou superior a 80 % e de especificidade igual ou superior a 97 % comparativamente ao rRT-PCR), para o diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 em indivíduos sintomáticos, nas situações em que não fosse possível o recurso a NAATs, devendo o teste ser realizado na primeira semana desde o início dos sintomas, de forma a que corresponda a um período de alta carga viral (Direção-Geral da Saúde and INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P. and Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2020b; World Health Organization, 2020a). No caso de Portugal, estipulou-se que os testes rápidos de antigénio deviam cumprir os requisitos de sensibilidade igual ou superior a 90 % e de especificidade igual ou superior a 97 % para serem aprovados (Direção-Geral da Saúde and INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P. and Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2020b).

v Testes Serológicos

1 Introdução aos Testes Serológicos

Os testes serológicos têm por base a detecção dos anticorpos produzidos durante a resposta imune dos indivíduos ao vírus invasor (Direção-Geral da Saúde and INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P. and Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2020a; Hou *et al.*, 2020), na qual os anticorpos IgM, são normalmente a primeira linha de defesa humoral e como se verificou num estudo realizado por Hou *et al.*, no qual se avaliou através de um imunoensaio por quimioluminescência (CLIA), os níveis de anticorpos IgM e IgG em 338 pacientes com COVID-19, os IgM costumam ser detectáveis logo na primeira semana após a exposição ao SARS-CoV-2 (nos primeiros 3 a 6 dias após o início da infecção) (Hou *et al.*, 2020). Assim, os níveis de IgM no sangue aumentam até atingir o seu pico, o que ocorre comumente ao fim de duas ou três semanas e, de seguida diminuem rapidamente, até que não sejam

mais detectáveis (Hou *et al.*, 2020). Desta forma, a detecção de anticorpos IgM pode ser indicativa de uma infecção em estágio inicial (Hou *et al.*, 2020). A seroconversão para os anticorpos IgG, habitualmente ocorre depois da dos IgM e no estudo realizado, verificou-se que os IgG normalmente são detectáveis a partir da segunda semana, desde o início da infecção por SARS-CoV-2 (Hou *et al.*, 2020). Segundo os resultados obtidos nesse estudo, os níveis de IgG atingem o pico na terceira semana após a infecção e mantêm-se elevados durante cerca de dois meses, conferindo assim, uma potencial protecção contra a reinfeção por SARS-CoV-2 (Hou *et al.*, 2020). Deste modo, a detecção dos anticorpos IgG, pode ser indicativa de uma infecção actual ou passada (Hou *et al.*, 2020).

Todavia, num imunoensaio enzimático de quimioluminescência magnética (MCLIA), realizado na China por Long *et al* em 285 pacientes com COVID-19, observaram-se três diferentes tipos de seroconversão possíveis, podendo ocorrer seroconversão em simultâneo para os anticorpos IgG e IgM, primeiro para os IgM ou primeiro para os IgG (Long *et al.*, 2020). Contudo, nesse estudo também se verificou a diminuição do título de IgM decorridas as três primeiras semanas desde o início da infecção, o que está de acordo com o que foi observado no estudo de Hou *et al* (Long *et al.*, 2020).

A detecção de anticorpos IgA, também é utilizada como método indirecto de identificação da infecção por SARS-CoV-2, no entanto, os anticorpos IgM e IgG, são geralmente os alvos mais utilizados nos testes serológicos (Yu *et al.*, 2020a).

Apesar da utilidade dos testes serológicos, como testes de diagnóstico, ser limitada nas situações de infecção activa, devido à sua baixa sensibilidade e especificidade (até pelo risco de reactividade cruzada com outros coronavírus), quando comparados com os testes moleculares, uma vez que se tratam de métodos indirectos, eles desempenham um papel importante nos estudos de seroprevalência dos anticorpos anti-SARS-CoV-2, na triagem de doentes recuperados de COVID-19 e na monitorização da eficácia das vacinas, sendo os testes de neutralização por redução de placa (PRNTs), fundamentais para esse propó-

sito (Direção-Geral da Saúde and INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P. and Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2020a; Theel *et al.*, 2020). Além disso, antes de serem aprovados os testes rápidos de antígeno como testes POC, os testes serológicos imunocromatográficos de fluxo lateral responderam à urgência imposta pela pandemia de testes rápidos, simples e portáteis em países com poucos recursos (Wen *et al.*, 2020).

O conhecimento da seroprevalência das populações é importante, na medida que permite avaliar a prevalência da transmissão assintomática, determinar a duração da imunidade adquirida pela infecção por SARS-CoV-2 e consequentemente estimar o risco de uma reinfeção, ou seja, dados que podem contribuir para o desenvolvimento de vacinas e para o desenho de planos de vacinação (Galipeau *et al.*, 2020).

Os testes serológicos podem-se dividir em testes não rápidos e em testes rápidos (Galipeau *et al.*, 2020). Os testes serológicos não rápidos incluem testes de neutralização viral, testes de citometria de fluxo, entre outros, sendo que os mais utilizados na detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 são os imunoenaios de fase sólida como o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), ou CLIA, enquanto que os testes rápidos consistem essencialmente nas imunocromatografias de fluxo lateral (Galipeau *et al.*, 2020). Os testes não rápidos demonstram como vantagens a capacidade de analisar várias amostras clínicas em simultâneo, uma sensibilidade consideravelmente superior à dos testes rápidos e ainda, permitem a quantificação dos anticorpos presentes nas amostras, por oposição aos testes rápidos, que são meramente qualitativos (Galipeau *et al.*, 2020). Contudo, os testes rápidos apresentam como principal vantagem, o serem mais adequados como testes POC, uma vez que o seu procedimento é bastante simples e rápido de executar (Galipeau *et al.*, 2020).

Os procedimentos dos testes não rápidos, normalmente envolvem várias etapas, como a captura dos anticorpos anti-SARS-CoV-2 presentes nas amostras clínicas no interior de

uma placa revestida com antígenos específicos do SARS-CoV-2, etapas de lavagem e a adição de anticorpos de detecção (Galipeau *et al.*, 2020). Estes métodos, dependendo do conjugado dos anticorpos de detecção, podem ser colorimétricos (p. ex. ELISA), luminescentes (p. ex. CLIA) ou fluorescentes (p. ex. ensaio de fluorescência ligado a enzima (ELFA)) (Galipeau *et al.*, 2020; Wolff *et al.*, 2020).

2 ELISA

A técnica de ELISA permite a detecção e quantificação de imunoglobulinas ou antígenos de interesse (AROSA, Fernando A. *et al.*, 2012). As placas utilizadas na técnica de ELISA, geralmente têm 96 poços, que consistem na fase sólida (Yolken, 1980) e a detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 implica o revestimento desses poços com imunógenos deste, normalmente com as proteínas da Nucleocápside viral, as proteínas S ou as proteínas RBDs, que sensibilizam a placa para os anticorpos das amostras (Habli *et al.*, 2021). Desta forma, caso as amostras em estudo contenham anticorpos específicos para os antígenos virais, formam-se os complexos antígeno-anticorpo, que podem ser detectados através da adição de anticorpos de detecção marcados enzimaticamente e de cromógenos (AROSA, Fernando A. *et al.*, 2012; Carter *et al.*, 2020). A degradação dos cromógenos pelas enzimas, gera uma coloração que pode ser quantificada com o recurso a um espectrofotómetro, sendo a intensidade da cor proporcional à quantidade de anticorpos presentes na amostra (AROSA, Fernando A. *et al.*, 2012) (Figura 10). A técnica de ELISA fornece os resultados num intervalo de uma a cinco horas (Carter *et al.*, 2020). Esta técnica, além de qualitativa pode ser semi-quantitativa, sendo a intensidade do sinal produzido proporcional à quantidade de anticorpos presentes na amostra em estudo (Habli *et al.*, 2021), bem como, apresentar grau variável de automatização (Carter *et al.*, 2020). No entanto, apesar desta técnica quantificar a totalidade dos anticorpos que se ligam aos antígenos, nem todos esses anticorpos são efectivamente neutralizantes e o teste de ELISA não faz essa distinção, pelo que, para quantificar os anticorpos com função

neutralizante, é necessário utilizar outras técnicas como os testes PRNTs (Habli *et al.*, 2021).

Num estudo realizado por Xiang *et al.*, no qual se comparou a sensibilidade e especificidade das técnicas ELISA, ensaio imunocromatográfico de ouro coloidal (GICA) e rRT-PCR na detecção do SARS-CoV-2, observou-se que a sensibilidade dos testes ELISA e GICA era consideravelmente maior, quando se utilizava a combinação de anticorpos IgG e IgM do que quando se usavam somente anticorpos IgG, ou apenas anticorpos IgM (Xiang *et al.*, 2020). Como as amostras testadas com a técnica de rRT-PCR foram colhidas de pacientes que já se encontravam em tratamento e recuperação, a sensibilidade foi bastante baixa, o que comprova que os testes serológicos possibilitam detectar infecções passadas, que nunca haviam sido diagnosticadas, algo que não é possível através dos testes moleculares (Xiang *et al.*, 2020).

A técnica de ELISA não só permite a detecção e quantificação de imunoglobulinas específicas contra o SARS-CoV-2, como também pode ser usada para a detecção e quantificação da interleucina 6 (IL-6) (Li *et al.*, 2020b). A IL-6 pode assim ser utilizada como um biomarcador para avaliar a gravidade da doença, como concluíram Liu *et al.* ao monitorizar os níveis desta citocina em 69 pacientes com COVID-19 em estado grave (Liu *et al.*, 2020a). Nos doentes em que se verificou exacerbamento da doença, observou-se um aumento dos níveis da IL-6, enquanto que naqueles que se encontravam na fase de recuperação, notou-se uma diminuição acentuada (Liu *et al.*, 2020a).

A maioria dos testes não rápidos requerem como amostras clínicas, soro ou plasma venoso, pelo que McDade *et al.* optimizaram a técnica ELISA para contornar essa limitação, desenvolvendo um método que utiliza sangue total como amostra (dispensando a etapa de processamento deste para obtenção de plasma ou soro), pouco invasivo, que dispensa a necessidade de um profissional de saúde para a realização da punção venosa, o que simplifica a sua utilização em larga escala (McDade *et al.*, 2020). Deste modo, McDade *et*

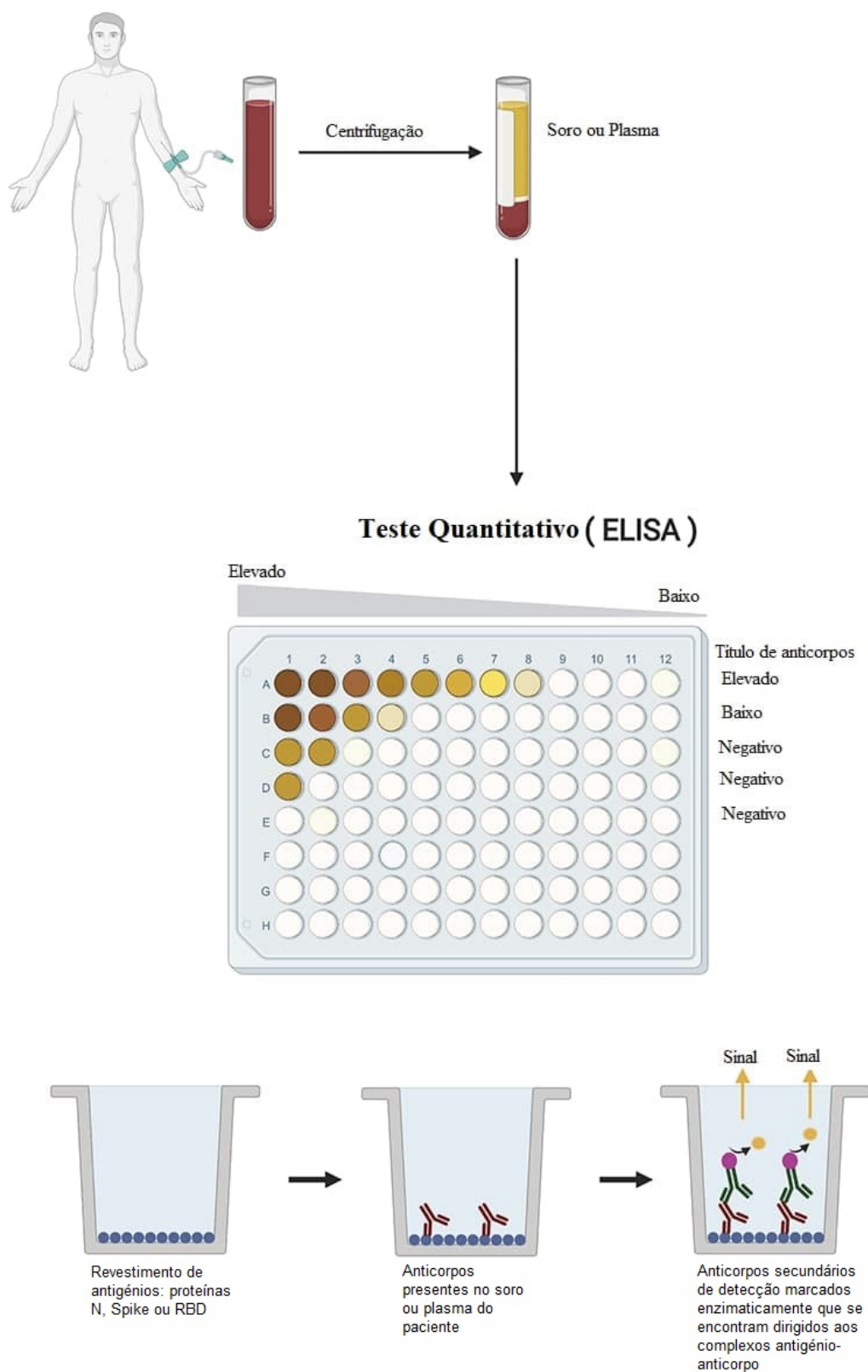


Figura 10: Representação Esquemática do Princípio da Técnica de ELISA. Adaptado de Galipeau *et al.* (2020)

al criaram a técnica *Dried Blood Spot* ELISA (DBS ELISA), que requer como amostra clínica somente uma gota de sangue capilar, que pode ser colhida através de punção digital capilar por meio de uma lanceta, que é de seguida seco em papel de filtro (McDade *et al.*, 2020). Posteriormente, as amostras de DBS são eluídas através de uma solução tampão e os eluatos resultantes podem ser utilizados para preencher os 96 poços da placa de ELISA, sendo o restante procedimento muito similar ao da técnica de ELISA clássica (McDade *et al.*, 2020).

3 CLIA

O princípio do método CLIA, é bastante similar ao da técnica ELISA, estando a principal diferença, no CLIA utilizar luminescência para a quantificação de anticorpos (Nguyen *et al.*, 2020).

Num estudo realizado por Bastos *et al.*, com a finalidade de avaliar a precisão das técnicas de CLIA, ELISA e dos imunoensaios de fluxo lateral no diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2, os resultados foram indicativos de que a técnica de CLIA era a mais sensível das três, enquanto que os imunoensaios de fluxo lateral, apresentaram os níveis mais baixos de especificidade e sensibilidade (Bastos *et al.*, 2020).

A técnica imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA), é uma variante da técnica CLIA, que revelou uma sensibilidade ainda mais elevada do que a técnica CLIA tradicional (Nguyen *et al.*, 2020). Um exemplo de teste de CMIA, aprovado pela FDA para a detecção de anticorpos contra o SARS-CoV-2, é o teste anti-SARS-CoV-2 CMIA IgG da Abbott Laboratories, no qual se utilizam micropartículas magnéticas revestidas por antígenos do SARS-CoV-2 (Manalac *et al.*, 2020). No caso de as amostras em estudo, apresentarem anticorpos IgG específicos para o antígeno, estes ligam-se e formam os complexos antígeno-anticorpo (Manalac *et al.*, 2020). Os complexos antígeno-anticorpo podem ser revelados através do recurso a anticorpos de detecção marcados com

um composto quimioluminescente (acridínio) (Manalac *et al.*, 2020). Assim, após um período de incubação e uma etapa de lavagem, são adicionadas as soluções pré-activadora e activadora (Manalac *et al.*, 2020). A solução pré-activadora (peróxido de hidrogénio), tem a função de separar o acridínio dos complexos, enquanto que a solução activadora (hidróxido de sódio), ao reagir com o acridínio desencadeia uma reacção quimioluminescente, que permite a quantificação dos anticorpos IgG presentes na amostra (Manalac *et al.*, 2020).

A CMIA é uma técnica automatizada, que exige instrumentação de custo elevado, mas que mesmo assim é vantajosa em termos económicos, quando comparada à técnica ELISA (Habli *et al.*, 2021). Além disso, nos estudos efectuados por Liu *et al.*, revelou-se como um método com sensibilidade superior à técnica ELISA, na detecção de anticorpos IgM e de anticorpos totais específicos contra o SARS-CoV-2 (Liu *et al.*, 2020b).

Cai *et al.* desenvolveram uma técnica MCLIA baseada em péptidos, com a finalidade de detectar anticorpos IgM e IgG específicos contra o SARS-CoV-2 (Cai *et al.*, 2020). Este método é uma outra variante da técnica de CLIA e faz uso de esferas magnéticas revestidas com estreptavidina, às quais se adicionam diferentes antígenos do SARS-CoV-2 (proteínas codificadas pelas regiões ORF1a e ORF1b, proteínas da nucleocápside viral e proteínas S), previamente biotinilados, por forma a permitir a sua aderência à estreptavidina (Cai *et al.*, 2020).

Uma outra técnica variante da CLIA é o imunoensaio de electroquimioluminescência (ECLIA), tendo sido o Elecsys Anti-SARS-CoV-2 da Roche Diagnostics, com uma duração de 18 minutos e que requer uma amostra de apenas 12 µL, o primeiro teste serológico que utiliza essa técnica a ser aprovado pela FDA para auxiliar na detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 (Lippi *et al.*, 2020). Este teste consiste numa técnica de *sandwich*, na qual a amostra a ser analisada é incubada em conjunto com proteínas N recombinantes biotiniladas e proteínas N recombinantes marcadas com ruténio, sendo essas pro-

teínas recombinantes as representantes das proteínas da nucleocápside do SARS-CoV-2 (Lippi *et al.*, 2020). Deste modo, na presença de anticorpos específicos para a proteína N, formam-se complexos *sandwich*, aos quais se adicionam micropartículas revestidas com estreptavidina que promovem a ligação dos complexos à fase sólida, por intermédio da interacção entre a biotina e a estreptavidina (Lippi *et al.*, 2020). Posteriormente, os complexos são aspirados para a célula de leitura na qual as micropartículas são fixadas magneticamente à superfície do eléctrodo e removem-se os restantes elementos da amostra (Lippi *et al.*, 2020). A aplicação de uma corrente eléctrica ao eléctrodo, provoca a emissão de quimioluminescência pelo ruténio que pode ser quantificada num fotomultiplicador, sendo o sinal emitido proporcional à quantidade de anticorpos anti-SARS-CoV-2 presentes na amostra (Lippi *et al.*, 2020).

4 Imunocromatografia de Fluxo Lateral

Os imunoensaios de fluxo lateral de fase sólida, são testes rápidos, simples, que dispensam equipamentos complexos de elevado custo e pessoal de saúde treinado, pelo que reúnem as características adequadas para serem utilizados como testes POC (Galipeau *et al.*, 2020; Wen *et al.*, 2020). No entanto, não podem ser considerados ideais, uma vez que a sua sensibilidade e especificidade é inferior à dos testes rápidos de antigénio na detecção de infecção aguda (Rezaei *et al.*, 2020) e inferior à dos testes serológicos não rápidos na detecção de infecções passadas (Galipeau *et al.*, 2020). Estas imunocromatografias têm por base a afinidade dos anticorpos anti-SARS-CoV-2 pelos antigénios do SARS-CoV-2, e o método mais comum consiste na deposição de partículas de detecção (coloridas ou fluorescentes), revestidas por antigénios específicos de SARS-CoV-2 (geralmente proteínas N ou S), na zona de deposição da amostra da tira de teste (Habli *et al.*, 2021). Estes testes requerem normalmente amostras sanguíneas colhidas por meio de punção digital, que seguidamente, são aplicadas numa tira de teste em conjunto com uma solução também (Taleghani & Taghipour, 2021). Após a aplicação da amostra na cassette de teste, caso esta seja positiva para a presença de anticorpos anti-SARS-CoV-2, estes vão aderir

às partículas de detecção (as mais vulgarmente utilizadas são as nanopartículas de ouro coloidal) (Habli *et al.*, 2021). De seguida, os complexos antigénio-anticorpo migram por capilaridade até às zonas de teste, onde se encontram anticorpos anti-IgG ou anti-IgM humanos imobilizados (Habli *et al.*, 2021). Estas imunocromatografias podem apresentar várias zonas de teste para a detecção dos diferentes tipos de anticorpos, como uma zona para a detecção dos IgM e outra para a detecção dos IgG (Habli *et al.*, 2021). Além disso, existe uma linha que serve para o controle de qualidade do teste, que caso não apareça, o teste deve ser considerado inválido (Habli *et al.*, 2021; Taleghani & Taghipour, 2021). A detecção dos complexos antigénio-anticorpo, pode ser feita pelo aparecimento de linhas coloridas ou pode ser realizada por analisadores digitais (Habli *et al.*, 2021). A interpretação do teste, baseia-se então habitualmente, no aparecimento de linhas coloridas, sendo que, quando surge apenas uma linha colorida na zona de controlo, a interpretação é a de que o indivíduo não está, nem esteve infectado (Taleghani & Taghipour, 2021). No entanto, caso surjam mais linhas coloridas além da linha de controlo, a interpretação será de que o indivíduo está ou já esteve infectado (Taleghani & Taghipour, 2021). Posto isto, o aparecimento de uma linha colorida na zona dos anticorpos IgM, sugere infecção no estado inicial, enquanto que, o aparecimento de uma linha na zona IgG se não for acompanhada do aparecimento de uma linha na zona IgM, é sugestivo de infecção no estado final ou passada (Figura 11) (Taleghani & Taghipour, 2021). Contudo, este tipo de testes são meramente qualitativos, pelo que, não concedem informações sobre a quantidade de anticorpos presentes nas amostras, sendo que para a obtenção desses dados, é necessário recorrer a testes serológicos não rápidos, como por exemplo à técnica ELISA (Taleghani & Taghipour, 2021).

Actualmente, já existem testes de imunocromatografia de fluxo lateral que permitem a obtenção de resultados em cerca de 10 minutos e que requerem apenas 10 µL de soro ou plasma, ou alternativamente uma amostra de 20 µL de sangue total (Vashist, 2020).

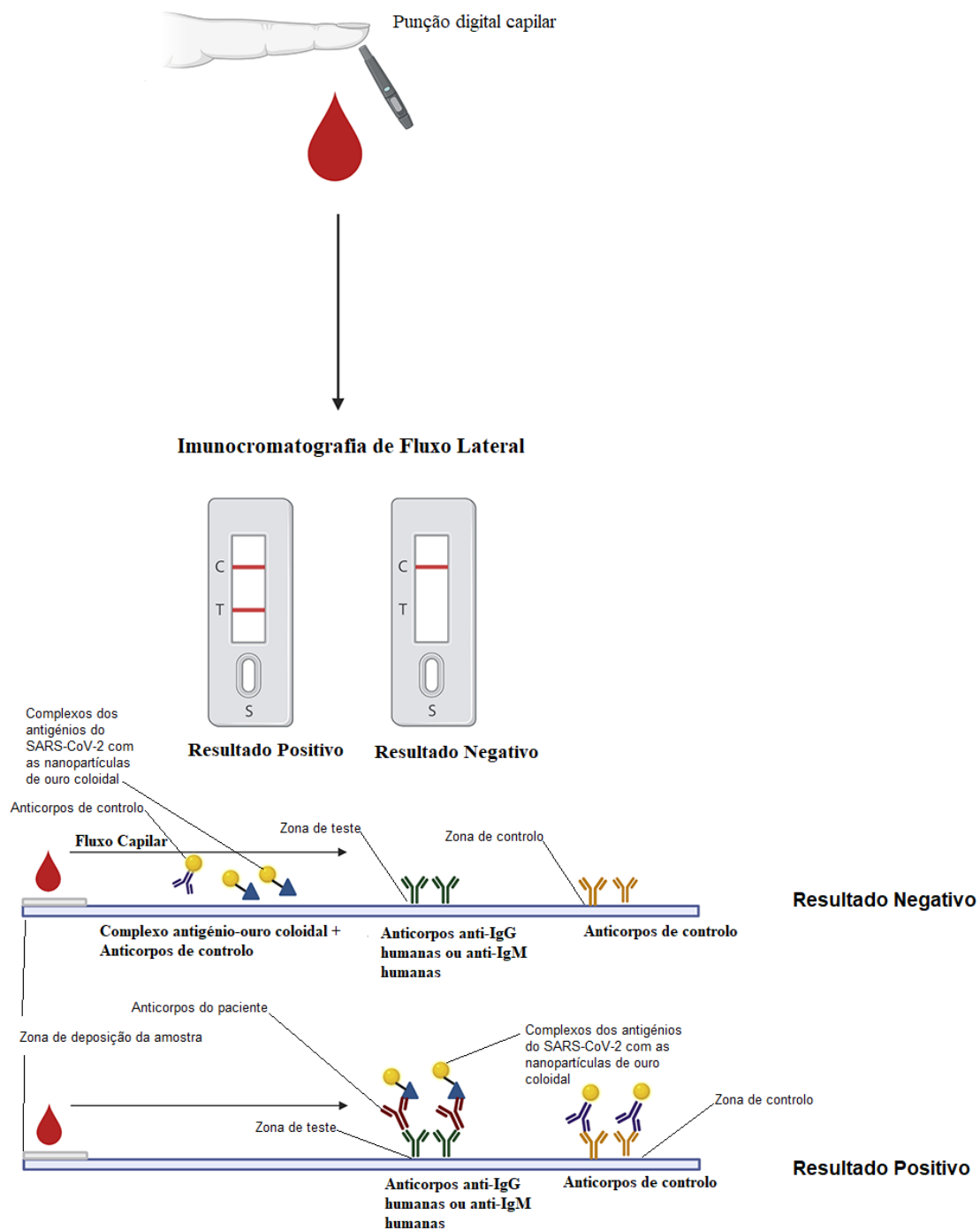


Figura 11: Representação Esquemática do Princípio dos Testes Rápidos Serológicos. Adaptado de Galipeau *et al.* (2020)

5 Testes de Neutralização

Os testes de neutralização diferem dos outros testes serológicos, dado que fornecem informação sobre a capacidade que os anticorpos detectados têm em combater o vírus invasor (Galipeau *et al.*, 2020). Uma vez que os testes de neutralização são mais confiáveis quando se cultiva um vírus "vivo", a sua aplicação para averiguar o grau de imunidade face à infecção por SARS-CoV-2, deve ser realizada em laboratórios com biossegurança no mínimo de nível 3 (Centers for Disease Control and Prevention, 2021c; Galipeau *et al.*, 2020; World Health Organization, 2020b).

De entre as proteínas estruturais do SARS-CoV-2, as mais imunogénicas são as proteínas S e N (Huang *et al.*, 2020). No entanto, apesar de a proteína da nucleocápside induzir a produção de uma elevada quantidade de anticorpos e como tal, ser adequada para testes com a finalidade de rastreio, não está envolvida no mecanismo de infecção viral e conseqüentemente, a maior parte dos anticorpos dirigidos a esta, não têm uma função neutralizante (Galipeau *et al.*, 2020). Contudo, a proteína S está directamente envolvida no mecanismo de infecção viral, uma vez que a entrada do SARS-CoV-2 nas células, depende da ligação do seu RBD à ECA-2, sendo este o principal alvo dos anticorpos neutralizantes (Ju *et al.*, 2020). Ripperger *et al.* realizaram um estudo serológico em indivíduos que apresentaram COVID-19, com sintomatologia de leve a grave, observando que apesar de a concentração de anticorpos específicos contra a proteína N diminuir substancialmente de forma rápida, tornando-se indetectáveis em cerca de dois ou três meses após a infecção nos indivíduos com doença leve, os anticorpos neutralizantes contra a proteína *spike*, mais especificamente os anticorpos contra a subunidade S2 e o domínio RBD, eram detectáveis pelo menos durante sete meses após a infecção, resultado que pode ajudar a explicar o número relativamente reduzido de casos de reinfecção por SARS-CoV-2 documentados (Ripperger *et al.*, 2020).

Os PRNTs são considerados os testes *gold standard* na detecção e quantificação de anticorpos neutralizantes (Lau *et al.*, 2021). As técnicas de PRNT têm por base a mistura do SARS-CoV-2, com várias diluições de amostras de soro nos poços das placas de teste, sendo uma fileira de poços utilizada como controlo negativo (apenas soro diluído) e outra fileira como controlo positivo (vírus em meio diluente) (Focosi *et al.*, 2020). As misturas de SARS-CoV-2 com soro, são de seguida incubadas durante uma hora a 37 °C numa atmosfera de 5 % de CO₂, por forma a permitir que os anticorpos interajam com o vírus (Focosi *et al.*, 2020). Após a remoção do sobrenadante, as suspensões são incubadas durante três a cinco dias numa cultura celular (devendo ser escolhidas células que expressem elevados níveis de ECA-2, sendo as células Vero CC-81 do epitélio renal do macaco verde africano, as mais comumente utilizadas nestes testes), a uma temperatura de 36,5 °C numa atmosfera de 5 % de CO₂ (Focosi *et al.*, 2020). As células devem ser cobertas com 1 % de agarose para impedir que o vírus se espalhe (Focosi *et al.*, 2020). Após esse período de incubação, as placas (regiões de células infectadas), são fixadas, coradas e visualizadas ao microscópio (Focosi *et al.*, 2020). A concentração de soro necessária para reduzir o número de placas em 50 % designa-se PRNT50 e o título de soro necessário para reduzir o número de placas em 90 %, denomina-se de PRNT90, o que permite estimar a quantidade de anticorpos presentes na amostra de soro, bem como a eficácia destes em neutralizar o vírus invasor (Focosi *et al.*, 2020). O PRNT convencional é realizado em placas de 24 poços e quando se utilizam placas de 96 poços para a sua execução, a técnica passa a ser conhecida como Micro PRNT (Focosi *et al.*, 2020).

vi Testes de Imunidade Celular

Para além da imunidade humoral mediada pelos anticorpos produzidos por plasmócitos, a imunidade mediada por células T revelou-se como um outro mecanismo de defesa potencialmente importante para a infecção por SARS-CoV-2 (Wang *et al.*, 2021).

A Adaptive Biotechnologies em conjunto com a Microsoft, desenvolveu o teste T-Detect

COVID, que tem por base o sequenciamento de todos os receptores de células T (TCRs) existentes numa amostra de sangue total e a subsequente comparação entre a quantidade de TCRs específicos para o SARS-CoV-2 presentes na amostra, com valores limiar pré-determinados (Dalai *et al.*, 2021; Food and Drug Administration, 2021; Sheridan, 2021). Este teste de imunidade celular, permite assim, da mesma forma que os testes serológicos, a detecção de infecções passadas, na medida em que o título de linfócitos T específicos para o SARS-CoV-2, se mantém elevado durante pelo menos seis meses após a infecção (Dalai *et al.*, 2021; Food and Drug Administration, 2021; Sheridan, 2021). O T-Detect COVID apresentou uma especificidade de 100 % e uma sensibilidade de 97,1 %, na análise de amostras de pacientes cuja infecção por SARS-CoV-2 tinha sido diagnosticada pelo menos quinze dias antes pela técnica de RT-PCR (Dalai *et al.*, 2021; Sheridan, 2021) e recebeu a autorização de emergência da FDA no dia 5 de Março de 2021 (Food and Drug Administration, 2021). No entanto, este teste não deve ser utilizado com a finalidade de diagnóstico da infecção activa, mas sim como um complemento aos testes serológicos na determinação da eficácia da vacinação (Dalai *et al.*, 2021; Food and Drug Administration, 2021; Sheridan, 2021).

III Conclusão

Ao longo do trabalho de revisão bibliográfica efectuado, foi possível concluir que os testes moleculares se revelaram uma ferramenta muito importante desde o início da pandemia de COVID-19, tendo sido as técnicas de NGS, aquelas que permitiram a identificação do agente etiológico da doença. A partir de então, os testes moleculares, sobretudo aqueles que têm por base as técnicas de PCR ou de LAMP, foram fundamentais para o diagnóstico dos indivíduos infectados.

Por outro lado, apesar dos testes serológicos rápidos de imunocromatografia de fluxo lateral não possibilitarem o diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2, estes foram os primeiros testes POC a serem utilizados para fins de triagem. Tal deveu-se à sua simplicidade e velocidade de execução, quando comparados com os testes moleculares de diagnóstico. Após aprovação das primeiras vacinas contra o SARS-CoV-2, os anticorpos detectados por estes testes deixaram de poder ser atribuídos (em pacientes vacinados), a uma infecção prévia pelo coronavírus.

Posteriormente, os testes rápidos de antígeno surgiram como testes POC mais fiáveis, devido ao facto de permitirem o diagnóstico a partir da detecção de proteínas virais. Contudo, não são tão sensíveis e específicos como os testes moleculares. Relevam-se as suas vantagens em termos de custo, rapidez de execução e possibilidade de auto-testagem, condições que têm permitido um rastreio muito mais rápido na população. Todavia, persiste a procura em desenvolver novos tipos de testes POC mais sensíveis e específicos, existindo mesmo abordagens completamente distintas das aplicadas até ao momento.

Paralelamente, persiste a procura de métodos mais confortáveis e seguros de colheita de amostras clínicas do que a actual técnica padrão da zaragatoa nasofaríngea, sendo a recolha de amostras de saliva uma das mais promissoras devido a ser pouco invasiva e permitir a auto-colheita de uma forma mais cómoda.

É de salientar que para além dos testes de diagnóstico, outros testes que mereceram atenção, foram os testes de imunidade. Neste enquadramento, os testes serológicos de imunocromatografia lateral apesar de detectarem anticorpos contra o SARS-CoV-2, não distinguem os anticorpos neutralizantes dos não-neutralizantes. Assim sendo, a detecção de anticorpos por esta técnica ou mesmo a sua quantificação nos testes serológicos não-rápidos como na ELISA ou CLIA, não permitem inferir se um indivíduo é ou não imune à infecção por SARS-CoV-2. Ressalva-se a importância dos testes de neutralização como os PRNTs ou dos testes de imunidade celular que permitem averiguar o grau de imunidade dos indivíduos e consequentemente avaliar o sucesso da vacinação, através da qual se pretende alcançar a imunidade de grupo.

Finalmente, é de relevar que nos últimos vinte anos observou-se o "salto" entre espécies de três coronavírus (SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2) que apresentaram a capacidade de provocar patologia grave nos humanos, bem como uma elevada taxa de transmissão. Neste contexto, e atendendo à elevada frequência de mutações do SARS-CoV-2, que se comprova pelo surgimento de sucessivas novas variantes, tal, reforça a importância de se continuar a investigar em novas técnicas que promovam a detecção precoce de novos agentes patogénicos virais, de modo a que no futuro se possa actuar de forma eficiente e eficaz, evitando-se um cenário pandémico semelhante ao que vivemos.

IV Referências

- Afzal, A. (2020). Molecular diagnostic technologies for COVID-19: Limitations and challenges. *Journal of Advanced Research*, 26, pp. 149–159.
- Ai, T. et al. (2020). Correlation of Chest CT and RT-PCR Testing for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in China: A Report of 1014 Cases. *Radiology*, 296(2), pp. E32–E40.
- Almeida, J. D. et al. (1968). Virology: Coronaviruses. *Nature*, 220(5168), pp. 650–650.
- Almeida, J. D. and Tyrrell, D. A. J. (1967). The Morphology of Three Previously Uncharacterized Human Respiratory Viruses that Grow in Organ Culture. *Journal of General Virology*, 1(2), pp. 175–178.
- Arnaut, R. et al. (2020). SARS-CoV2 Testing: The Limit of Detection Matters. *bioRxiv*.
- AROSA, Fernando A., PACHECO, Francisco C., and CARDOSO, Elsa M. (2012). *Fundamentos de Imunologia*. Lisboa: Lidel.
- Arumugam, A. and Wong, S. (2020). The Potential Use of Unprocessed Sample for RT-qPCR Detection of COVID-19 without an RNA Extraction Step. *bioRxiv*.
- Azhar, E. I. et al. (2014). Evidence for Camel-to-Human Transmission of MERS Coronavirus. *New England Journal of Medicine*, 370(26), pp. 2499–2505.
- Azzi, L. et al. (2020). Diagnostic Salivary Tests for SARS-CoV-2. *Journal of Dental Research*, 100(2), pp. 115–123.
- Bastos, M. L. et al. (2020). Diagnostic accuracy of serological tests for covid-19: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, article number m2516.
- Beach, J. and Schalm, O. (1936). A Filterable Virus, Distinct from that of Laryngo-tracheitis, the Cause of a Respiratory Disease of Chicks. *Poultry Science*, 15(3), pp. 199–206.

- Beaudette, F. and Hudson, C. (1937). Cultivation of the virus of infectious bronchitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 90, pp. 51–60.
- Behjati, S. and Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing? *Archives of disease in childhood - Education & practice edition*, 98(6), pp. 236–238.
- Broughton, J. P. et al. (2020). CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nature Biotechnology*, 38(7), pp. 870–874.
- Bull, R. A. et al. (2020). Analytical validity of nanopore sequencing for rapid SARS-CoV-2 genome analysis. *Nature Communications*, 11(1).
- Burmistrz, M. and Pyrc, K. (2015). CRISPR-Cas Systems in Prokaryotes. *Polish journal of microbiology*, 64(3), pp. 193—202.
- Bushnell, L. and Brandly, C. (1933). Laryngotracheitis in Chicks*. *Poultry Science*, 12(1), pp. 55–60.
- Bustin, S. A. (2017). How to speed up the polymerase chain reaction. *Biomolecular Detection and Quantification*, 12, pp. 10–14.
- Bustin, S. A. and Nolan, T. (2020). RT-qPCR Testing of SARS-CoV-2: A Primer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), article number 3004.
- Cai, X.-f. et al. (2020). A Peptide-Based Magnetic Chemiluminescence Enzyme Immunoassay for Serological Diagnosis of Coronavirus Disease 2019. *The Journal of Infectious Diseases*, 222(2), pp. 189–193.
- Cao, S. et al. (2020). Post-lockdown SARS-CoV-2 nucleic acid screening in nearly ten million residents of Wuhan, China. *Nature Communications*, 11(1), article number 5917.
- Carter, L. J. et al. (2020). Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. *ACS Central Science*, 6(5), pp. 591–605.

Centers for Disease Control and Prevention (2020). CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel. [Em linha]. Disponível em <<https://www.fda.gov/media/134922/download>>. [Consultado em 25-06-2021].

Centers for Disease Control and Prevention (2021a). COVID-19: When to Quarantine. [Em linha]. Disponível em <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/if-you-are-sick/quarantine.html>>. [Consultado em 04-07-2021].

Centers for Disease Control and Prevention (2021b). Interim Guidelines for Collecting and Handling of Clinical Specimens for COVID-19 Testing. [Em linha]. Disponível em <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>>. [Consultado em 06-06-2021].

Centers for Disease Control and Prevention (2021c). Interim Laboratory Biosafety Guidelines for Handling and Processing Specimens Associated with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). [Em linha]. Disponível em <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/lab-biosafety-guidelines.html>>. [Consultado em 05-06-2021].

Chafekar, A. and Fielding, B. C. (2018). MERS-CoV: Understanding the Latest Human Coronavirus Threat. *Viruses*, 10(2), article number 93.

Chang, S. et al. (2020). Mobility network models of COVID-19 explain inequities and inform reopening. *Nature*, 589(7840), pp. 82–87.

Charre, C. et al. (2020). Evaluation of NGS-based approaches for SARS-CoV-2 whole genome characterisation. *Virus Evolution*, 6(2).

Chau, C. H., Strobe, J. D., and Figg, W. D. (2020). COVID-19 Clinical Diagnostics and Testing Technology. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 40(8), pp. 857–868.

- Chaudhry, R. and Bamola, V. (2020). Recent discovery and development on SARS-CoV-2: a review of current literature. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 9(10), pp. 5113–5121.
- Cheng, M. P. et al. (2020). Diagnostic Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome–Related Coronavirus 2. *Annals of Internal Medicine*, 172(11), pp. 726–734.
- Cherry, J. D. and Krogstad, P. (2004). SARS: The First Pandemic of the 21st Century. *Pediatric Research*, 56(1), pp. 1–5.
- Chinese Center for Disease Control and Prevention (2020). Technical guidelines for laboratory testing of COVID-19. [Em linha]. Disponível em <<http://med.china.com.cn/content/pid/158678/tid/1026>>. [Consultado em 25-06-2021].
- Churko, J. M., Mantalas, G. L., Snyder, M. P., and Wu, J. C. (2013). Overview of High Throughput Sequencing Technologies to Elucidate Molecular Pathways in Cardiovascular Diseases. *Circulation Research*, 112(12), pp. 1613–1623.
- Comber, L. et al. (2020). Airborne transmission of SARS-CoV-2 via aerosols. *Reviews in Medical Virology*, 31(3).
- Corman, V. M. et al. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*, 25(3).
- Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-ncov and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*, 5(4), pp. 536–544.
- Dalai, S. C. et al. (2021). Clinical Validation of a Novel T-cell Receptor Sequencing Assay for Identification of Recent or Prior SARS-CoV-2 Infection. *medRxiv*.
- Dara, M. and Talebzadeh, M. (2020). CRISPR/Cas as a Potential Diagnosis Technique for COVID-19. *Avicenna J Med Biotechnol*, 12(3), pp. 201–202.

- Davies, N. G. et al. (2021). Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science*, 372(6538), article number eabg3055.
- de Groot, R. J. et al. (2013). Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV): Announcement of the Coronavirus Study Group. *Journal of Virology*, 87(14), pp. 7790–7792.
- Desmet, T. et al. (2021). Combined oropharyngeal/nasal swab is equivalent to nasopharyngeal sampling for SARS-CoV-2 diagnostic PCR. *BMC Microbiology*, 21(1).
- Ding, X. et al. (2020). Ultrasensitive and visual detection of SARS-CoV-2 using all-in-one dual CRISPR-Cas12a assay. *Nature Communications*, 11(1).
- Direção-Geral da Saúde (2020a). Orientação n.º 002/2020 de 25/01/2020 atualizada a 10/02/2020. [Em linha]. Disponível em <<https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/orientacoes-e-circulares-informativas/orientacao-n-0022020-de-25012020.aspx>>. [Consultado em 06-06-2021].
- Direção-Geral da Saúde (2020b). Orientação n.º 015/2020 de 23/03/2020 atualizada a 24/04/2020. [Em linha]. Disponível em <<https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/orientacoes-e-circulares-informativas/orientacao-n-0152020-de-23032020-pdf.aspx>>. [Consultado em 01-07-2021].
- Direção-Geral da Saúde (2020c). Prevenção e Controlo de Infecção por SARS-CoV-2 (COVID-19): Equipamentos de Proteção Individual (EPI). [Em linha]. Disponível em <<https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0072020-de-29032020-pdf.aspx>>. [Consultado em 05-06-2021].
- Direção-Geral da Saúde and INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P. and Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (2020a). Circular Informativa Conjunta n.º 003/CD/100.20.200: Testes Laboratoriais para SARS-CoV-2; Testes Rápidos. [Em linha]. Disponível em

<<https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/orientacoes-e-circulares-informativas/circular-informativa-conjunta-dgsinarmedinsa-n-003cd10020200-de-27052020-.aspx>>.

[Consultado em 19-07-2021].

Direção-Geral da Saúde and INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P. and Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (2020b). Circular Informativa Conjunta n.º 004/CD/100.20.200: Diagnóstico COVID-19 - Testes de pesquisa de antigénio. [Em linha]. Disponível em <<https://www.dgs.pt/normas-orientacoes-e-informacoes/orientacoes-e-circulares-informativas/circular-informativa-conjunta-dgsinarmedinsa-n-004cd10020200-de-14102020.aspx>>. [Consultado em 19-07-2021].

Duarte, M. et al. (2021). Telmisartan for treatment of Covid-19 patients: An open multi-center randomized clinical trial. *EClinicalMedicine*, 37, article number 100962.

El-Tholoth, M., Bau, H. H., and Song, J. (2020). A Single and Two-Stage, Closed-Tube, Molecular Test for the 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) at Home, Clinic, and Points of Entry. *ChemRxiv*.

Fabricant, J. (1998). The Early History of Infectious Bronchitis. *Avian Diseases*, 42(4), pp. 648–650.

Finkel, Y. et al. (2020). The coding capacity of SARS-CoV-2. *Nature*, 589(7840), pp. 125–130.

Firth, A. E. (2020). A putative new SARS-CoV protein, 3c, encoded in an ORF overlapping ORF3a. *Journal of General Virology*, 101(10), pp. 1085–1089.

Focosi, D., Maggi, F., Mazzetti, P., and Pistello, M. (2020). Viral infection neutralization tests: A focus on severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2 with implications for convalescent plasma therapy. *Reviews in Medical Virology*, 31(2).

Food and Drug Administration (2020a). Coronavirus (COVID-19) Update: FDA Authorizes First Next Generation Sequence Test for Diagnosing COVID-19. [Em linha]. Disponível em <<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-first-next-generation-sequence-test-diagnosing-covid-19>>. [Consultado em 24-06-2021].

Food and Drug Administration (2020b). Coronavirus (COVID-19) Update: FDA Issues Emergency Use Authorization to Yale School of Public Health for SalivaDirect, Which Uses a New Method of Saliva Sample Processing. [Em linha]. Disponível em <<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-issues-emergency-use-authorization-yale-school-public-health>>. [Consultado em 24-06-2021].

Food and Drug Administration (2020c). Enforcement Policy for Viral Transport Media During the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Public Health Emergency. [Em linha]. Disponível em <<https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-covid-19-and-medical-devices/faqs-viral-transport-media-during-covid-19>>. [Consultado em 20-06-2021].

Food and Drug Administration (2021). Coronavirus (COVID-19) Update: FDA Authorizes Adaptive Biotechnologies T-Detect COVID Test. [Em linha]. Disponível em <<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-adaptive-biotechnologies-t-detect-covid-test>>. [Consultado em 05-06-2021].

Ford, B., Lam, F., Wilson, J., and Moubarak, M. (2020). Role of Viral Transport Media in Sustaining COVID-19 Testing. *MedicalLab Management*, 9(9), p. 14.

Fouchier, R. A. M. et al. (2003). Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature*, 423(6937), pp. 240–240.

- Fox, J. D. (2007). Respiratory virus surveillance and outbreak investigation. *Journal of Clinical Virology*, 40, pp. 24–30.
- Fozouni, P. et al. (2021). Amplification-free detection of SARS-CoV-2 with CRISPR-Cas13a and mobile phone microscopy. *Cell*, 184(2), pp. 323–333.e9.
- Galipeau, Y., Greig, M., Liu, G., Driedger, M., and Langlois, M.-A. (2020). Humoral Responses and Serological Assays in SARS-CoV-2 Infections. *Frontiers in Immunology*, 11.
- Ge, X.-Y. et al. (2013). Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature*, 503(7477), pp. 535–538.
- Giesecke, J. (2014). Primary and index cases. *The Lancet*, 384(9959), p. 2024.
- Gootenberg, J. S. et al. (2017). Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, 356(6336), pp. 438–442.
- Green, M. R. and Sambrook, J. (2019). Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(6).
- Guan, Y. (2003). Isolation and Characterization of Viruses Related to the SARS Coronavirus from Animals in Southern China. *Science*, 302(5643), pp. 276–278.
- Guglielmi, G. (2020). First CRISPR test for the coronavirus approved in the united states. *Nature*.
- Gurbuz, M. (2020). Molecular and serological tests for COVID-19. *Eurasian Journal of Pulmonology*, 22(4), pp. 29–34.
- Habli, Z., Saleh, S., Zaraket, H., and Khraiche, M. L. (2021). COVID-19 in-vitro Diagnostics: State-of-the-Art and Challenges for Rapid, Scalable, and High-Accuracy Screening. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8.

- Hamre, D. and Procknow, J. J. (1966). A New Virus Isolated from the Human Respiratory Tract. *Experimental Biology and Medicine*, 121(1), pp. 190–193.
- Hassan, S. A., Sheikh, F. N., Jamal, S., Ezeh, J. K., and Akhtar, A. (2020). Coronavirus (COVID-19): A Review of Clinical Features, Diagnosis, and Treatment. *Cureus*, 12(3), article number e7355.
- Henry, R. (2020). Etymologia: Coronavirus. *Emerging Infectious Diseases*, 26(5), pp. 1027–1027.
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., and Pöhlmann, S. (2020). A Multibasic Cleavage Site in the Spike Protein of SARS-CoV-2 Is Essential for Infection of Human Lung Cells. *Molecular Cell*, 78(4), pp. 779–784.e5.
- Holmes, K. V. (2003). SARS-Associated Coronavirus. *New England Journal of Medicine*, 348(20), pp. 1948–1951.
- Hong, K. H. et al. (2020). Guidelines for Laboratory Diagnosis of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in Korea. *Annals of Laboratory Medicine*, 40(5), pp. 351–360.
- Hou, H. et al. (2020). Detection of IgM and IgG antibodies in patients with coronavirus disease 2019. *Clinical & Translational Immunology*, 9(5).
- Hryhorowicz, M., Lipiński, D., Zeyland, J., and Słomski, R. (2016). CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 65(3), pp. 233–240.
- Hu, X. et al. (2021). The distribution of SARS-CoV-2 contamination on the environmental surfaces during incubation period of COVID-19 patients. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, article number 111438.
- Huang, A. T. et al. (2020). A systematic review of antibody mediated immunity to coronaviruses: kinetics, correlates of protection, and association with severity. *Nature Communications*, 11(1).

- Ieven, M. and Goossens, H. (1997). Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(2), pp. 242–256.
- Jääskeläinen, A. et al. (2021). Evaluation of three rapid lateral flow antigen detection tests for the diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Journal of Clinical Virology*, 137, article number 104785.
- Jansen, R., van Embden, J. D. A., Gaastra, W., and Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43(6), pp. 1565–1575.
- Javaid, M. A., Ahmed, A. S., Durand, R., and Tran, S. D. (2016). Saliva as a diagnostic tool for oral and systemic diseases. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 6(1), pp. 67–76.
- Jiang, Y. et al. (2020). Digital PCR is a sensitive new technique for SARS-CoV-2 detection in clinical applications. *Clinica Chimica Acta*, 511, pp. 346–351.
- Johns Hopkins University of Medicine (2021). COVID-19 Map - johns hopkins coronavirus resource center. [Em linha]. Disponível em <<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>>. [Consultado em 16-07-2021].
- Ju, B. et al. (2020). Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection. *Nature*, 584(7819), pp. 115–119.
- Kang, S. et al. (2020). Crystal structure of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 10(7), pp. 1228–1238.
- Karthik, K. et al. (2020). Biosafety Concerns During the Collection, Transportation, and Processing of COVID-19 Samples for Diagnosis. *Archives of Medical Research*, 51(7), pp. 623–630.

- Ksiazek, T. G. et al. (2003). A Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 348(20), pp. 1953–1966.
- Kuba, K. et al. (2005). A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus–induced lung injury. *Nature Medicine*, 11(8), pp. 875–879.
- Kucirka, L. M., Lauer, S. A., Laeyendecker, O., Boon, D., and Lessler, J. (2020). Variation in False-Negative Rate of Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction–Based SARS-CoV-2 Tests by Time Since Exposure. *Annals of Internal Medicine*, 173(4), pp. 262–267.
- Kudo, E. et al. (2020). Detection of SARS-CoV-2 RNA by multiplex RT-qPCR. *PLOS Biology*, 18(10), article number e3000867.
- Lai, C. et al. (2010). Detection Based on Immunogold Labeling Technique and Its Expected Application in Composting. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 38(6), pp. 909–914.
- Lai, C.-C., Wang, C.-Y., and Hsueh, P.-R. (2020). Co-infections among patients with COVID-19: The need for combination therapy with non-anti-SARS-CoV-2 agents? *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 53(4), pp. 505–512.
- Lalchhandama, K. (2020). The chronicles of coronaviruses: the electron microscope, the doughnut, and the spike. *Science Vision*, 20(2), pp. 78–92.
- Lau, E. H. Y. et al. (2021). Neutralizing antibody titres in SARS-CoV-2 infections. *Nature Communications*, 12(1).
- Lauer, S. A. et al. (2020). The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. *Annals of Internal Medicine*, 172(9), pp. 577–582.

- Lee, R. A., Herigon, J. C., Benedetti, A., Pollock, N. R., and Denkinger, C. M. (2021). Performance of Saliva, Oropharyngeal Swabs, and Nasal Swabs for SARS-CoV-2 Molecular Detection: a Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 59(5), article number e02881–20.
- Li, C. et al. (2020a). Laboratory diagnosis of coronavirus disease-2019 (COVID-19). *Clinica Chimica Acta*, 510, pp. 35–46.
- Li, F. (2016). Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annual Review of Virology*, 3(1), pp. 237–261.
- Li, M.-Y., Li, L., Zhang, Y., and Wang, X.-S. (2020b). Expression of the SARS-CoV-2 cell receptor gene ACE2 in a wide variety of human tissues. *Infectious Diseases of Poverty*, 9(1), article number 45.
- Li, S. et al. (2020c). SARS-CoV-2: Mechanism of infection and emerging technologies for future prospects. *Reviews in Medical Virology*.
- Li, W. (2005). Bats Are Natural Reservoirs of SARS-Like Coronaviruses. *Science*, 310(5748), pp. 676–679.
- Li, Y. and Xia, L. (2020). Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): Role of Chest CT in Diagnosis and Management. *American Journal of Roentgenology*, 214(6), pp. 1280–1286.
- Li, Z. et al. (2020d). Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *Journal of Medical Virology*, 92(9), pp. 1518–1524.
- Lippi, G. et al. (2020). Preliminary evaluation of Roche Cobas Elecsys Anti-SARS-CoV-2 chemiluminescence immunoassay. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 58(11), pp. e251–e253.

- Liu, T. et al. (2020a). The role of interleukin-6 in monitoring severe case of coronavirus disease 2019. *EMBO Molecular Medicine*, 12(7).
- Liu, W. et al. (2020b). Clinical application of Chemiluminescence Microparticle Immunoassay for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *Journal of Clinical Virology*, 130, article number 104576.
- Loeffelholz, M. J. and Tang, Y.-W. (2020). Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections – the state of the art. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), pp. 747–756.
- Long, Q.-X. et al. (2020). Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nature Medicine*, 26(6), pp. 845–848.
- López, P., Ballesté, R., and Seija, V. (2020). Diagnóstico de laboratorio de COVID-19. *Revista Médica del Uruguay*, 36(4), pp. 393–400.
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*, (63), article number e3998.
- Lu, R. et al. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*, 395(10224), pp. 565–574.
- Luers, J. C. et al. (2020). Olfactory and Gustatory Dysfunction in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Clinical Infectious Diseases*, 71(16), pp. 2262–2264.
- Manalac, J. et al. (2020). Evaluation of Abbott anti-SARS-CoV-2 CMIA IgG and Euroimmun ELISA IgG/IgA assays in a clinical lab. *Clinica Chimica Acta*, 510, pp. 687–690.
- Marinowic, D. R. et al. (2021). A new SYBR Green real-time PCR to detect SARS-CoV-2. *Scientific Reports*, 11(1).

- Masters, P. S. (2006). The Molecular Biology of Coronaviruses. In *Advances in Virus Research*, pages pp. 193–292. Elsevier.
- McBride, R., van Zyl, M., and Fielding, B. (2014). The Coronavirus Nucleocapsid Is a Multifunctional Protein. *Viruses*, 6(8), pp. 2991–3018.
- McDade, T. W. et al. (2020). Enzyme immunoassay for SARS-CoV-2 antibodies in dried blood spot samples: A minimally-invasive approach to facilitate community- and population-based screening. *medRxiv*.
- Miyamoto, S., Sano, S., Takahashi, K., and Jikihara, T. (2015). Method for colorimetric detection of double-stranded nucleic acid using leuco triphenylmethane dyes. *Analytical Biochemistry*, 473, pp. 28–33.
- Mortola, E. and Roy, P. (2004). Efficient assembly and release of SARS coronavirus-like particles by a heterologous expression system. *FEBS Letters*, 576(1-2), pp. 174–178.
- Narayanan, K., Maeda, A., Maeda, J., and Makino, S. (2000). Characterization of the Coronavirus M Protein and Nucleocapsid Interaction in Infected Cells. *Journal of Virology*, 74(17), pp. 8127–8134.
- Neuman, B. W. et al. (2011). A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *Journal of Structural Biology*, 174(1), pp. 11–22.
- Nguyen, N. N. T., McCarthy, C., Lantigua, D., and Camci-Unal, G. (2020). Development of Diagnostic Tests for Detection of SARS-CoV-2. *Diagnostics*, 10(11), article number 905.
- Nicola, M. et al. (2020). The socio-economic implications of the coronavirus pandemic (COVID-19): A review. *International Journal of Surgery*, 78, pp. 185–193.
- Notomi, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12), article number E63.

- Pagella, F. et al. (2020). Diagnostic testing for SARS-CoV-2 infection in HHT patients: nasopharyngeal versus oropharyngeal swab. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 15(1).
- Palmer, S. et al. (2003). New Real-Time Reverse Transcriptase-Initiated PCR Assay with Single-Copy Sensitivity for Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA in Plasma. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(10), pp. 4531–4536.
- Pan, Y., Zhang, D., Yang, P., Poon, L. L. M., and Wang, Q. (2020). Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(4), pp. 411–412.
- Park, G.-S. et al. (2020). Development of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays Targeting Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *The Journal of Molecular Diagnostics*, 22(6), pp. 729–735.
- Peiris, J. et al. (2003). Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *The Lancet*, 361(9366), pp. 1319–1325.
- Péré, H. et al. (2020). Nasal Swab Sampling for SARS-CoV-2: a Convenient Alternative in Times of Nasopharyngeal Swab Shortage. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(6).
- Piepenburg, O., Williams, C. H., Stemple, D. L., and Armes, N. A. (2006). DNA Detection Using Recombination Proteins. *PLoS Biology*, 4(7), article number e204.
- Pillay, S. et al. (2020). Whole Genome Sequencing of SARS-CoV-2: Adapting Illumina Protocols for Quick and Accurate Outbreak Investigation during a Pandemic. *Genes*, 11(8), article number 949.
- Pondaven-Letourmy, S., Alvin, F., Boumghit, Y., and Simon, F. (2020). How to perform a nasopharyngeal swab in adults and children in the COVID-19 era. *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases*, 137(4), pp. 325–327.
- Porte, L. et al. (2020). Evaluation of a novel antigen-based rapid detection test for the diagnosis of SARS-CoV-2 in respiratory samples. *International Journal of Infectious Diseases*, 99, pp. 328–333.

- Priyadarshi, K. et al. (2020). Molecular Diagnosis of COVID-19: An Update and Review. *Annals of the National Academy of Medical Sciences (India)*, 56(03), pp. 126–137.
- Rabaan, A. A. et al. (2020). SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: A comparative overview. *Infez Med*, 28(2), pp. 174–184.
- Rahbari, R., Moradi, N., and Abdi, M. (2021). rRT-PCR for SARS-CoV-2: Analytical considerations. *Clinica Chimica Acta*, 516, pp. 1–7.
- Ravi, N., Cortade, D. L., Ng, E., and Wang, S. X. (2020). Diagnostics for SARS-CoV-2 detection: A comprehensive review of the FDA-EUA COVID-19 testing landscape. *Biosensors and Bioelectronics*, 165, article number 112454.
- Rezaei, M. et al. (2020). Point of Care Diagnostics in the Age of COVID-19. *Diagnostics*, 11(1), article number 9.
- Ripperger, T. J. et al. (2020). Orthogonal SARS-CoV-2 Serological Assays Enable Surveillance of Low-Prevalence Communities and Reveal Durable Humoral Immunity. *Immunity*, 53(5), pp. 925–933.e4.
- Rivers, T. M. (1937). Viruses and Koch's Postulates. *Journal of Bacteriology*, 33(1), pp. 1–12.
- Roberts, H. E. et al. (2021). Short and long-read genome sequencing methodologies for somatic variant detection; genomic analysis of a patient with diffuse large B-cell lymphoma. *Scientific Reports*, 11(1).
- Rodino, K. G. et al. (2020). Evaluation of Saline, Phosphate-Buffered Saline, and Minimum Essential Medium as Potential Alternatives to Viral Transport Media for SARS-CoV-2 Testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(6).
- Rodriguez-Morales, A. J. et al. (2020). Preparación y control de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) en América Latina. *Acta Medica Peruana*, 37(1), pp. 3–7.

- Sanchez-Duque, J. A. et al. (2020). Economy or Health, Constant Dilemma in Times of Pandemic: The Case of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 14(suppl 1), pp. 717–720.
- Santosh, T. S., Parmar, R., Anand, H., Srikanth, K., and Saritha, M. (2020). A Review of Salivary Diagnostics and Its Potential Implication in Detection of Covid-19. *Cureus*.
- Schalk, A. and Hawn, M. (1931). An apparently new respiratory disease of baby chicks. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 78, pp. 413–422.
- Schoeman, D. and Fielding, B. C. (2019). Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virology Journal*, 16(1), article number 69.
- Sheridan, C. (2020). Fast, portable tests come online to curb coronavirus pandemic. *Nature Biotechnology*, 38(5), pp. 515–518.
- Sheridan, C. (2021). COVID-19 testing turns to T cells. *Nature Biotechnology*, 39(5), pp. 533–534.
- Sherlock Biosciences, Inc (2021). INSTRUCTIONS FOR USE Sherlock™ CRISPR SARS-CoV-2 kit. [Em linha]. Disponível em <<https://www.fda.gov/media/137746/download>>. [Consultado em 05-07-2021].
- Slatko, B. E., Gardner, A. F., and Ausubel, F. M. (2018). Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Current Protocols in Molecular Biology*, 122(1).
- Snijder, E., Decroly, E., and Ziebuhr, J. (2016). Chapter Three - The Nonstructural Proteins Directing Coronavirus RNA Synthesis and Processing. In Ziebuhr, J., editor, *Coronaviruses*, volume 96 of *Advances in Virus Research*, pages pp. 59–126. Academic Press.
- Song, J. et al. (2017). Two-Stage Isothermal Enzymatic Amplification for Concurrent Multiplex Molecular Detection. *Clinical Chemistry*, 63(3), pp. 714–722.

- STAGGEMEIER, R., BORTOLUZZI, M., da Silva HECK, T. M., SPILKI, F. R., and de Matos ALMEIDA, S. E. (2015). QUANTITATIVE VS. CONVENTIONAL PCR FOR DETECTION OF HUMAN ADENOVIRUSES IN WATER AND SEDIMENT SAMPLES. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 57(4), pp. 299–303.
- Tahamtan, A. and Ardebili, A. (2020). Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 20(5), pp. 453–454.
- Taleghani, N. and Taghipour, F. (2021). Diagnosis of COVID-19 for controlling the pandemic: A review of the state-of-the-art. *Biosensors and Bioelectronics*, 174, article number 112830.
- Tang, Y.-W., Schmitz, J. E., Persing, D. H., and Stratton, C. W. (2020). Laboratory Diagnosis of COVID-19: Current Issues and Challenges. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(6).
- Tedim, A. P. et al. (2021). Comparison of real-time and droplet digital PCR to detect and quantify SARS-CoV-2 RNA in plasma. *European Journal of Clinical Investigation*.
- Theel, E. S. et al. (2020). The Role of Antibody Testing for SARS-CoV-2: Is There One? *Journal of Clinical Microbiology*, 58(8).
- Tom, M. R. and Mina, M. J. (2020). To Interpret the SARS-CoV-2 Test, Consider the Cycle Threshold Value. *Clinical Infectious Diseases*, 71(16), pp. 2252–2254.
- Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., and Notomi, T. (2008). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols*, 3(5), pp. 877–882.
- Tyrrell, D. A. J. and Bynoe, M. L. (1965). Cultivation of a Novel Type of Common-cold Virus in Organ Cultures. *BMJ*, 1(5448), pp. 1467–1470.

- Vabret, A. et al. (2001). Direct diagnosis of human respiratory coronaviruses 229E and OC43 by the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 97(1-2), pp. 59–66.
- van Kasteren, P. B. et al. (2020). Comparison of seven commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19. *Journal of Clinical Virology*, 128, article number 104412.
- Vashist, S. K. (2020). In Vitro Diagnostic Assays for COVID-19: Recent Advances and Emerging Trends. *Diagnostics*, 10(4), article number 202.
- Vijayanand, P., Wilkins, E., and Woodhead, M. (2004). Severe acute respiratory syndrome (SARS): a review. *Clinical Medicine*, 4(2), pp. 152–160.
- Vijgen, L. et al. (2005). Development of One-Step, Real-Time, Quantitative Reverse Transcriptase PCR Assays for Absolute Quantitation of Human Coronaviruses OC43 and 229E. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11), pp. 5452–5456.
- V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., and Thiel, V. (2020). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*.
- Vogels, C. B. et al. (2021). SalivaDirect: A simplified and flexible platform to enhance SARS-CoV-2 testing capacity. *Med*, 2(3), pp. 263–280.e6.
- Wang, C. et al. (2020a). The establishment of reference sequence for SARS-CoV-2 and variation analysis. *Journal of Medical Virology*, 92(6), pp. 667–674.
- Wang, D. et al. (2020b). Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus–Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*, 323(11), pp. 1061–1069.
- Wang, W. et al. (2020c). Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA*, 323(18), pp. 1843–1844.

- Wang, Z. et al. (2021). Exposure to SARS-CoV-2 generates T-cell memory in the absence of a detectable viral infection. *Nature Communications*, 12(1).
- Weiss, S. R. and Navas-Martin, S. (2005). Coronavirus Pathogenesis and the Emerging Pathogen Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(4), pp. 635–664.
- Wen, T. et al. (2020). Development of a lateral flow immunoassay strip for rapid detection of IgG antibody against SARS-CoV-2 virus. *The Analyst*, 145(15), pp. 5345–5352.
- Wiedenheft, B. et al. (2011). Structures of the RNA-guided surveillance complex from a bacterial immune system. *Nature*, 477(7365), pp. 486–489.
- Wolff, F. et al. (2020). Monitoring antibody response following SARS-CoV-2 infection: diagnostic efficiency of 4 automated immunoassays. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 98(3), article number 115140.
- Wong, M. L. and Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39(1), pp. 75–85.
- Wong, Y.-P., Othman, S., Lau, Y.-L., Radu, S., and Chee, H.-Y. (2018). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 124(3), pp. 626–643.
- Woo, C. H., Jang, S., Shin, G., Jung, G. Y., and Lee, J. W. (2020). Sensitive fluorescence detection of SARS-CoV-2 RNA in clinical samples via one-pot isothermal ligation and transcription. *Nature Biomedical Engineering*, 4(12), pp. 1168–1179.
- World Health Organization (2019). Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2019–2020. [Em linha]. Disponível em <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325884/WHO-WHE-CPI-2019.20-eng.pdf>>. [Consultado em 05-06-2021].

World Health Organization (2020a). Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection using rapid immunoassays. [Em linha]. Disponível em <<https://www.who.int/publications/i/item/antigen-detection-in-the-diagnosis-of-sars-cov-2infection-using-rapid-immunoassays>>. [Consultado em 05-06-2021].

World Health Organization (2020b). Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases. [Em linha]. Disponível em <<https://www.who.int/publications/i/item/10665-331501>>. [Consultado em 04-07-2021].

World Health Organization (2020c). Novel Coronavirus (2019-nCoV): situation report, 22. [Em linha]. Disponível em <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/330991>>. [Consultado em 30-06-2021].

World Health Organization (2020d). Protocol: Real-time RT-PCR assays for the detection of SARS-CoV-2. [Em linha]. Disponível em <<https://www.who.int/nepal/activities/supporting-elimination-of-kala-azar-as-a-public-health-problem/docs/default-source/coronaviruse/real-time-rt-pcr-assays-for-the-detection-of-sars-cov-2-institut-pasteur-paris>>. [Consultado em 06-06-2021].

World Health Organization (2020e). Responding to community spread of COVID-19. [Em linha]. Disponível em <<https://www.who.int/publications/i/item/responding-to-community-spread-of-covid-19>>. [Consultado em 05-06-2021].

World Health Organization (2020f). Transmission of SARS-CoV-2: implications for infection prevention precautions. [Em linha]. Disponível em <<https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/transmission-of-sars-cov-2-implications-for-infection-prevention-precautions>>. [Consultado em 19-06-2021].

- World Health Organization (2020g). WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. [Em linha]. Disponível em <<https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19—11-march-2020>>. [Consultado em 04-07-2021].
- World Health Organization (2021a). Middle east respiratory syndrome situation update, may 2021. [Em linha]. Disponível em <<http://www.emro.who.int/health-topics/mers-cov/mers-outbreaks.html>>. [Consultado em 06-07-2021].
- World Health Organization (2021b). Repurposed Antiviral Drugs for Covid-19 — Interim WHO Solidarity Trial Results. *New England Journal of Medicine*, 384(6), pp. 497–511.
- Wrapp, D. et al. (2020). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, 367(6483), pp. 1260–1263.
- Wu, C. et al. (2020). Furin: A Potential Therapeutic Target for COVID-19. *iScience*, 23(10), article number 101642.
- Wu, D. et al. (2005). Civets Are Equally Susceptible to Experimental Infection by Two Different Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Isolates. *Journal of Virology*, 79(4), pp. 2620–2625.
- Xiang, J. et al. (2020). Evaluation of Enzyme-Linked Immunoassay and Colloidal Gold-Immunochromatographic Assay Kit for Detection of Novel Coronavirus (SARS-Cov-2) Causing an Outbreak of Pneumonia (COVID-19). *medRxiv*.
- Xiao, K. et al. (2020). Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from malayan pangolins. *Nature*, 583(7815), pp. 286–289.
- Xiong, J. et al. (2020). Impact of COVID-19 pandemic on mental health in the general population: A systematic review. *Journal of Affective Disorders*, 277, pp. 55–64.

- Yolken, R. H. (1980). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): a practical tool for rapid diagnosis of viruses and other infectious agents. *Yale J Biol Med*, 53(1), pp. 85–92.
- Yu, H. Q. et al. (2020a). Distinct features of SARS-CoV-2-specific IgA response in COVID-19 patients. *European Respiratory Journal*, 56(2), article number 2001526.
- Yu, L. et al. (2020b). Rapid Detection of COVID-19 Coronavirus Using a Reverse Transcriptional Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Diagnostic Platform. *Clinical Chemistry*, 66(7), pp. 975–977.
- Yu, Z. et al. (2011). Differences between Human Plasma and Serum Metabolite Profiles. *PLoS ONE*, 6(7), article number e21230.
- Zehra, Z. et al. (2020). Corona virus versus existence of human on the earth: A computational and biophysical approach. *International Journal of Biological Macromolecules*, 161, pp. 271–281.
- Zhong, N. et al. (2003). Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *The Lancet*, 362(9393), pp. 1353–1358.
- Zhu, H. et al. (2020a). The vision of point-of-care PCR tests for the COVID-19 pandemic and beyond. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 130, article number 115984.
- Zhu, N. et al. (2020b). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, 382(8), pp. 727–733.