

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
BACHARELADO EM BIOMEDICINA**

INGRID BEATRIZ BRAZ OLIVEIRA

**COMPARAÇÃO ENTRE TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO E MOLECULAR PARA
DETECÇÃO DO SARS-CoV-2**

**JOÃO PESSOA
2023**

INGRID BEATRIZ BRAZ OLIVEIRA

**COMPARAÇÃO ENTRE TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO E MOLECULAR PARA
DETECÇÃO DO SARS-COV-2**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Universidade Federal da Paraíba como requisito parcial para obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Rodrigues Sarmiento

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Carolina Bernardes Dulgheroff

**JOÃO PESSOA
2023**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

O48c Oliveira, Ingrid Beatriz Braz.
Comparação entre teste imunocromatográfico e
molecular para detecção do SARS-CoV-2 / Ingrid Beatriz
Braz Oliveira. - João Pessoa, 2023.
47 f. : il.

Orientador : Ronaldo Rodrigues Sarmento.
Coorientadora : Ana Carolina Bernardes Dulgheroff.
TCC (Graduação) - UFPB/CCS.

1. Antígeno. 2. Biologia molecular. 3. COVID-19. 4.
Diagnóstico. I. Sarmento, Ronaldo Rodrigues. II.
Dulgheroff, Ana Carolina Bernardes. III. Título.

UFPB/CCS

CDU 616-097.1

INGRID BEATRIZ BRAZ OLIVEIRA

**COMPARAÇÃO ENTRE TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO E MOLECULAR PARA
DETECÇÃO DO SARS-COV-2**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Universidade Federal da Paraíba como requisito parcial para obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Rodrigues Sarmiento

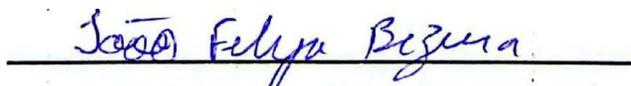
Coorientadora: Profa. Dra. Ana Carolina Bernardes Dulgheroff

DATA DE APROVAÇÃO: 25/10/2023.

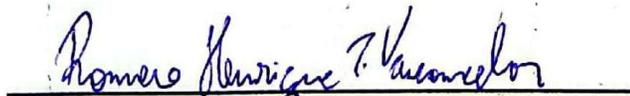
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Ronaldo Rodrigues Sarmiento (Orientador)
Departamento de Diagnóstico, Práticas Laboratoriais e Odontológicas –
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



Prof. Dr. João Felipe Bezerra
Departamento de Diagnóstico, Práticas Laboratoriais e Odontológicas –
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



Prof. Dr. Romero Henrique Teixeira Vasconcelos
Hospital Universitário Lauro Wanderley –
Universidade Federal da Paraíba (HULW-UFPB)

AGRADECIMENTOS

À Deus, em primeiro lugar, por sempre restaurar as minhas forças, me abençoar e conceder coragem para superar todos os desafios.

À minha mãe Suzete Braz por todo esforço para que eu pudesse viver e ser livre para escolher uma carreira acadêmica/profissional. Sou grata por todo o incentivo, apoio, paciência e compreensão, e por me inspirar diariamente a lutar para conquistar meus objetivos com determinação e resiliência.

À minha avó Zozimá Matias (*in memoriam*), por me educar e rezar por mim. Sou grata por todos os conselhos inestimáveis que recebi, por todos os ensinamentos que me repassou, e por ter sido um exemplo de mulher forte, resistente, honesta e bondosa.

Aos meus irmãos, Kelvin Max e Nicolas Gabriel, pelos momentos de alegria e descontração, pelo encorajamento e por me incentivarem a continuar minha jornada, apesar de todos os obstáculos.

Aos meus cinco gatos, Geleia, Liz, Maya, Harry e Atena, pelo conforto psicológico e amor incondicional.

Aos meus padrinhos, Maria José Braz e José Zacarias, por me adotarem como uma filha, por me acolherem em João Pessoa, por todo o carinho, apoio e amor.

Aos meus amigos Matheus Felipe, Joyce Lopes, Eduardo Batista, Mônica Almeida, Maria Luiza Souza e Isis Queiroz, que me ajudaram ao longo desta trajetória, compartilhando de suas experiências e conhecimentos. Sou grata por ouvirem meus desabafos, me apoiarem e estarem presentes nos momentos de alegria e tristeza.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Ronaldo Rodrigues Sarmiento e a Prof^ª. Dr^ª. Ana Carolina Bernardes Dulgheroff, que impulsionaram minha carreira acadêmica, me acolheram, me orientaram e ampliaram meus horizontes profissionais.

Ao Centro Profissional e Tecnológico (CPT), ao Centro de Ciências da Saúde (CCS) e à Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ) pelo financiamento de bolsas de iniciação científica.

RESUMO

A COVID-19 é uma doença infecciosa causada por um vírus denominado Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2). A doença, altamente transmissível e contagiosa, possui um espectro clínico variado. O diagnóstico laboratorial ocorre por meio de testes moleculares, como o qRT-PCR e sorológicos, como os que buscam detectar anticorpos específicos (IgM e/ou IgG) ou antígenos virais. O SARS-CoV-2 possui a capacidade de se adaptar aos hospedeiros humanos por meio do desenvolvimento de mutações, que podem se acumular, dando origem a variantes do vírus. Diversos fatores são apontados como possíveis interferentes no desempenho de testes rápidos de antígeno (TR-Ag), como o tipo de amostra, estágio da infecção, carga viral, sintomatologia, qualidade da amostra, condições de armazenamento e transporte, além das diferentes variantes. Nesta pesquisa foram realizadas análises sociodemográficas, epidemiológicas e laboratoriais para avaliar a influência de fatores que podem afetar o desempenho do TR-Ag, por meio de uma comparação entre os resultados obtidos através da testagem de 180 amostras de *swab* nasofaríngeo, selecionadas de 2020 a 2022, pelos métodos de RT-qPCR e TR-Ag. Para tal, estimou-se as taxas de sensibilidade e especificidade, visando comparar e verificar as divergências de desempenho do TR-Ag para períodos em que diferentes variantes do vírus estiveram em maior circulação no Brasil, correlacionando com os dados de sintomatologia e carga viral das amostras. Os resultados de RT-qPCR foram utilizados como um padrão para determinar as amostras verdadeiro-positivas para a doença. A sensibilidade geral (coorte total) foi de 69,6% (Intervalo de confiança [IC] de 95% = 47,1% a 86,8%) em 2020; 34,4% (IC de 95% = 18,6% a 53,2%) em 2021 e 57,1% (IC de 95% = 39,4% a 73,7%) em 2022. Assim sendo, observou-se heterogeneidade na sensibilidade estimada entre os grupos sintomáticos e assintomáticos, para as variantes estudadas. Ao avaliar a taxa de sensibilidade para diferentes cargas virais, verificou-se uma aparente redução na sensibilidade, especialmente para valores de Ct > 25 (baixa carga viral), variando entre 44,0% a 14,0% para as amostras detectadas em 2021 e 33,0% a 29,0% para as amostras detectadas em 2022. Em contrapartida, para valores de Ct < 25 (alta carga viral), as taxas de sensibilidade foram de 100%. A especificidade foi mantida em 100%. Desta forma, a carga viral foi considerada um fator de alta relevância para determinar o desempenho do teste do antígeno SARS-CoV-2. Portanto, apesar da heterogeneidade nas taxas de sensibilidade do TR-Ag, pode-se afirmar que o teste foi capaz de detectar com eficiência todas amostras detectadas nos referentes períodos selecionados, ao seguir às recomendações previamente existentes e altamente difundidas na literatura (Ct < 25, até o 7º dia de sintomas, aproximadamente). Ademais, recomenda-se uma vigilância contínua do desempenho analítico destes dispositivos, a fim de garantir a qualidade diagnóstica na detecção do vírus.

Palavras-Chave: antígeno; biologia molecular; COVID-19; diagnóstico.

ABSTRACT

COVID-19 is an infectious disease caused by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). The disease, highly transmissible and contagious, has a variable clinical spectrum. Laboratory diagnosis is based on molecular tests, such as qRT-PCR, and serological tests, such as those designed to detect specific antibodies (IgM and/or IgG) or viral antigens. SARS-CoV-2 has the ability to adapt to human hosts through the development of mutations, which can be accumulated, resulting in variants of the virus. Several factors have been identified as possible interferences in the performance of rapid antigen tests (RATs), such as the type of sample, stage of infection, viral load, symptomatology, sample quality, storage and transport conditions, as well as the different variants. In this study, sociodemographic, epidemiological and laboratory analyses were conducted to evaluate the influence of factors that can affect the performance of RATs, through a comparison between the results obtained through testing 180 nasopharyngeal *swab* samples, selected from different periods, using the RAT methods in relation to RT-qPCR. For this purpose, the sensitivity and specificity rates were estimated, in order to compare and verify the divergences in the performance of the RAT in periods when different variants of the virus were in higher circulation in Brazil, correlating with the symptomatology and viral load of the samples. The RT-qPCR results were used as a standard to determine the true-positive samples for the disease. The overall sensitivity (total cohort) was 69.6% (95% confidence interval [CI] = 47.1% to 86.8%) in 2020; 34.4% (95% CI = 18.6% to 53.2%) in 2021 and 57.1% (95% CI = 39.4% to 73.7%) in 2022. Therefore, heterogeneity was observed in the estimated sensitivity between the symptomatic and asymptomatic groups for the variants studied. Evaluating the sensitivity rate for different viral loads resulted in an apparent reduction in sensitivity, especially for Ct values > 25 (low viral load), ranging from 44.0% to 14.0% for samples detected in 2021 and 33.0% to 29.0% for samples detected in 2022. By contrast, for Ct < 25 (high viral load), the sensitivity rates were 100%. Specificity was maintained at 100%. Thus, viral load was considered a highly relevant factor in determining the performance of the SARS-CoV-2 antigen test. Thus, despite the heterogeneity in the RAT sensitivity rates, it is possible to state that the test was able to accurately detect all the samples detected during the selected periods, by respecting the previously existing and highly widespread recommendations in the literature (Ct < 25, Until the 7th day of symptoms, approximately). Furthermore, continuous monitoring of the analytical performance of these devices is recommended in order to guarantee diagnostic quality in the detection of the virus.

Keywords: antigens; COVID-19; diagnosis; molecular biology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação da estrutura e organização do genoma do SARS-CoV-2.....	14
Figura 2 - Evolução laboratorial da COVID-19 e correlação entre o desenvolvimento da carga viral durante a infecção pelo SARS-CoV-2.....	18
Figura 3- Mecanismo de detecção de antígeno do SARS-CoV-2 por TR-Ag	21
Figura 4 - Frequência das principais linhagens do SARS-CoV-2 no Brasil pelo período de amostragem selecionado	25
Figura 5 - Percentual dos sintomas relacionados com COVID-19 relatados pelos indivíduos, 2020-2022	32
Figura 6 - Sensibilidade de detecção do SARS-CoV-2 pelo teste rápido de pesquisa de antígeno em relação à carga viral obtida pelo RT-qPCR.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização indivíduos segundo sexo, faixa etária, cor/raça e município de procedência, 2020-2022.....	30
Tabela 2 - Frequência absoluta e relativa das principais comorbidades/fatores de risco relatados pelos indivíduos, 2020 - 2022.....	31
Tabela 3 - Detalhamento dos resultados obtidos através da realização dos testes RT-qPCR e do TR-Ag nas amostras de swab de nasofaringe, para os referentes períodos no qual as variantes B.1.1.28 e B.1.1.33, Delta e Ômicron estavam em maior circulação no Brasil, correlacionando com a sintomatologia.	34
Tabela 4 - Comparação da sensibilidade do TR-Ag nas amostras positivas pra RT-qPCR, correlacionando com a sintomatologia, junto aos respectivos intervalos de confiança de 95% (indicados entre parênteses).....	35

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ACE2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
CCS	Centro de Ciências da Saúde
cDNA	DNA complementar
CoV	Coronavírus
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
ETS	Escola Técnica de Saúde
EUA	<i>Emergency Use Authorization</i>
HULW	Hospital Universitário Lauro Wanderley
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GAL	Gerenciador de Ambiente Laboratorial
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
LACEN-PB	Laboratório Central de Saúde Pública da Paraíba
LAVIMAP	Laboratório de Vigilância Molecular Aplicada
LoDs	Limites de detecção
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RT-qPCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction real time</i>
SARS-CoV-2	Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
VBM	<i>Variants Being Monitored</i>
VOC	<i>Variants of Concern</i>
VOHC	<i>Variants of High Consequence</i>
VOI	<i>Variants of Interest</i>
TR-Ag	Teste rápido de antígeno

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	SARS-CoV-2: considerações iniciais quanto ao vírus e a pandemia	13
2.2	Classificações e definições das variantes do SARS-CoV-2	15
2.3	Curso da infecção pelo SARS-CoV-2 e sintomatologia	16
2.4	Métodos de diagnóstico da COVID-19	17
2.4.1	Biologia molecular	18
2.4.2	Testes sorológicos	20
2.5	Avaliação do desempenho e os possíveis fatores interferentes na qualidade dos ensaios de diagnóstico por TR-Ag	22
3	OBJETIVOS	23
3.1	Objetivo geral.....	23
3.2	Objetivos específicos.....	23
4	METODOLOGIA.....	24
4.1	Tipo de pesquisa	24
4.2	Local da pesquisa	24
4.3	População e amostra	24
4.4	Análises diagnósticas	26
4.5	Análise dos dados	27
4.6	Análise estatística	28
4.7	Aspectos éticos	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
6	CONCLUSÃO.....	39
	REFERÊNCIAS.....	40
	ANEXO A.....	46
	ANEXO B.....	47

1 INTRODUÇÃO

A COVID-19 é uma doença infecciosa causada por um vírus denominado Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2), um betacoronavírus que pertence à família *Coronaviridae*, cujo material genético é composto por ácido ribonucleico (RNA) de fita positiva com cerca de 30 kb de comprimento. A princípio, o vírus foi identificado em um surto de casos de pneumonia na cidade de Wuhan, na China, em dezembro de 2019 (Borges *et al.*, 2020; Cascella *et al.*, 2023).

Devido à grande velocidade em que o vírus se disseminou, em 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) caracterizou a situação como uma pandemia. Até o mês de outubro de 2023, já foram relatados mais de 771 milhões de casos confirmados da COVID-19 em todo o mundo, resultando em 6.960.783 óbitos (WHO, 2023). No Brasil, o primeiro caso da COVID-19 foi confirmado em 26 de fevereiro de 2020, na cidade de São Paulo — SP.

Altamente transmissível e contagiosa, a doença possui um espectro clínico variado, podendo se apresentar de forma assintomática ou evoluindo para quadros graves, levando inclusive ao óbito. O SARS-CoV-2 se replica no trato respiratório e sua propagação ocorre de uma pessoa infectada para outra, por meio da exposição a gotículas respiratórias que transportam o vírus (Cascella *et al.*, 2023).

Como outros vírus de RNA, o SARS-CoV-2, consegue se adaptar aos seus novos hospedeiros humanos por meio do processo de evolução genética ao desenvolver mutações, que podem se acumular, dando origem a variantes do vírus (Cascella *et al.*, 2023). Essas mutações fazem parte de um processo natural e evolutivo, que ocorre ao longo do tempo, e resulta em variantes mutantes que podem ter características diferentes de suas cepas ancestrais, e podem ser ainda mais letais e contagiosas (Farhud; Mojahed, 2022; Valverde, 2021).

Algumas mutações no vírus deram origem às variantes preocupantes e variantes de interesse, como a Alfa (linhagem B.1.1.7 e Q), Beta (B.1.351 e linhagens descendentes), Gama (P.1 e linhagens descendentes), Delta (B.1.617.2 e linhagens descendentes), Ômicron (linhagem BA.2.86, XBB.1.9.1, XBB.1.9.2, XBB.2.3, XBB.1.16, XBB.1.5, Capítulo 1.1, BA.2.74, B.1.1.529 e linhagens descendentes), entre outras

(Cascella *et al.*, 2023; CDC, 2023).

A partir do surgimento dos primeiros casos da doença e antes do desenvolvimento das vacinas, várias ações governamentais foram iniciadas com o intuito de minimizar a transmissão do vírus, reduzir o número de pessoas infectadas e dificultar a possibilidade de desenvolvimento de novas variantes (Nogueira; Silva, 2020).

Tais ações se basearam principalmente em estratégias para reforçar a importância das medidas de prevenção da transmissão do coronavírus. Além disso, o Ministério da Saúde (MS), incorporou a disseminação de informações e a comunicação com a população e a imprensa como pilares essenciais no combate à epidemia, além do incentivo a pesquisas (Oliveira *et al.*, 2020).

A principal medida de prevenção contra formas graves da COVID-19 é a vacina. A campanha de vacinação contra a COVID-19 foi iniciada em janeiro de 2021, e até outubro de 2023, já foram aplicadas 517.766.495 doses (Brasil, 2023c).

O diagnóstico laboratorial da doença ocorre principalmente por meio de testes moleculares e sorológicos. O reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR), é um teste molecular considerado padrão-ouro para detecção da COVID-19. Já os testes sorológicos, buscam detectar antígenos do vírus ou anticorpos específicos (IgM e/ou IgG) produzidos pela resposta imune do indivíduo a uma infecção prévia (Figueiredo; Paula, 2022; Nogueira; Silva, 2020).

Diversos fatores são discutidos na literatura como possíveis interferentes na taxa de detecção do vírus por meio de testes rápidos, como: tipo de amostra, estágio da infecção, carga viral, sintomatologia, qualidade da amostra e as condições de armazenamento e transporte (Begum *et al.*, 2022; Hagag *et al.*, 2022; Parvu *et al.*, 2021). Ainda, diversos estudos apontam que variantes do vírus SARS-CoV-2 podem levar a alterações na taxa de detecção em testes rápidos, dependendo de como essas variantes alteram a estrutura genética do vírus e como ele interage com os reagentes usados nos testes (Del Vecchio *et al.*, 2022; Hagag *et al.*, 2022).

Segundo informações disponibilizadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) e o *Emergency Use Authorization* (EUA), algumas mutações na variante Ômicron do SARS-CoV-2 (B.1.1.529) podem resultar em uma redução significativa da sensibilidade

em um alvo genético específico no gene N ou S, que abrange a região onde as mutações geralmente ocorrem.

Ademais, em outros estudos, aponta-se que os testes rápidos de antígeno para diagnosticar COVID-19 podem ser menos eficazes também para a variante Delta, uma vez que os limites de detecção (LoDs) de muitos testes de antígeno com autorização da FDA para uso emergencial foram estabelecidos com preparações que não incluem mutações no nucleocapsídeo existentes na variante (Stanley, 2022).

Assim, devido à alta quantidade de dispositivos de TR-Ag para SARS-CoV-2 encontrados mercado e o aumento exponencial de sua utilização para detectar a COVID-19, recomenda-se uma vigilância contínua do desempenho analítico destes dispositivos, a fim de garantir a qualidade diagnóstica na detecção do vírus. Ainda, espera-se com esta pesquisa, investigar e discutir quais os fatores que podem influenciar na alteração da taxa de detecção dos testes rápidos para a pesquisa de antígeno viral SARS-CoV-2, a fim de auxiliar na validação analítica e confiabilidade diagnóstica desses ensaios para garantir a precisão e exatidão no diagnóstico da doença.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 SARS-CoV-2: considerações iniciais quanto ao vírus e a pandemia

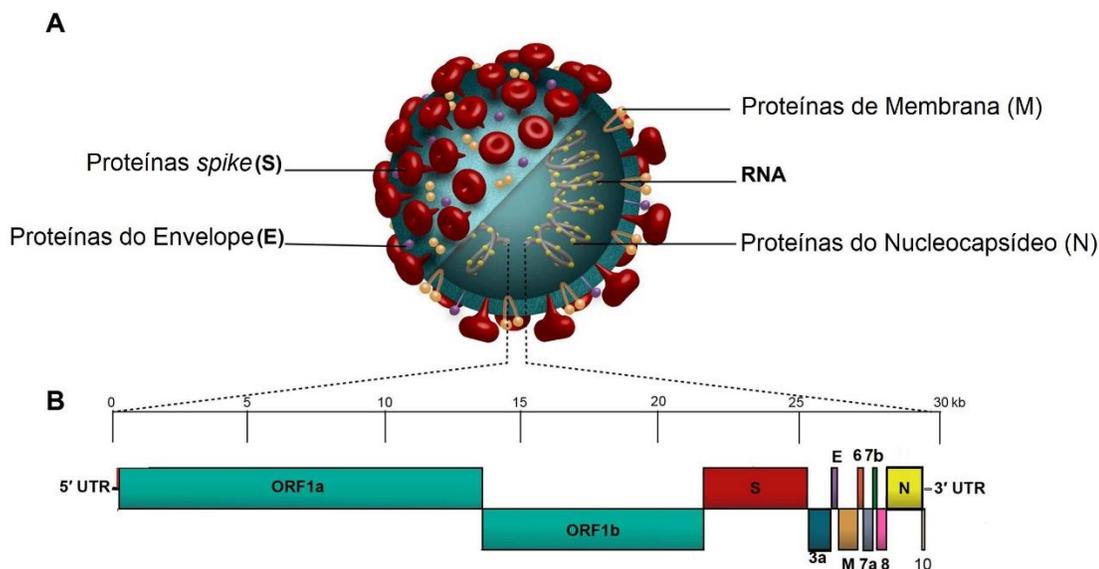
Os coronavírus (CoVs) são vírus envelopados que possuem ácido ribonucleico (RNA — do inglês *ribonucleic acid*) de fita positiva como seu material genético, possuindo cerca de 30 kb de comprimento. Assim, é um dos maiores vírus de RNA identificados até o momento (Casella *et al.*, 2023).

No final do mês de dezembro de 2019, surgiram relatos de casos de uma doença predominantemente respiratória, que se assemelhava a uma pneumonia altamente contagiosa, em Wuhan, província de Hubei, na China (Lana *et al.*, 2020). Logo, a doença se disseminou rapidamente em todo o mundo, e a partir de diversas investigações, descobriu-se tratar de uma doença viral, causada pelo coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2), sendo posteriormente denominada de doença de coronavírus 2019 (COVID-19) (Xavier *et al.*, 2020).

Filogeneticamente e taxonomicamente, o vírus SARS-CoV-2 teve sua classificação designada pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV — do inglês *International Committee on Taxonomy of Viruses*), como um vírus da espécie *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus*, pertencente ao gênero *Betacoronavirus*, subfamília *Coronavirinae*, família *Coronaviridae*, ordem *Nidovirales*, reino *Riboviria* (Xavier *et al.*, 2020).

Sua estrutura (Figura 1A) é composta pela proteína *spike* (S), responsável pela entrada do vírus nas células, ao se ligar ao receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) presente na superfície das células humanas, permitindo que o vírus seja endocitado pelas células e se reproduza; pela proteína de membrana (M), responsável por moldar a estrutura do vírus, e necessária para a formação do envelope viral; pela proteína de envoltório (E), essencial para a formação do envelope viral e na patogênese (Li *et al.*, 2020). Ainda, há a proteína do nucleocapsídeo (N), que está envolvida na síntese e tradução do RNA e na constituição do nucleocapsídeo viral propriamente dito (Borges *et al.*, 2020).

Figura 1 - Representação da estrutura e organização do genoma do SARS-CoV-2



Fonte: Adaptado de Rahimi, Mirzazadeh e Tavakolpour (2021).

Ademais, o genoma do RNA viral (Figura 1B) se inicia com uma *Cap* na extremidade 5', além de conter duas Regiões não traduzidas (UTRs) localizadas nas extremidades 5' e na cauda 3' poli (A). Imediatamente após a 5' UTR, encontram-se as *Open Reading Frames* (ORFs) 1a e 1b, que dão origem às poliproteínas pp1a e pp1ab. Essas poliproteínas são precursores de 16 proteínas não estruturais que desempenham um papel fundamental na transcrição e replicação do vírus (Kim *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020; Rahimi, Mirzazadeh e Tavakolpour, 2021).

Devido à grande velocidade em que o vírus se disseminou, em 2020, a OMS caracterizou o fenômeno como pandemia. Até outubro de 2023, os casos confirmados da COVID-19 ultrapassam mais de 771 milhões em todo o mundo, incluindo 6.960.783 óbitos notificados (WHO, 2023). Já no Brasil, segundo o painel de casos de doença pelo coronavírus 2019 (COVID-19) no Brasil gerado pelo MS, o número de casos confirmados da doença ultrapassa 37 milhões, tendo ocasionado mais de 706 mil óbitos (Brasil, 2023a).

2.2 Classificações e definições das variantes do SARS-CoV-2

Por ser um vírus cujo material genético é RNA, o SARS-CoV-2 possui uma maior capacidade de adaptação aos seus novos hospedeiros. Dessa forma, evoluem geneticamente por meio de mutações, a fim de garantir sua sobrevivência (Valverde, 2021). Essas mutações fazem parte de um processo natural e evolutivo, que ocorre ao longo do tempo e resulta em variantes mutantes que podem ter características diferentes de suas cepas ancestrais, e podem ser ainda mais letais e contagiosas (Farhud; Mojahed, 2022).

A OMS junto ao Grupo Interagências SARS-CoV-2 (SIG) dos EUA atualizou o seu sistema de classificação e definições de trabalho para variantes do SARS-CoV-2. Sendo assim, as variantes do vírus podem ser classificadas atualmente em: Variantes de Interesse (VOI — do inglês *variants of interest*), Variantes de Preocupação (VOC — do inglês *variants of concern*), Variantes de Alta Consequência (VOHC – do inglês *variants of high consequence*) ou Variantes em Monitoramento (VBM - do inglês *variants being monitored*) (PNCQ, 2023).

As VOCs geralmente apresentam como características principal, um aumento da transmissibilidade do vírus, assim como aumento da gravidade ou mudança na apresentação clínica da doença. Já as VOIs têm marcadores genéticos específicos que podem afetar a transmissão, o diagnóstico, a terapêutica ou o escape imunológico, além de um aumento previsto na transmissibilidade ou gravidade da doença (CDC, 2023).

A maioria das variantes é atualmente classificada como VBM, como a Alfa (linhagens B.1.1.7 e Q), Beta (linhagem B.1.351 e linhagens descendentes), Gama (P.1 e linhagens descendentes), Delta (B.1.617.2 e linhagens descendentes), Ômicron (linhagem BA.2.86, XBB.1.9.1, XBB.1.9.2, XBB.2.3, XBB.1.16, XBB.1.5, Capítulo 1.1, BA.2.74, B.1.1.529 e linhagens descendentes), entre outras (CDC, 2023).

As VBMs são linhagens com impacto potencial nas contramedidas médicas disponíveis com base na análise de dados de sequência genética, que anteriormente causaram doenças mais graves ou aumentaram a transmissão, mas que não são mais detectadas com uma alta frequência. Assim, também podem ser linhagens anteriormente designadas como VOI, VOC ou VOHC que atualmente circulam em níveis muito baixos.

Em cada linhagem ocorrem mutações no genoma viral, sendo a maioria delas na proteína *spike* (S) e algumas também no subdomínio chamado RBD (*Receptor Binding Domain*) localizado no domínio S1 da proteína S, além de mutações específicas no nucleocapsídeo (N) (Aleem *et al.*, 2023; Bayart *et al.*, 2022; Hagag *et al.*, 2022).

Na variante Delta do SARS-CoV-2, ressaltam-se as mutações L452R, T478K e P681R, que ocorrem na proteína S e estão associadas a um possível aumento na taxa de transmissão, bem como a uma maior capacidade de evasão do sistema imunológico ao comprometer a eficácia dos anticorpos neutralizantes (Aydogdu *et al.*, 2022). Já a variante B.1.1.529 (Ômicron) se destaca por conter mais de 30 alterações na sequência da proteína S. Entre as principais, estão as mutações N501Y e T478K, que se relacionada com um aumento na afinidade aos receptores ACE2 e nas propriedades de imunoescape (Aydogdu *et al.*, 2022).

2.3 Curso da infecção pelo SARS-CoV-2 e sintomatologia

O SARS-CoV-2 se replica no trato respiratório e sua propagação ocorre principalmente de uma pessoa infectada para outra, por meio da exposição a gotículas

respiratórias, carregadas com o vírus, que se espalham ao tossir ou espirrar (Brasil, 2021).

Altamente transmissível e contagiosa, a doença possui um espectro clínico variado, podendo se apresentar de forma assintomática, indivíduos com doença respiratória aguda (DRA) ou pacientes com pneumonia em diferentes níveis de gravidade (Lai *et al.*, 2020). Embora os principais efeitos da infecção pelo vírus sejam pulmonares, outros sistemas de órgãos importantes, como os do sistema gastrointestinal (GI), hepatobiliar, cardiovascular, renal e nervoso central também podem ser afetados (Cascella *et al.*, 2023).

Casos confirmados de COVID-19 já foram relatados em pessoas de diversas faixas etárias. Entretanto, é bastante relatado na literatura que indivíduos com mais de 60 anos de idade e aqueles com comorbidades (obesidade, doença cardiovascular, doença renal crônica, diabetes, doença pulmonar crônica, tabagismo, câncer, pacientes com órgãos sólidos ou transplantes de células-tronco hematopoiéticas) têm maior risco de desenvolver a forma grave da COVID-19 (Lai *et al.*, 2020).

Em geral, a infecção pelo SARS-CoV-2 apresenta três estágios, classificados conforme a evolução dos sintomas, auxiliando na determinação do método de diagnóstico laboratorial mais adequado. (Nogueira, 2020). O primeiro estágio é um período de incubação assintomática, em que o vírus pode ou não ser detectável. Essa fase dura entre 5 a 7 dias, e se inicia após a exposição ao vírus. O segundo estágio é o período sintomático não grave com presença de vírus, e ocorre de 5 a 14 dias após o início dos sintomas. O último estágio é sintomático respiratório grave com alta carga viral. Nesta fase, a carga viral é significativamente reduzida em comparação com as anteriores (Nogueira; Silva, 2020).

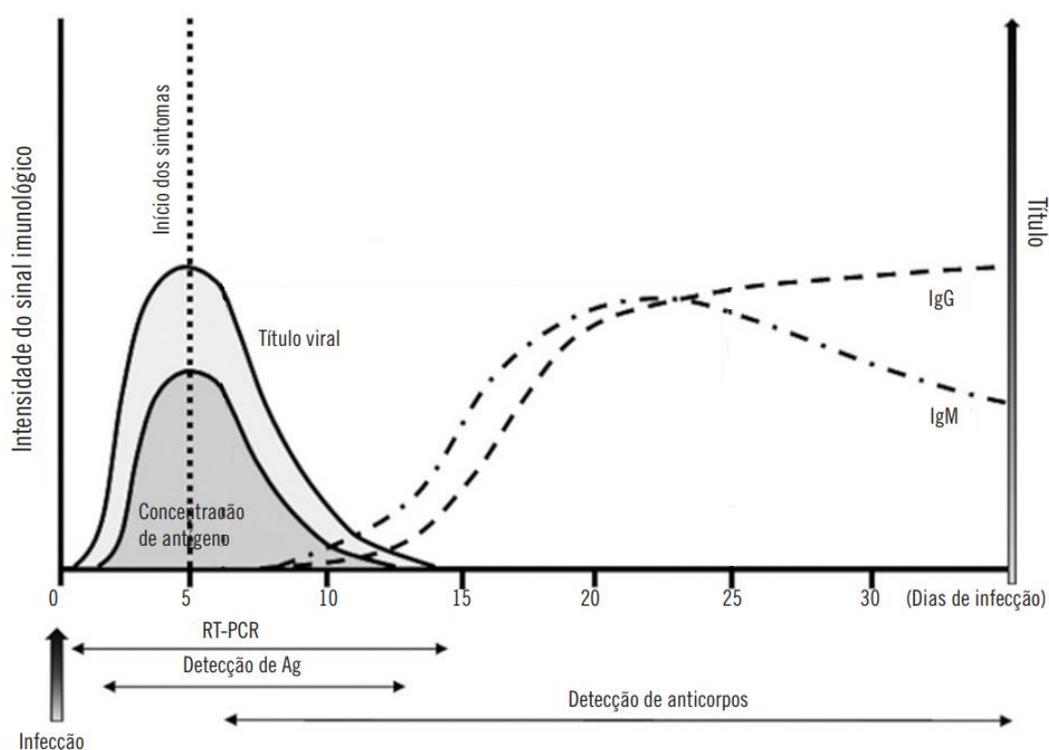
2.4 Métodos de diagnóstico da COVID-19

Segundo o Ministério da Saúde (2022a), o diagnóstico laboratorial da COVID-19 no Brasil ocorre principalmente por meio de testes de biologia molecular, como RT-qPCR e testes sorológicos, que utilizam da metodologia de imunocromatografia para detectar proteína(s) do vírus (antígenos) ou anticorpos IgM e IgG; e ensaios sorológicos, que

buscam detectar anticorpos IgM e/ou IgG produzidos pela resposta imunológica do indivíduo em relação ao vírus SARS-CoV-2.

Cada técnica de detecção laboratorial possui um intervalo de tempo ideal para ser realizado, conforme o estágio de infecção e da evolução dos sintomas (Figura 2), sendo fatores de grande relevância para garantir um diagnóstico assertivo (Nogueira; Silva, 2020).

Figura 2 - Evolução laboratorial da COVID-19 e correlação entre o desenvolvimento da carga viral durante a infecção pelo SARS-CoV-2



Fonte: Adaptado de Sethuraman *et al.* (2020); Xavier *et al.* (2020).

RT-qPCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real; IgM: imunoglobulina classe M; IgG: imunoglobulina classe G; Ag: antígeno.

2.4.1 Biologia molecular

A reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR), é um teste molecular considerado pela OMS como padrão-ouro para a identificação do SARS-CoV-2.

A metodologia se baseia inicialmente na conversão do RNA viral em DNA complementar (cDNA) através da ação da enzima Transcriptase Reversa. Após regiões específicas do genoma viral são amplificadas através da ação da enzima Taq DNA polimerase, a fim de multiplicar seletivamente o fragmento do gene desejado. Dessa forma, é possível identificar o RNA do vírus através da análise do material genético de amostras de sangue ou de secreções das vias respiratórias coletadas dos indivíduos testados (Rong *et al.*, 2022).

Diferentes fabricantes utilizam uma variedade de alvos de genes de RNA, entretanto, a maioria dos testes é direcionada a um ou mais genes específicos, envelope (E), nucleocapsídeo (N), spike (S), polimerase de RNA dependente de RNA (RdRp) e ORF (Li *et al.*, 2020; Yong *et al.*, 2020).

Ao submeter a amostra de um paciente ao RT-qPCR, o resultado da amplificação é determinado pelo limiar do ciclo (Ct – do inglês *Cycle Threshold*), que corresponde ao número de ciclos de replicação necessários para produzir um sinal fluorescente. Assim, valores mais baixos de Ct representam cargas mais altas de RNA viral presente na amostra (Sethuraman *et al.*, 2020).

Segundo a nota técnica disponibilizada pela Fiocruz (2020), a RT-qPCR é uma técnica muito sensível e específica que pode ser realizada de forma confiável para o diagnóstico de pacientes sintomáticos na fase aguda, período que compreende o 3º e 7º dia da doença, preferencialmente, por ser neste período em que haverá maior carga viral. Entretanto, o método apresenta alta eficácia de detecção, podendo ser utilizado para confirmar a doença até 14º dia do início dos sintomas, para pacientes graves (Brasil, 2022b).

Embora seja um método altamente sensível e específico para detectar o RNA viral da COVID-19 e tenha sido amplamente utilizada no início da pandemia devido à sua alta sensibilidade e especificidade, o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e a evolução do entendimento da doença levaram a uma diversificação de abordagens diagnósticas para a COVID-19 (Chen *et al.*, 2021).

Vários fatores influenciaram para o desuso do método para diagnóstico clínico da COVID-19. Primeiramente, a RT-qPCR é um método laboratorial complexo e caro que requer equipamentos especializados e pessoal treinado. Isso dificulta a realização em

larga escala, especialmente em regiões com recursos limitados. Além disso, a RT-qPCR requer laboratórios equipados com as condições adequadas para processar as amostras e interpretar os resultados (Lima *et al.*, 2020).

2.4.2 Testes sorológicos

Com o avanço da pandemia, foram desenvolvidos testes sorológicos que podem fornecer resultados confiáveis e em menos tempo. Esses testes são mais convenientes e podem ser usados para triagem em massa ou para obter resultados rápidos em ambientes com recursos limitados (Brasil, 2021).

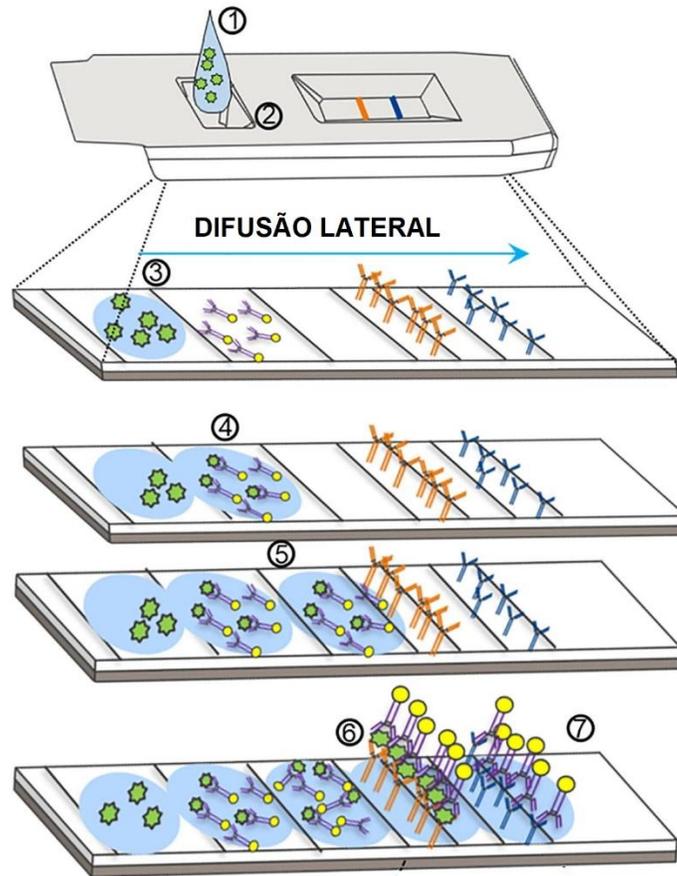
Os testes sorológicos de SARS-CoV-2 buscam detectar, respectivamente, anticorpos específicos (IgM e/ou IgG) produzidos pela resposta imune do indivíduo contra o vírus SARS-CoV-2 ou detectar antígenos desse vírus. Em geral, os testes rápidos de antígeno (TR-Ag) utilizam o princípio de imunodeteção do tipo sanduíche, que usa um formato de teste de fluxo lateral, como representado na Figura 3 (Parvu *et al.*, 2021). Assim, a metodologia para detecção usualmente empregada nestes testes se baseia na ativação de anticorpos anti-SARS-CoV-2 pelos antígenos virais presentes na amostra testada (Sousa *et al.*, 2022).

A interpretação do resultado do TR-Ag ocorre através da observação da formação de duas linhas visíveis, independente da intensidade da reação, nos campos “T” (teste) e “C” (controle) da membrada, onde este último parâmetro (“C”), serve como um parâmetro de controle de qualidade para garantir que o dispositivo está válido e agindo corretamente (Parvu *et al.*, 2021; Somborac Bačura *et al.*, 2021)

No caso do SARS-CoV-2, a proteína N é frequentemente adotada como analito alvo devido aos seus níveis de expressão no estágio inicial e porque exibe a menor quantidade de variação. Portanto, conseguem detectar e/ou quantificar a presença, ou ausência de uma substância alvo em uma amostra (Kim *et al.*, 2023).

Apesar destes testes serem práticos para a testagem de rotina em saúde, eles podem apresentar menor sensibilidade e especificidade, ao se comparar com os testes moleculares, especialmente no início da infecção ou após um longo período (Nogueira; Silva, 2020).

Figura 3- Mecanismo de detecção de antígeno do SARS-CoV-2 por TR-Ag



Fonte: Parvu *et al.* (2021).

(1) A amostra contendo os Ag do SARS-CoV-2 suspenso em tampão de extração é depositada no poço de amostra no dispositivo teste (em 2). (3) A solução/Analito, que contém o antígeno do vírus percorre o dispositivo por difusão lateral, até reagirem com reagente com os anticorpos monoclonais anti-SARS-CoV-2 conjugados com as partículas coloridas, formando um complexo antígeno-anticorpo (4). (5) O complexo antígeno-anticorpo migra por ação capilar através da membrana de nitrocelulose até a linha de teste, onde são capturados pelos anticorpos monoclonais de camundongo anti-SARS-CoV-2, formando um completo complexo anticorpo-antígeno-anticorpo (em 6), levando a formação de uma linha colorida na janela de teste se antígenos de SARS-CoV-2 estiverem presentes na amostra. (7) A linha de controle do dispositivo é pré-revestida com anticorpos monoclonais de camundongo, utilizada como indicativo de controle de qualidade do teste.

Mutações específicas no nucleocapsídeo, como as existentes na linhagem B.1.1.529 (Ômicron), além de estarem relacionadas com o aumento na replicação do vírus e a patogênese da doença, são especialmente associadas à alterações que podem afetar a precisão de alguns testes de antígeno (Johnson *et al.*, 2022; Thakur *et al.*, 2022).

Os testes rápidos de antígeno podem ser utilizados para o diagnóstico ainda durante a fase aguda da doença, preferencialmente até o 7º dia após início dos sintomas, aproximadamente. Já os testes rápidos de pesquisa de anticorpos, devem ser utilizados após um período superior a oito dias do início dos sintomas, visto que fornecem apenas um diagnóstico mais tardio (Brasil, 2022b, Fiocruz, 2020; Lima *et al.*, 2021).

No entanto, esta metodologia possui algumas limitações importantes, como a sensibilidade reduzida, em relação com o RT-qPCR. Ademais, a carga viral presente na amostra do paciente também pode diminuir ao longo do tempo, levando a resultados falsos negativos em casos de infecção recente ou em estágios avançados da doença (Kim *et al.*, 2022).

2.5 Avaliação do desempenho e os possíveis fatores interferentes na qualidade dos ensaios de diagnóstico por TR-Ag

Diversos fatores são considerados para determinar se um TR-Ag para diagnóstico da COVID-19 é confiável. No Brasil, o órgão competente que avalia os parâmetros necessários para atestar a validação de um teste é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa).

Para que um teste de diagnóstico seja eficaz, é fundamental apresentar alta sensibilidade e especificidade, para diminuir as taxas de falsos-positivos e fornecer segurança ao distinguir corretamente os indivíduos verdadeiramente saudáveis ou que estejam doentes (Brasil, 2010). Sendo assim, a sensibilidade de um teste é um indicador que pode ser conceituado como a capacidade que o teste apresenta de detectar corretamente os indivíduos verdadeiramente positivos, ou seja, diagnosticar os indivíduos que estejam doentes. Já a especificidade, é definida como a capacidade que o mesmo teste tem, em detectar os indivíduos que estejam saudáveis, sendo considerados os verdadeiros-negativos (Verotti *et al.*, 2020).

A carga viral da amostra, local e metodologia de coleta, tempo decorrido de sintomas e variantes do vírus são fatores importantes que podem afetar o desempenho medido dos testes de antígeno SARS-CoV-2, influenciando diretamente nas taxas de sensibilidade e especificidade dos testes (Parvu *et al.*, 2021).

A taxa de detecção dos TR-Ag pode variar dependendo da fase da infecção.

Alguns testes podem ser mais eficazes na detecção do vírus durante os estágios iniciais da infecção, quando a carga viral é alta. No entanto, à medida que a infecção progride e a carga viral diminui, a sensibilidade do teste pode diminuir levando a resultados falsos negativos (Kim *et al.*, 2022).

Para Begum *et al.* (2022), a carga viral é considerada um dos fatores mais importantes para determinar a sensibilidade do teste de antígeno SARS-CoV-2, e para a maioria dos TR-Ag o melhor desempenho, ao se considerar a sensibilidade dos testes, ocorre para valores de Ct mais baixos ($Ct \leq 30$).

Ainda, alterações estruturais decorrentes de mutações (variantes do SARS-CoV-2) no nucleocapsídeo do vírus também podem levar à redução na taxa de sensibilidade dos testes rápidos (Bayart *et al.*, 2022). Informações disponibilizadas pela *Food and Drug Administration (FDA) Emergency Use Authorization (EUA)* correlacionam que alguns tipos de mutações na variante Ômicron do SARS-CoV-2 (B.1.1.529) podem resultar em uma redução significativa da sensibilidade em um alvo genético específico no gene N ou S, que abrange a região onde as mutações geralmente ocorrem.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Comparar a metodologia do teste imunocromatográfico para pesquisa de antígeno viral do SARS-CoV-2 com o RT-qPCR em amostras coletadas em períodos no qual diferentes variantes do vírus circulavam.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar o perfil epidemiológico e sociodemográfico da população-alvo selecionada, cujas amostras foram testadas;
- Comparar o desempenho do TR-Ag para SARS-CoV-2 frente ao teste molecular RT-qPCR, em amostras coletadas em períodos no qual diferentes variantes do vírus circulavam;

- Investigar e descrever sobre os fatores que podem influenciar na qualidade dos testes, taxa de detecção e na confiabilidade/validação dos resultados obtidos através da testagem pelo TR-Ag.

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de pesquisa

Trata-se de um estudo experimental laboratorial, epidemiológico, transversal, descritivo e retrospectivo, de abordagem quantitativa.

4.2 Local da pesquisa

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Vigilância Molecular Aplicada (LAVIMAP) da Escola Técnica de Saúde (ETS) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFPB, visto que, lá continham todos os equipamentos e infraestrutura necessária. Além disso, os insumos utilizados para realização das análises foram fornecidos pelo Laboratório Central de Saúde Pública da Paraíba (LACEN-PB) e pelo HULW.

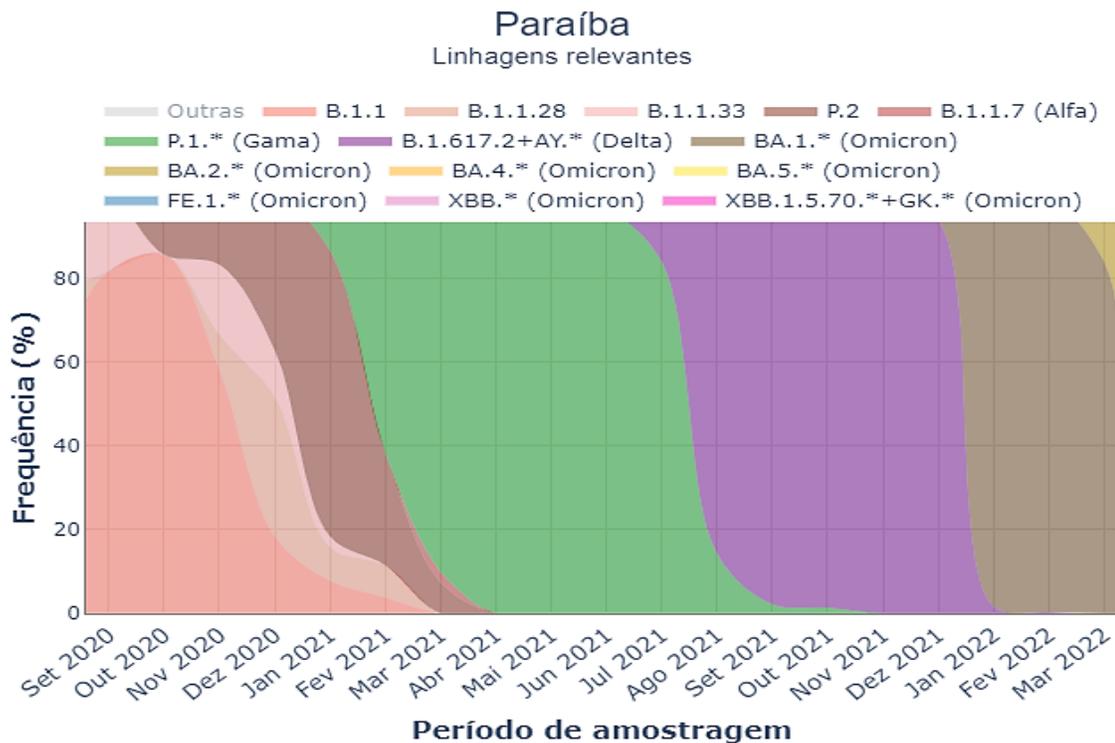
4.3 População e amostra

Foram utilizadas amostras de secreção de nasofaringe, coletadas de profissionais de saúde e pacientes do HULW que apresentavam sintomas gripais suspeitos de infecção pelo SARS-CoV-2, como: tosse, dor de garganta, cefaleia, distúrbios olfativos ou distúrbios gustativos, febre e dispneia.

Ao todo, 180 amostras foram selecionadas entre as amostras disponíveis no LAVIMAP, que haviam sido coletadas durante diferentes intervalos de tempo, a fim de avaliar se diferentes linhagens do vírus poderiam influenciar na taxa de detecção do teste rápido para pesquisa de antígeno viral. Dessa forma, procedeu-se com uma subdivisão, resultando na seleção de 60 amostras de 2020, 60 amostras de 2021 e 60 amostras de 2022.

A escolha do período de coleta das amostras foi determinada com base em uma análise dos painéis desenvolvidos pela Rede Genômica Fiocruz (2023), que conduzem estudos epidemiológicos relacionados à vigilância genômica do SARS-CoV-2, cujos resultados são apresentados em gráficos, tabelas e mapas (Brasil, 2023b). Assim sendo, buscou-se investigar os períodos em que as linhagens B.1.1.28 e a B.1.1.33, Delta e Ômicron estavam circulando em maior frequência no estado da Paraíba, representado na Figura 4.

Figura 4 - Frequência das principais linhagens do SARS-CoV-2 no estado da Paraíba pelo período de amostragem selecionado



Fonte: Adaptado de Fiocruz (2023).

Após a coleta, as amostras foram posteriormente cadastradas no Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL) (Anexo A) e encaminhadas para o LAVIMAP para realização dos testes em parceria com o LACEN-PB.

4.4 Análises diagnósticas

As amostras de *swab* nasofaríngeo dos indivíduos sob suspeita de COVID-19 eram coletadas e, posteriormente, encaminhadas ao LAVIMAP, acompanhadas das fichas de requisição do GAL e ficha de notificação de caso suspeito (Anexo B), fornecidas pelo Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde para serem submetidas ao teste de RT-qPCR (padrão-ouro), como protocolo padrão para detecção da presença do vírus no laboratório.

Para realização do método molecular de detecção, as amostras eram submetidas ao processo de extração do RNA viral para detecção do SARS-CoV-2. Dessa forma, seguiu-se criteriosamente os protocolos estabelecidos pelos fabricantes dos kits “*AllPrep PowerViral DNA/RNA*” da empresa Qiagen®, “*EXTRACTA® KIT FAST – DNA e RNA Viral (MVXA-PU96-B FAST C)*” da Locus® e “*Virus RNA+DNA Preparation Kit*” da empresa Cellco®, kits utilizados pelo laboratório como protocolos de extração de RNA viral. Ao final de cada extração, o RNA Viral é eluído em Tampão TE pH 8,0 e armazenado em freezer -70 °C até a realização do RT-qPCR. Parte do volume inicial das amostras de *swab* nasofaríngeo também foram transferidas para o meio de transporte viral (MTV – meio rosa) e armazenadas em freezer -70 °C, para realização de novas análises.

Para a detecção e quantificação do SARS-CoV-2 por RT-qPCR foram utilizados o kit molecular SARS-CoV-2 (E/RP) desenvolvido pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - BioManguinhos/Fiocruz® e o kit “*Allplex™ SARS-CoV-2 Assay®*”. Para realização do procedimento, foi utilizado todo o protocolo estabelecido pelas respectivas empresas. O RT-qPCR em tempo real foi realizado em um equipamento do modelo Quantstudio® 3 (Thermo Scientific®, Waltham, MA, EUA) disponível no LAVIMAP da ETS da UFPB.

Após, prosseguiu-se com a realização do teste rápido de antígeno e posterior comparação dos resultados. Assim sendo, para a pesquisa de antígeno através de teste rápido, foi utilizado o kit “*COVID-19 Ag ECO Teste*” da empresa Eco Diagnostica Ltda®. Trata-se de um método imunocromatográfico para detecção qualitativa específica de antígenos de SARS-CoV-2 em amostras de *swab* de nasofaringe.

Dessa forma, as amostras de *swab* nasofaríngeo, conservadas em meio de transporte viral e armazenadas no freezer $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, foram completamente descongeladas à temperatura ambiente, por cerca de 40 minutos, e homogeneizadas em seguida. Logo após, com o auxílio de uma pipeta, foram aspirados $60\text{ }\mu\text{L}$ da amostra e dispensados verticalmente no poço de amostra do dispositivo teste.

Para observação dos resultados, aguardou-se o período de 10 - 15 minutos, seguindo as recomendações disponibilizadas pela própria empresa, e realizou-se a leitura dos resultados.

4.5 Análise dos dados

A princípio, foi realizado um levantamento dos dados sociodemográficos dos indivíduos testados para COVID-19. Dessa forma, foram analisadas as variáveis (I) sexo: feminino e masculino; (II) faixa etária, categorizada em: 0 à 19 anos, 20 à 39 anos, 40 à 59 anos e 60 anos ou mais; (III) raça/cor, categorizada em: brancos, pardos, pretos, amarelo, indígenas e não informado/ignorado; e (IV) local de procedência, categorizado em: João Pessoa, Cabedelo, Bayeux, Patos e Mari.

Subsequentemente, realizou-se um levantamento dos principais sintomas apresentados, e a presença de comorbidades levantadas através das fichas de notificação e fichas de requisição do GAL. Assim como as datas referentes ao início dos sintomas, coleta da amostra, recebimento de amostra, data e protocolo de extração, data e protocolo de RT-qPCR, e os resultados, levantados através das fichas de atendimento do HULW. Todos esses dados foram organizados e tabulados em uma planilha pelo Microsoft Excel®. Para analisar estatisticamente as amostras foram utilizadas estatísticas descritivas (com apresentação de frequências absolutas e percentuais) e técnicas analíticas.

Entre as variáveis investigadas, se destaca também o Ct que tem relação inversamente proporcional à quantidade de sequência alvo presente na amostra. Os valores de Ct obtidos foram essenciais para estabelecer uma relação entre a especificidade e sensibilidade entre os resultados da PCR e da pesquisa de antígeno por meio do teste rápido.

4.6 Análise estatística

Considerando especialmente o tempo de sintomas, os valores de Ct e os resultados obtidos após a realização da RT-qPCR e do teste rápido em associação com os referentes às linhagens virais das amostras, foi realizado um estudo estatístico para avaliar a viabilidade do teste rápido utilizado. Assim, foi realizado um estudo para avaliar quais desses fatores podem, de fato, influenciar na redução da taxa de detecção do teste rápido em comparação com a RT-qPCR e quais mecanismos estão relacionados para haver essa redução do desempenho dos testes rápidos.

Assim, foram utilizados critérios e fórmulas estatísticas adequadas, para calcular as variações de especificidade e sensibilidade, como: valores absolutos e relativos de resultados falso-positivos, falso-negativos, verdadeiros-positivos e verdadeiros-negativo.

As variações de sensibilidade foram calculadas a partir da proporção de amostras qualificadas como positivas pelo teste rápido de antígeno, inicialmente categorizadas como positivas por RT-qPCR. A especificidade foi calculada como a proporção de indivíduos com teste negativo na população em estudo, que tenham sido categorizados com resultado negativo por RT-qPCR.

O cálculo da sensibilidade, especificidade e precisão do teste rápido de antígeno foi realizado a partir do software estatístico online MedCalc®, que utiliza a fórmula $\frac{a}{a + c} \times 100 (\%)$ para o cálculo da Sensibilidade diagnóstica e $\frac{d}{b + d} \times 100 (\%)$ para o cálculo da especificidade, com intervalo de confiança = 95%. Onde “a” = verdadeiro positivo, definido pelo número de indivíduos com resultado positivo para RT-qPCR; “b” = falso-positivo, referente ao número de indivíduos com resultado reagente para o TR-Ag, mas negativo no RT-qPCR; “c” = falso-negativo, relativo aos resultados positivos no RT-qPCR, mas não reagentes para o TR-Ag e “d” = verdadeiro-negativo, pertinente aos resultados negativos para RT-qPCR e não reagentes para o TR-Ag. Posteriormente, esses dados foram analisados utilizando o software Microsoft Excel® para desenvolver a elaboração das tabelas e gráficos.

4.7 Aspectos éticos

A pesquisa fez parte de um projeto maior, intitulado Vigilância epidemiológica e molecular para detecção de SARS-CoV-2 (COVID-19) e outros vírus respiratórios nas macrorregionais do Estado da Paraíba, coordenado pelo Professor Doutor João Felipe Bezerra da UFPB, e submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do CCS obedecendo aos aspectos éticos do Conselho Nacional de Saúde. O projeto foi aceito por meio do registro de Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE), de número: 40402820.40000.5188. Além disso, os resultados dos procedimentos aplicados são confidenciais e serão divulgados apenas em meio científico sem identificação do sujeito do estudo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A princípio, foram selecionadas 60 amostras referentes ao período de setembro à novembro de 2020, onde as linhagens de SARS-CoV-2 mais frequentes em circulação no Brasil eram a B.1.1.28 e a B.1.1.33, representando juntas um percentual de frequência de aproximadamente 87% das detecções; 60 amostras referentes ao período de setembro à novembro de 2021, onde a principal linhagem circulante de SARS-CoV-2 no Brasil era a B.1.617.2 (variante Delta), com 97,8% a 100% das detecções; e 60 amostras detectadas durante o período de janeiro à março de 2022, no qual a principal linhagem circulante de SARS-CoV-2 no Brasil era a BA.1 ou B.1.1.529 (sublinhagem 'padrão' da variante Ômicron), apresentada em uma frequência que variou entre 84,1% e 98,5% das detecções.

Em seguida, buscou-se identificar as características sociodemográficas dos casos suspeitos e/ou confirmados de COVID-19 analisados na pesquisa. Tais características foram ordenadas conforme o ano correspondente das amostras analisadas.

Entre os três anos em que as amostras foram coletadas (2020, 2021 e 2022), percebe-se uma distribuição composta predominantemente de pessoas do sexo feminino (73%, 65,0% e 68,3%, respectivamente). No que se refere à faixa etária, no presente estudo, o grupo de 40 a 59 anos representou o maior percentual entre os casos investigados (50,0% em 2020, 45,0% em 2021 e 50,0% em 2022). Acerca da cor/raça

referida pelos indivíduos, os maiores percentuais observados eram de pessoas pardas (53,3% em 2020, 36,7% em 2021 e 51,7% em 2022). Ademais, quanto ao local de procedência, observou-se que a maioria dos indivíduos era do município de João Pessoa-PB (73,3% em 2020, 58,3% em 2021 e 71,7% em 2022), conforme a Tabela 1.

Tabela 1 - Caracterização indivíduos segundo sexo, faixa etária, cor/raça e município de procedência, 2020-2022.

Características Sociodemográficas	2020 (n=60)		2021 (n=60)		2022 (n=60)	
	n	%	n	%	n	%
Sexo						
Feminino	44	73,3%	39	65,0%	41	68,3%
Masculino	16	26,7%	21	35,0%	19	31,7%
Faixa Etária (anos)						
0 – 19 anos	1	1,7%	6	10,0%	1	1,7%
20 – 39 anos	24	40,0%	19	31,7%	23	28,3%
40 – 59 anos	30	50,0%	27	45,0%	30	50,0%
≥ 60 anos	5	8,3%	8	13,3%	6	10,0%
Cor/Raça						
Pardo (a)	32	53,3%	22	36,7%	31	51,7%
Branco (a)	15	25,0%	15	25,0%	15	25,0%
Amarelo (a)	10	16,7%	17	28,3%	9	15,0%
Preto (a)	1	1,7%	1	1,7%	3	5,0%
Não informado/Ignorado	2	3,3%	5	8,3%	2	3,3%
Local de Procedência						
João Pessoa – PB	44	73,3%	35	58,3%	43	71,7%
Itapororoca – PB	2	3,3%	0	0,0%	2	3,3%
Patos - PB	0	0,0%	3	5,0%	0	0,0%
Bayeux – PB	1	1,7%	3	5,0%	1	1,7%
Cabedelo – PB	1	1,7%	2	3,3%	1	1,7%
Outros municípios	12	20,0%	17	28,4%	13	21,6%

Fonte: Dados da pesquisa (2020-2022).

Adicionalmente, também foi analisada a existência de comorbidades autorreferidas pelos indivíduos cujas amostras foram testadas para COVID-19. Tais fatores estão listados na Tabela 2, separados pela frequência nas populações dos anos estudados, em que se destacam principalmente as doenças cardíacas/cardiovasculares

crônicas, presentes em uma frequência de 10% dos indivíduos tanto em 2020 quanto em 2022 e em 5,0% dos indivíduos em 2021, além da *Diabetes mellitus*, presente na mesma frequência neste mesmo ano.

Tabela 2 - Frequência absoluta e relativa das principais comorbidades/fatores de risco relatados pelos indivíduos, 2020 - 2022.

Comorbidades/ Fatores de Risco	2020 (n=60)		2021 (n=60)		2022 (n=60)	
	n	%	n	%	n	%
Diabetes mellitus	2	3,3%	3	5,0%	1	1,7%
Doenças cardíacas/ cardiovasculares crônicas	6	10,0%	3	5,0%	6	10,0%
Doença hematológica crônica	0	0,0%	1	1,7%	0	0,0%
Doença Renal Crônica	1	1,7%	1	1,7%	0	0,0%
Doenças respiratórias crônicas descompensadas	0	0,0%	1	1,7%	1	1,7%
Esclerose amiotrófica lateral	1	1,7%	0	0,0%	0	0,0%
Gestantes	0	0,0%	1	1,7%	1	1,7%
Imunodeficiência/ Imunodepressão	1	1,7%	2	3,3%	0	0,0%
Obesidade	1	1,7%	2	3,3%	1	1,7%
Pneumopatia Crônica	1	1,7%	1	1,7%	0	0,0%
Puérpera	1	1,7%	0	0,0%	0	0,0%

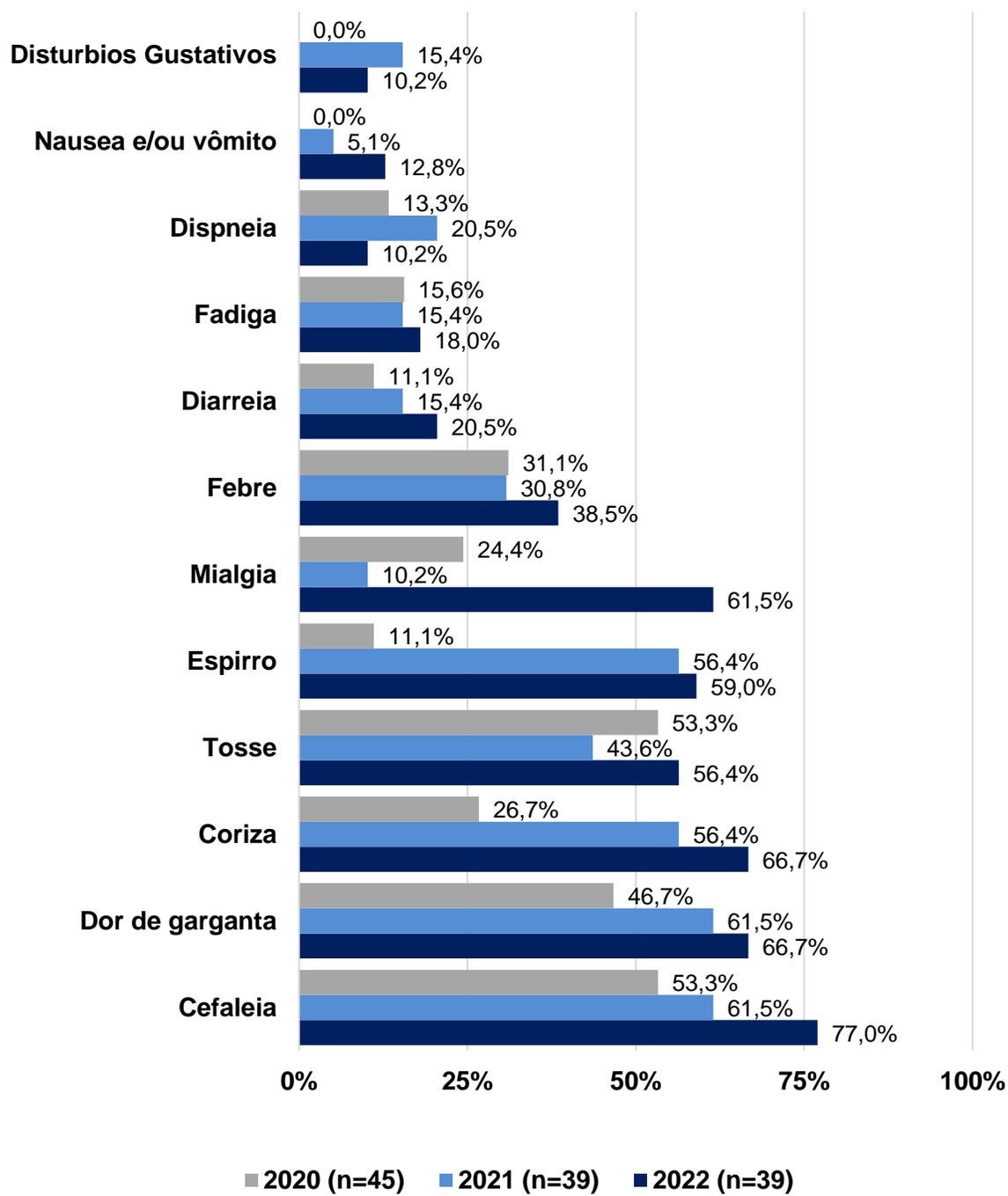
Fonte: Dados da pesquisa (2020 – 2022).

No estudo conduzido por Costa *et al.* (2020), é reportado que indivíduos que apresentam fatores de risco cardiovasculares, juntamente com aqueles portadores de doenças cardiovasculares, enfrentam um maior risco de desenvolver a forma grave da doença, além de complicações cardiovasculares, sendo considerado um grupo de risco.

Subsequentemente, foi realizado um levantamento dos principais sintomas relatados pelos pacientes que estavam sob suspeita de infecção do SARS-CoV-2. Dessa forma, dentre os principais sintomas relatados na população estudada, destacaram-se: Cefaleia, Dor de Garganta e Coriza, Tosse e Espirro. Ademais, vale ressaltar que mais de 90% dos casos sintomáticos se trataram de indivíduos que apresentavam mais de um

sintoma, concomitantemente. Os resultados podem ser observados com maiores detalhes na Figura 5.

Figura 5 - Percentual dos sintomas relacionados com COVID-19 relatados pelos indivíduos, 2020-2022



Fonte: Dados da pesquisa (2020-2022).

Posteriormente, todas as 180 amostras foram submetidas ao teste rápido de antígeno, a fim de avaliar as alterações na taxa de detecção, e por consequência, na sensibilidade do teste. Os resultados obtidos foram avaliados e comparados, levando em consideração os possíveis fatores interferentes: associação com variantes do vírus que estavam em maior circulação no Brasil durante os períodos selecionados em que as amostras foram coletadas, presença ou ausência de sintomatologia e a carga viral da amostra (estimada através dos valores de Ct indicados durante o RT-qPCR).

Na primeira análise, avaliou-se de forma abrangente as diferenças na detecção entre as amostras obtidas nos períodos em que as variantes selecionadas para este estudo estavam em maior circulação no Brasil (B.1.1.28 e a B.1.1.33, Delta, Ômicron), conforme o período em que as amostras foram coletadas. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3, em que foi realizada uma comparação entre os indivíduos sintomáticos e assintomáticos, simultaneamente.

Assim, observou-se que entre os 60 indivíduos suspeitos de COVID-19 testados entre setembro e novembro de 2020, cuja variante em maior circulação no Brasil correspondeu à B.1.1.28 e a B.1.1.33, 38,3% (n=23) apresentaram o teste de RT-qPCR positivo. Destes, 20 eram pacientes que relataram sintomas. Ao submeter às amostras ao TR-Ag, verificou-se que 26,7% (n=16) dos casos investigados previamente positivos para RT-qPCR, tiveram resultado reagente, e em sua maioria (n=15), eram indivíduos sintomáticos. Dessa forma, 11,7% (n=7) indivíduos testaram reagentes no RT-qPCR, mas não reagiram no TR-Ag, causando resultados falso-negativos.

Em contrapartida, das 60 amostras referentes ao segundo período amostral (setembro a novembro de 2021), onde a principal linhagem circulante de SARS-CoV-2 no Brasil era B.1.617.2 (variante Delta), 32 (53,3%) testaram positivo para RT-qPCR. Destes, em apenas 11 (18,3%) testaram positivo também para o TR-Ag, sendo a maioria, composta por indivíduos sintomáticos (n=10). Dessa forma, houve um percentual maior de resultados falso-negativos (35,0%), em comparação ao primeiro ano/primeira variante.

De forma semelhante, entre as das 60 amostras referentes ao terceiro período amostral (janeiro à março de 2022), em que a principal linhagem circulante de SARS-CoV-2 no Brasil era a B.1.1.529 (variante Ômicron), 35 (58,3%) testaram positivo para RT-qPCR. Deste número, 25,0% (n=15) foi o valor representativo de resultados falso-

negativos. Além disso, o percentual de indivíduos verdadeiro-positivos (RT-qPCR⁺ e TR-Ag⁺) foi de 33,3% (n=20), onde 17 eram indivíduos que apresentaram um ou mais sintomas.

Tabela 3 - Detalhamento dos resultados obtidos através da realização dos testes RT-qPCR e do TR-Ag nas amostras de *swab* de nasofaringe, para os referentes períodos no qual as variantes B.1.1.28 e B.1.1.33, Delta e Ômicron estavam em maior circulação no Brasil, correlacionando com a sintomatologia.

COVID-19 TR-Ag x Padrão ouro de Diagnóstico Laboratorial (RT-qPCR)					
Variante em maior circulação no Brasil (Ano)	População	RT-qPCR Negativo		RT-qPCR Positivo	
		RT-qPCR Negativo e Teste de Antígeno Não Reagente	RT-qPCR Negativo e Teste de Antígeno Reagente	RT-qPCR Positivo e Teste de antígeno reagente	RT-qPCR Positivo e Teste de Antígeno Não Reagente
B.1.1.28 e B.1.1.33/ (2020)	Total de Sintomáticos e Assintomáticos (n=60)	61,7% (n=37)	0	26,7% (n=16)	11,6% (n=7)
	Apenas sintomáticos (n=45)	41,7% (n=25)	0	25% (n=15)	8,3% (n=5)
	Apenas Assintomáticos (n=15)	20% (n=12)	0	1,7% (n=1)	3,3% (n=2)
Delta/ (2021)	Total de Sintomáticos e Assintomáticos (n=60)	46,7% (n=28)	0	18,3% (n=11)	35,0% (n=21)
	Apenas sintomáticos (n=39)	20,5% (n=8)	0	25,6% (n=10)	53,9% (n=21)
	Apenas Assintomáticos (n=21)	95,2% (n=20)	0	4,8% (n=1)	0
Ômicron/ (2022)	Total de Sintomáticos e Assintomáticos (n=60)	41,7% (n=25)	0	33,3% (n=20)	25,0% (n=15)
	Apenas sintomáticos (n=39)	28,2% (n=11)	0	43,6% (n=17)	28,2% (n=11)
	Apenas Assintomáticos (n=21)	66,7% (n=14)	0	14,3% (n=3)	19,0% (n=4)

Fonte: Dados da pesquisa (2020-2022).

A partir da obtenção destes dados iniciais, prosseguiu-se com o cálculo geral da sensibilidade e especificidade do TR-Ag, com intervalo de confiança de 95%, para os períodos selecionados no qual as respectivas variantes estavam em maior circulação no Brasil (Tabela 4).

Tabela 4 - Comparação da sensibilidade do TR-Ag nas amostras positivas pra RT-qPCR, correlacionando com a sintomatologia, junto aos respectivos intervalos de confiança de 95% (indicados entre parênteses).

Variante em maior circulação no Brasil (ano)	População	Sensibilidade	Especificidade
B.1.1.28 e B.1.1.33 (2020)	Coorte Total	69,6% (47,1 - 86,8)	100% (90,5 - 100,0)
	Sintomáticos	75,0% (50,9 - 91,3)	100% (86,3 - 100,0)
	Assintomáticos	33,3% (0,8 - 90,6)	100% (73,5 - 100,0)
Delta (2021)	Coorte Total	34,4% (18,6 - 53,2)	100% (87,7 - 100,0)
	Sintomáticos	32,2% (16,7 - 51,4)	100% (63,1 - 100,0)
	Assintomáticos	100% (2,5 a 100,0)	100% (83,2 - 100,0)
Ômicron (2022)	Coorte Total	57,1% (39,4 - 73,7)	100% (86,3 - 100,0)
	Sintomáticos	60,7% (40,6 - 78,5)	100% (71,5 - 100,0)
	Assintomáticos	42,9% (9,9 - 81,6)	100% (76,8 - 100,0)

Fonte: Dados da pesquisa, (2020-2022).

Assim, a sensibilidade geral do TR-Ag para as amostras referentes ao primeiro período amostral (2020) foi de 69,6% (IC 95% = 47,1 - 86,8), a especificidade foi de 100,0% (IC 95% = 90,5 a 100,0). Entretanto, a taxa de sensibilidade aumentou para 75,0% (IC 95% = 50,9 - 91,3) apenas levando em consideração os indivíduos sintomáticos (n=45). No segundo período amostral (2021), que se refere às amostras cuja variante em maior circulação era a Delta, a sensibilidade geral do TR-Ag foi de 34,4% (IC 95% = 18,6 - 53,2), e houve pouca diferença entre a sensibilidade geral e a referente apenas aos indivíduos

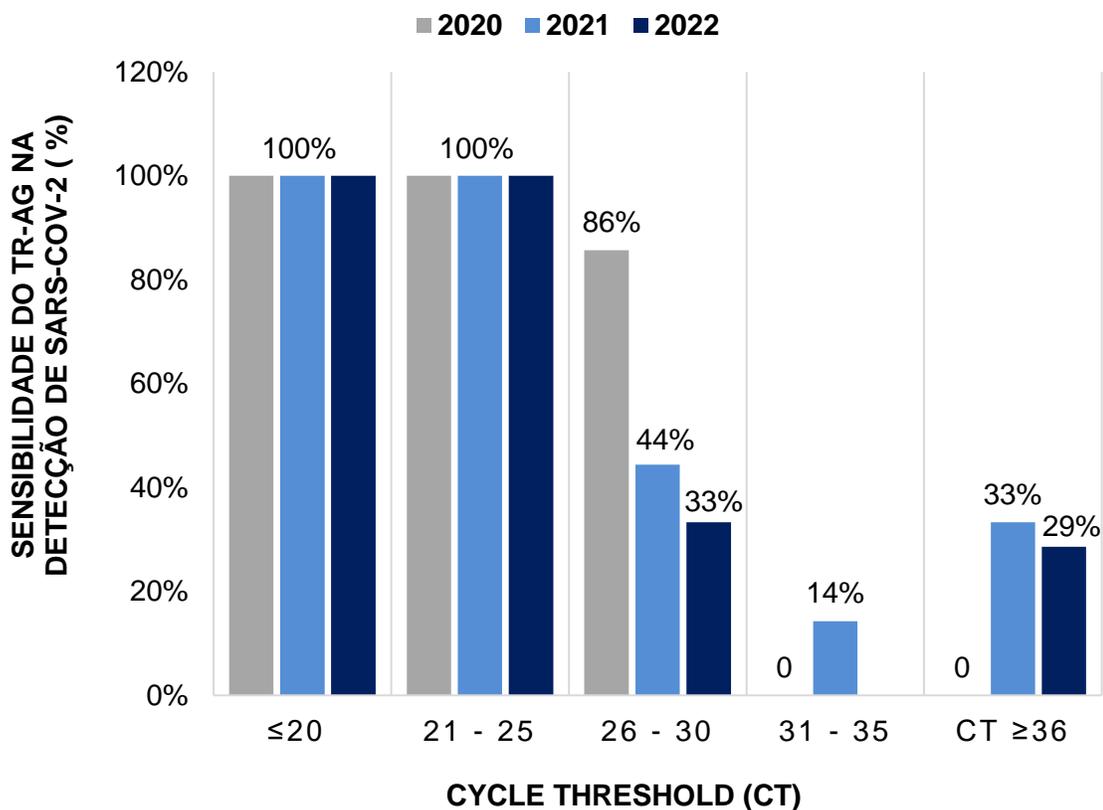
sintomáticos. Já no terceiro período amostral (2022), referente as amostras cuja variante circulante era a Ômicron, a sensibilidade geral do TR-Ag foi de 57,1% (IC 95% = 39,4 - 73,7), e aumentou para 60,7% (IC 95% = 40,6 - 78,5), levando em consideração os indivíduos sintomáticos (n=21).

No estudo de Bekliz *et al.* (2022), que buscou comparar a sensibilidade analítica de oito TRs-Ag com um isolado de SARS-CoV-2 de fase inicial da pandemia (B.1.610) e os VOCs Alpha, Beta, Gama e Delta em comparação com Ômicron-BA.1, foi observada uma tendência de menor sensibilidade para detecção de Ômicron em comparação com o SARS-CoV-2 circulante anterior e outras linhagens. Ainda, Kim *et al.* (2022), evidenciaram em seu estudo que as taxas de sensibilidades determinadas ao analisar as amostras de pacientes sintomáticos foram maiores do que as dos participantes assintomáticos, corroborando com os resultados encontrados nesta pesquisa.

Para aprofundar a análise, realizou-se uma comparação entre o desempenho diagnóstico (sensibilidade) para o TR-Ag em relação à carga viral (Ct) obtida pelo RT-qPCR (Figura 6). Sendo assim, observou-se que o limite mínimo de ciclos necessários para detecção do material genético do vírus foi de 18, e o limite máximo, de 39. A média dos valores de Ct das amostras referentes à 2020, 2021 e 2022 foi de 27, 31 e 28, respectivamente.

Ao comparar os valores de Ct com os resultados do teste rápido, observou-se que o intervalo médio de detecção reduziu para o limite que corresponde à faixa de 26 a 30 nas amostras testadas nos respectivos períodos em que as variantes B.1.1.28 e B.1.1.33 (2020), Delta (2021) e Ômicron (2022) estavam em maior circulação no Brasil. Assim, a partir de valores de Ct superiores a 30, a taxa de sensibilidade do teste rápido declinou progressivamente para valores abaixo de 86% em 2020, 44% em 2021 e 33% em 2022.

Figura 6 - Sensibilidade de detecção do SARS-CoV-2 pelo teste rápido de pesquisa de antígeno em relação à carga viral obtida pelo RT-qPCR



Fonte: Dados da pesquisa (2020-2022).

Em seu estudo, Bayart *et al.* (2022), reitera que sensibilidades relatadas de TR-Ag para SARS-CoV-2 em amostras com Ct > 25 são frequentemente baixas. De forma semelhante, Begum *et al.* (2021), reportaram que os TR-Ag apresentaram alto desempenho (>90% de sensibilidade) para valores de Ct inferiores à 30, além de observarem uma diminuição na taxa de detecção com o aumento dos valores de Ct, e consequentemente, em amostras com carga viral menor. Estes resultados, corroboram com os encontrados nesta pesquisa, tendo em vista que o TR-Ag demonstrou redução na sensibilidade a partir de valores de Ct > 25.

Entretanto, observou-se que em valores de Ct > 25, houve um declínio maior na sensibilidade do teste ao comparar as amostras referentes ao período em que variante Delta estava em maior circulação com as do período em que a variante circulante era a Ômicron. Em seu estudo, Mohammadie *et al.* (2023), observou que o desempenho dos TR-Ag no diagnóstico de COVID-19 foi afetado quando a variante Ômicron estava circulando, principalmente em amostras com carga viral menor.

De modo similar, Bekliz *et al.* (2022) determinaram em suas análises que para a detecção da variante Ômicron-BA.1, houve uma considerável variabilidade de sensibilidade dentre os TR-Ag utilizados, destacando a importância de uma escolha criteriosa ao empregar esses testes na prática, além de ressaltar a importância das avaliações clínicas.

A seleção de amostras analisadas foi caracterizada por uma ampla gama de valores de Ct, sendo a maioria valores médios e altos (entre 20 e 40). Ainda, observou-se em dentre os três períodos estudados, as amostras de 2021 (variante em maior circulação no Brasil = Delta) foram as que apresentaram maiores valores Ct, indicando provavelmente, uma menor carga viral.

Este é um fator de grande relevância, uma vez que, um resultado não reagente pode ocorrer se o nível de antígeno extraído da amostra for menor que a sensibilidade do teste ou se uma amostra de baixa qualidade for utilizada. Assim sendo, um resultado não reagente neste teste não elimina a possibilidade de infecção por SARS-CoV-2, sendo necessária a utilização de outros métodos para confirmação (Brasil, 2022a).

6 CONCLUSÃO

Através da análise geral, levando em consideração os possíveis fatores interferentes no desempenho dos TR-Ag: variantes do SARS-CoV-2, sintomatologia e carga viral (Ct), a carga viral foi considerada o fator mais importante para determinar a sensibilidade do teste do antígeno SARS-CoV-2. Ainda, ao determinar as divergências nas taxas de sensibilidade por meio de análise concomitante de dois parâmetros: carga viral e variantes do vírus, observou-se que para as variantes Delta e Ômicron, houve uma aparente sensibilidade reduzida, especialmente para valores de Ct > 25. No entanto, apesar da heterogeneidade nas taxas de sensibilidade do TR-Ag, pode-se afirmar que o teste foi capaz de detectar com eficiência todas as variantes do SARS-CoV-2 avaliadas neste estudo, ao seguir às recomendações previamente existentes e altamente difundidas na literatura (Ct < 25 e entre o 2º e 7º dia de sintomas). Ademais, sugere-se que novos estudos sejam realizados com um número mais significativo de amostras, tendo em vista a aparente menor sensibilidade destes dispositivos para a variante Ômicron e Delta, o que gera questionamentos para determinar saber se os TR-Ag devem ser reavaliados, ou mesmo readaptados às alterações genômicas atuais e futuras observadas no vírus.

REFERÊNCIAS

- ALEEM, Abdul; AKBAR SAMAD, Abdul Bari; VAQAR, Sarosh. Emerging Variants of SARS-CoV-2 and Novel Therapeutics Against Coronavirus (COVID-19). **StatPearls Publishing**, 2023. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK570580/>>. Acesso em: 10 out. 2023.
- BAČURA, Anita Somborac *et al.* Current status of the lateral flow immunoassay for the detection of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal swabs. **Biochemia Medica**, v. 31, n. 2, p. 230-239, 15 jun. 2021. Disponível em: <https://www.biochemia-medica.com/en/journal/31/2/10.11613/BM.2021.020601>. Acesso em: 10 out. 2023.
- BAYART, Jean-Louis *et al.* Analytical Sensitivity of Six SARS-CoV-2 Rapid Antigen Tests for Omicron versus Delta Variant. **Viruses**, v. 14, n. 4, p. 654, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/14/4/654>. Acesso em: 12 out. 2023.
- BEGUM, Mst. Noorjahan *et al.* Factors influencing the performance of rapid SARS-CoV-2 antigen tests under field condition. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 36, n. 2, p. e24203, 2022. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcla.24203>. Acesso em: 13 out. 2023.
- BEKLIZ, Meriem *et al.* Analytical Sensitivity of Eight Different SARS-CoV-2 Antigen-Detecting Rapid Tests for Omicron-BA.1 Variant. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 4, p. e00853-22, 2022. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/spectrum.00853-22>. Acesso em: 10 out. 2023.
- BORGES, Alessandra Abel et al. SARS-CoV-2: origem, estrutura, morfogênese e transmissão. **Construção de Conhecimento no Curso da Pandemia de Covid-19: aspectos biomédicos, clínico-assistenciais, epidemiológicos e sociais**, v. 1, p. 1-21, 2020. Disponível em: https://repositorio.ufba.br/ri/bitstream/ri/32370/8/vol1_cap2_SARS-CoV-2%20origem%20estrutura%20morfogenese%20e%20a0transmissao.pdf. Acesso em: 12 set. 2023.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **COVID-19 Painel Coronavírus**. 2023a. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br>. Acesso em: 14 out. 2023.
- BRASIL. Ministério da Saúde/Fiocruz. **Vigilância Genômica do SARS-CoV-2 no Brasil**. 2023b. Disponível em: <https://www.genomahcov.fiocruz.br/dashboard-pt/>. Acesso em: 28 out. 2023.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Vacinômetro COVID-19**. 2023c. Disponível em: https://infoms.saude.gov.br/extensions/SEIDIGI_DEMAS_Vacina_C19/SEIDIGI_DEMAS_Vacina_C19.html. Acesso em: 10 out. 2023.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. **Manual para Diagnóstico da COVID-19**. 2022a. Disponível em: chrome-

extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://coronavirus.saude.mg.gov.br/imag
es/2023/01/05-01-Manual_para_o_Diagn%C3%B3stico_da_covid-19-
vers%C3%A3o_7_-_final.pdf. Acesso em: 12 set. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Série A. Normas e Manuais Técnicos - Cadernos de Atenção Primária**. 2010. Disponível em: chrome-
extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicaco
es/caderno_atencao_primaria_29_rastreamento.pdf. Acesso em: 12 set. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Testes COVID-19: Entenda as diferenças entre RT-PCR, antígeno e autoteste**. 2022b. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-
br/assuntos/noticias/2022/fevereiro/entenda-as-diferencas-entre-rt-pcr-antigeno-e-
autoteste. Acesso em: 12 out. 2023.

CASCELLA, Marco *et al.* Características, avaliação e tratamento do Coronavírus (COVID-19). **StatPearls Publishing**, 2023. Disponível em:
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/. Acesso em: 15 set. 2023.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions**. 2023. Disponível em:
<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html>.
Acesso em: 18 de agosto de 2023.

CHEN, Zhufeng *et al.* Clinical laboratory evaluation of COVID-19. **Clinica Chimica Acta**, v. 519, p. 172–182, 2021. Disponível em:
https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898121001479. Acesso em: 13 out. 2023.

COSTA, Isabela Bispo Santos Da Silva *et al.* O Coração e a COVID-19: O que o Cardiologista Precisa Saber. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 114, n. 5, p. 805–816, 2020. Disponível em:
https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2020000600805&lng=pt&nrm=iso. Acesso em: 27 out. 2023.

DEL VECCHIO, Claudia *et al.* Impact of antigen test target failure and testing strategies on the transmission of SARS-CoV-2 variants. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 5870, 2022. Disponível em: https://www.nature.com/articles/s41467-022-33460-0.
Acesso em: 14 out. 2023.

FARHUD, Dariush D.; MOJAHED, Nooshin. SARS-COV-2 Notable Mutations and Variants: A Review Article. **Iranian Journal of Public Health**, [S.L.], v. 51, p. 1494-1501. 2022. Disponível em: <https://publish.kne-
publishing.com/index.php/ijph/article/view/10083>. Acesso em: 11 out. 2023.

FIGUEIREDO, Sônia Aparecida; PAULA, Fernanda Borges De Araújo. Diagnóstico da COVID-19 em laboratórios de análises clínicas. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 1, p. e49511125286, 2022. Disponível em:

<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/25286>. Acesso em: 06 set. 2023.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). **Nota Técnica: Considerações sobre o diagnóstico laboratorial da Covid-19 no Brasil**. 2020. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/documento/nota-tecnica-consideracoes-sobre-o-diagnostico-laboratorial-da-covid-19-no-brasil>>. Acesso em: 12 set. 2023.

HAGAG, Ibrahim T. *et al.* Mutations in SARS-CoV-2 nucleocapsid in variants of concern impair the sensitivity of SARS-CoV-2 detection by rapid antigen tests. **Frontiers in Virology**, v. 2, p. 971862, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fviro.2022.971862/full>. Acesso em: 12 out. 2023.

ISER, Betine Pinto Moehlecke *et al.* Definição de caso suspeito de COVID-19: uma revisão narrativa dos sinais e sintomas mais frequentes entre os casos confirmados. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 29, n. 3, 2020. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2237-96222020000300401&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt> Acesso em: 28 out. 2023.

JOHNSON, Bryan A. *et al.* Nucleocapsid mutations in SARS-CoV-2 augment replication and pathogenesis. **PLOS Pathogens**, v. 18, n. 6, p. e1010627, 2022. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1010627>. Acesso em: 06 set. 2023.

KIM, Jimin *et al.* Clinical Performance of Rapid and Point-of-Care Antigen Tests for SARS-CoV-2 Variants of Concern: A Living Systematic Review and Meta-Analysis. **Viruses**, v. 14, n. 7, p. 1479, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/14/7/1479>. Acesso em: 16 out. 2023.

LAI, Chih-Cheng *et al.* Asymptomatic carrier state, acute respiratory disease, and pneumonia due to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): Facts and myths. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 53, n. 3, p. 404–412, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1684118220300402>. Acesso em: 14 out. 2023.

LANA, Raquel Martins *et al.* Emergência do novo coronavírus (SARS-CoV-2) e o papel de uma vigilância nacional em saúde oportuna e efetiva. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. e00019620, 2020. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2020000300301&tlng=pt. Acesso em: 11 out. 2023.

LIMA, Felicson Leonardo Oliveira *et al.* Diagnóstico da COVID-19: importância dos testes laboratoriais e dos exames de imagem. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 9, p. e259997162, 2020. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/7162>. Acesso em: 10 out. 2023.

LIMA, Francisca Elisângela Teixeira *et al.* Intervalo de tempo decorrido entre o início dos

sintomas e a realização do exame para COVID-19 nas capitais brasileiras, agosto de 2020*. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 30, n. 1, p. e2020788, 2021. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2237-96222021000100302&tlng=pt. Acesso em: 14 out. 2023.

LI, Xiaowei *et al.* Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 10, n. 2, p. 102–108, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095177920302045>. Acesso em: 29 set. 2023.

MedCalc Software Ltd. **Calculadora de avaliação de teste de diagnóstico**. Disponível em: https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php. Acesso em: 15 out. 2023.

NOGUEIRA, Joseli Maria Da Rocha; SILVA, Líllian Oliveira Pereira Da. Diagnóstico laboratorial da COVID-19 no Brasil. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 52, n. 2, 2020. Disponível em: <http://www.rbac.org.br/artigos/diagnostico-laboratorial-da-covid-19-no-brasil/>. Acesso em: 16 set. 2023.

OLIVEIRA, Rita De Cássia Silva De *et al.* Síndrome pós-Covid-19: breve revisão sistemática / Long-Covid: breve revisão sistemática. **Revista Brasileira de Revisão de Saúde**, v. 5, n. 2, pág. 5714–5729, 2022. Disponível em: <https://brazilianjournals.com/index.php/BJHR/article/view/45943>. Acesso em: 26 out. 2023.

OLIVEIRA, Wanderson Kleber De *et al.* Como o Brasil pode deter a COVID-19. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 29, p. e2020044, 2020. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2237-96222020000200200&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 18 set. 2023.

PARVU, Valentin *et al.* Factors that Influence the Reported Sensitivity of Rapid Antigen Testing for SARS-CoV-2. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 714242, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.714242/full>. Acesso em: 16 set. 2023.

Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ). **Classificações e definições de variantes SARS-CoV-2: PNCQ**. 2023. Disponível em: <https://pncq.org.br/classificacoes-e-definicoes-de-variantes-sars-cov-2/>. Acesso em: 18 de setembro de 2023.

RAHIMI, Azadeh; MIRZAZADEH, Azin; TAVAKOLPOUR, Soheil. Genetics and genomics of SARS-CoV-2: A review of the literature with the special focus on genetic diversity and SARS-CoV-2 genome detection. **Genomics**, v. 113, n. 1, p. 1221–1232, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0888754320308764>. Acesso em: 11 out. 2023.

RONG, Guoguang *et al.* COVID-19 Diagnostic Methods and Detection Techniques. **Encyclopedia Of Sensors And Biosensors**, v. 3, p. 17-32, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128225486000807?via%3Dihub>. Acesso em: 12 set. 2023.

SETHURAMAN, Nandini; JEREMIAH, Sundararaj Stanleyraj; RYO, Akihide. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. **Jama**, v. 323, n. 22, p. 2249-2251, 2020. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2765837>. Acesso em: 15 maio 2023.

SOUSA NETO, Antonio Rosa De *et al.* Manifestações sintomáticas da doença causada pelo coronavírus (COVID-19) em adultos: revisão sistemática. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v. esp, pág. e20200205, 2021. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1983-14472021000200600&tlng=en. Acesso em: 28 out. 2023.

SOUSA, Orlando Silva; COSTA, Juliana Foro Da; BRITO, Maysa De Vasconcelos. Avaliação do desempenho de testes imunocromatográficos para detecção de antígenos SARS-CoV-2: uma revisão da literatura. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 11, p. e109111132301, 2022. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/32301>. Acesso em: 14 maio 2023.

STANLEY, Sydney *et al.* Limit of Detection for Rapid Antigen Testing of the SARS-CoV-2 Omicron and Delta Variants of Concern Using Live-Virus Culture. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 60, n. 5, p. e00140-22, 2022. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.00140-22>. Acesso em: 18 ago. 2023.

TAKEUCHI, Yuto *et al.* The evaluation of a newly developed antigen test (QuickNavi™-COVID19 Ag) for SARS-CoV-2: a prospective observational study in japan. **Journal Of Infection And Chemotherapy**, [S.L.], v. 27, n. 6, p. 890-894, jun. 2021. Disponível em: [https://www.jiac-j.com/article/S1341-321X\(21\)00069-6/fulltext](https://www.jiac-j.com/article/S1341-321X(21)00069-6/fulltext). Acesso em: 14 out. 2023.

THAKUR, Suresh *et al.* SARS-CoV-2 Mutations and Their Impact on Diagnostics, Therapeutics and Vaccines. **Frontiers in Medicine**, v. 9, p. 815389, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2022.815389/full>. Acesso em: 6 jun. 2023.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **SARS-CoV-2 Viral Mutations: Impact on COVID-19 Tests**. 2023. Disponível em: <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-covid-19-and-medical-devices/sars-cov-2-viral-mutations-impact-covid-19-tests>. Acesso em: 16 set. 2023.

VALVERDE, Ricardo. O que são mutações, linhagens, cepas e variantes? **Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)**. 2021. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/o-que-sao-mutacoes-linhagens-cepas-e-variantes-1>. Acesso em: 11 out. 2023.

VEROTTI, Mariana Pastorello *et al.* Testes diagnósticos para COVID-19 registrados na

Agência Nacional de Vigilância Sanitária: sensibilidade e especificidade reportadas pelos fabricantes. **Repositório Institucional da FIOCRUZ (ARCA)**, 2020. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/44223>. Acesso em: 28 out. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard**. 2023. Disponível em: <https://covid19.who.int>. Acesso em: 18 de agosto de 2023.

XAVIER, Analucia R. *et al.* COVID-19: COVID-19: manifestações clínicas e laboratoriais na infecção pelo novo coronavírus. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, p. 1-9, 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbpm/a/PrqSm9T8CVkPdk4m5Gg4wKb/?lang=pt>. Acesso em: 14 jul. 2023.

YONG, Suh Kuan; SU, Ping-Chia; YANG, Yuh-Shyong. Molecular Targets for the Testing of COVID-19. **Biotechnology Journal**, v. 15, n. 6, p. 2000152, 18 maio 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/biot.202000152>. Acesso em: 06 jul. 2023.

ANEXO A



República Federativa do Brasil
Ministério da Saúde

Sistema Gerenciador de Ambiente Laboratorial - GAL

Requisição de Exame

REQUISICÃO

[1] Nº Requisição:	[2] Unidade de Saúde (ou outra fonte):*	[3] CNES:*
[4] Município de Atendimento:	[5] Código IBGE:*	[6] UF:
[7] Cartão Nacional de Saúde (CNS) do Profissional de Saúde:°	[8] Nome do Profissional de Saúde:°	[9] Número do Conselho/Matrícula:°
[10] Rubrica:		
[11] Data de Solicitação:*	[12] Finalidade:*	[13] Descrição da Finalidade:
	1 - Campanha 2 - Inquérito 3 - Investigação 4 - Programa 5 - Protocolo 6 - Projeto 9 - Ignorado	

PACIENTE

[14] Cartão Nacional de Saúde (CNS) do Paciente:°	[15] Nome do Paciente:°
[16] Data de Nascimento:°	[17] Idade:°
	Quantidade: 1 - Hora(s) 2 - Dia(s) 3 - Mês(s) 4 - Ano(s)
[18] Sexo:°	[19] Nacionalidade:°
	1 - Masculino 1 - Ignorado F - Feminino
[20] Raça/Cor:°	[21] Etnia:°
1 - Branca 2 - Preta 3 - Parda 4 - Amarela 5 - Indígena 99 - Sem Informação	[22] Nome da Mãe:°
[23] Documento 1:	[24] Documento 2:
1 - RG 2 - CPF 3 - CNH 5 - CNASC 6 - PRONT 7 - INFOPEN	1 - RG 2 - CPF 3 - CNH 5 - CNASC 6 - PRONT 7 - INFOPEN
[25] Logradouro: (Rua, Avenida...)	[26] Número:
[27] Complemento do Logradouro:	[28] Ponto de Referência:
	[29] Bairro:
[30] Município de Residência:°	[31] Código IBGE:°
	[32] UF:°
[33] CEP:	[34] DDD / Telefone:
	[35] Zona: 3 - Rural 1 - Urbana 4 - Silvestre 2 - Periurbana 9 - Ignorada
	[36] País (Se reside fora do Brasil):°

INFORMAÇÕES CLÍNICAS

[37] Agravado/Doença:*	[38] Data dos Primeiros Sintomas:*	[39] Idade Gestacional:
		1 - 1º Trim. 2 - 2º Trim. 3 - 3º Trim. 4 - Ignorado 5 - Não 6 - Não se Aplica 9 - Ignorado
[40] Caso:	[41] Tratamento:	[42] Etapa de Tratamento:
1 - Suspeito 2 - Comunicante 3 - Acompanhamento 4 - Controle 6 - Caso grave 7 - Surto 8 - Diagnóstico 9 - Ignorado	Quantidade: 1 - Dia 2 - Semana 3 - Mês 4 - Ano 9 - Ignorado	1 - Pretratamento 2 - Tratamento 3 - Retratamento 4 - Avaliação de Resistência 9 - Ignorado
[43] Paciente Tomou Vacina?	[44] Vacina?	[45] Data da Última Dose:
1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado		

SINAN

[46] Notificado ao SINAN:	Preencher com as informações para rastreamento no Sistema Nacional de Agravos de Notificação do Ministério da Saúde.	[47] CID 10:*	[48] Nº Notificação do SINAN:*	[49] Data de Notificação:*
1 - Sim				
[50] Unidade de Saúde Notificante:	[51] CNES*			
[52] Município de Notificação:	[53] Código IBGE* [54] UF:			

AMOSTRA / EXAME

[55] Pesquisa (s) / Exame(s) Solicitado (s) :*	[56] Material Biológico:*	[57] Localização:	[58] Amostra:	[59] Mat. Clínico:	[60] Data da coleta:*	[61] Hora da coleta:	[62] Usou medicamento antes da data da coleta?
			1 - IN 2 - IB 3 - LM 4 - MTB 5 - MTV 6 - PF 7 - FA 8 - FC 9 - BF 10 - PF Única				[63] [64] 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado Data início do uso: Especifique: [63] [64]
							1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado Data início do uso: Especifique: [63] [64]
							1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado Data início do uso: Especifique: [63] [64]
							1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado Data início do uso: Especifique: [63] [64]
							1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado Data início do uso: Especifique: [63] [64]

DADOS COMPLEMENTARES

[65] Observações Gerais :

*Campo de preenchimento obrigatório

°Preenchimento automático com informações do Cartão Nacional de Saúde (CNS)

ANEXO B



MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE

Nº

e-SUS Notifica – 05/10/2020

FICHA DE INVESTIGAÇÃO DE SG SUSPEITO DE DOENÇA PELO CORONAVÍRUS 2019 – COVID-19 (B34.2)

Definição de caso: Indivíduo com quadro respiratório agudo, caracterizado por pelo menos dois (2) dos seguintes sinais e sintomas: febre (mesmo que referida), calafrios, dor de garganta, dor de cabeça, tosse, coriza, distúrbios olfativos ou distúrbios gustativos.

Em crianças: além dos itens anteriores considera-se também obstrução nasal, na ausência de outro diagnóstico específico.

Em idosos: deve-se considerar também critérios específicos de agravamento como síncope, confusão mental, sonolência excessiva, irritabilidade e inapetência.

Observação: Na suspeita de COVID-19, a febre pode estar ausente e sintomas gastrointestinais (diarreia) podem estar presentes.

UF de notificação: _____		Município de Notificação: _____	
Tem CPF? (Marcar X) <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		Estrangeiro: (Marcar X) <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
Profissional de saúde (Marcar X) <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		Profissional de segurança (Marcar X) <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
CBO: _____		CPF: _____	
CNS: _____			
Nome Completo: _____			
Nome Completo da Mãe: _____			
Data de nascimento: _____		País de origem: _____	
Sexo: (Marcar X) <input type="checkbox"/> Masculino <input type="checkbox"/> Feminino		Raça/COR: (Marcar X) <input type="checkbox"/> Branca <input type="checkbox"/> Preta <input type="checkbox"/> Amarela <input type="checkbox"/> Parda <input type="checkbox"/> Indígena - Etnia: _____ <input type="checkbox"/> Ignorado	
Passaporte: _____			
CEP: _____			
Estado de residência: _____		Município de Residência: _____	
Logradouro: _____		Número: _____	Bairro: _____
Complemento: _____			
Telefone Celular: _____		Telefone de contato: _____	
Data da Notificação: _____		Data do início dos sintomas: _____	
Sintomas: (Marcar X) <input type="checkbox"/> Assintomático <input type="checkbox"/> Febre <input type="checkbox"/> Dor de Garganta <input type="checkbox"/> Dispneia <input type="checkbox"/> Tosse <input type="checkbox"/> Coriza <input type="checkbox"/> Dor de Cabeça <input type="checkbox"/> Distúrbios gustatórios <input type="checkbox"/> Distúrbios olfativos <input type="checkbox"/> Outros _____			
Condições: (Marcar X) <input type="checkbox"/> Doenças respiratórias crônicas descompensadas <input type="checkbox"/> Diabetes <input type="checkbox"/> Obesidade <input type="checkbox"/> Doenças renais crônicas em estágio avançado (graus 3, 4 e 5) <input type="checkbox"/> Imunossupressão <input type="checkbox"/> Portador de doenças cromossômicas ou estado de fragilidade imunológica <input type="checkbox"/> Gestante <input type="checkbox"/> Doenças cardíacas crônicas <input type="checkbox"/> Puerpéra (até 45 dias do parto)			
Estado do Teste: (Marcar X) <input type="checkbox"/> Solicitado <input type="checkbox"/> Coletado <input type="checkbox"/> Concluído <input type="checkbox"/> Exame Não Solicitado		Tipo de Teste: (Marcar X) <input type="checkbox"/> RT – PCR <input type="checkbox"/> Teste rápido – anticorpo <input type="checkbox"/> Teste rápido – antígeno <input type="checkbox"/> Testes sorológico	
Resultado (PCR/Rápidos): (Marcar X) <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Inconclusivo ou Indeterminado		Teste Sorológico: (Marcar X) <input type="checkbox"/> IgA <input type="checkbox"/> IgG <input type="checkbox"/> IgM <input type="checkbox"/> Anticorpos Totais	
Resultado (IgG): (Marcar X) <input type="checkbox"/> Reagente <input type="checkbox"/> Não Reagente <input type="checkbox"/> Inconclusivo ou Indeterminado		Resultado (IgM): (Marcar X) <input type="checkbox"/> Reagente <input type="checkbox"/> Não Reagente <input type="checkbox"/> Inconclusivo ou Indeterminado	
Resultado (Anticorpos Totais): (Marcar X) <input type="checkbox"/> Reagente <input type="checkbox"/> Não Reagente <input type="checkbox"/> Inconclusivo ou Indeterminado		Resultado (Anticorpos Totais): (Marcar X) <input type="checkbox"/> Reagente <input type="checkbox"/> Não Reagente <input type="checkbox"/> Inconclusivo ou Indeterminado	
Evolução do caso: (Marcar X) <input type="checkbox"/> Cancelado <input type="checkbox"/> Ignorado <input type="checkbox"/> Internado <input type="checkbox"/> Em tratamento domiciliar <input type="checkbox"/> Óbito <input type="checkbox"/> Internado em UTI <input type="checkbox"/> Cura		Classificação final: (Marcar X) <input type="checkbox"/> Descartado <input type="checkbox"/> Confirmado Clínico Imagem <input type="checkbox"/> Confirmado Clínico-Epidemiológico <input type="checkbox"/> Confirmado Por Critério Clínico <input type="checkbox"/> Confirmado Laboratorial <input type="checkbox"/> Síndrome Gripal Não Especificada	
Data de encerramento: _____			
Informações complementares e observações			