



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO POR *SARS-COV-*
2

Trabalho submetido por
Ana Catarina Major Gamado
para a obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas

setembro de 2022



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO POR *SARS-COV-* 2

Trabalho submetido por
Ana Catarina Major Gamado
para a obtenção do grau de **Mestre** em Análises Clínicas

Trabalho orientado por
Doutora Perpétua Gomes

setembro de 2022

Agradecimentos

Quero agradecer à Prof.^a Doutora Perpétua Gomes pela sua disponibilidade e orientação na elaboração desta monografia e à Prof.^a Doutora Maria Guilhermina Moutinho, pelos conselhos dados nas fases mais difíceis.

Quero fazer o meu especial agradecimento aos meus pais por todo o apoio incondicional, por toda a motivação e por todo o amor que me deram ao longo deste processo. Aos meus amigos e em especial à Mariana Ramos, à Ana Santos, à Catarina Pires e ao André Barateiro, por toda ajuda e suporte, sem eles esta jornada seria mais atribulada.

Quero também agradecer a todas as pessoas que se cruzaram comigo ao longo deste caminho, por toda a aprendizagem adquirida.

Resumo

A doença infecciosa respiratória COVID-19 causada pelo novo vírus SARS-CoV-2, tornou-se, a nível internacional uma emergência de saúde pública. A pandemia decorrente da elevada transmissibilidade e a rápida disseminação do vírus causou uma crise humanitária com impactos sociais e económicos em todo o mundo. Inicialmente os sintomas são febre, tosse, fadiga e congestão nasal, mas podem progredir rapidamente para estados de saúde mais críticos tais como a síndrome respiratória aguda severa e a morte. Para além da diversidade de sintomas relatados por pacientes infetados, existem indivíduos que não apresentam qualquer sintomatologia. Desta forma torna-se fulcral, a deteção precoce da infeção viral ativa para o controlo desta pandemia. Para responder a esta necessidade, foram desenvolvidos diversos testes de diagnóstico laboratorial, com diferentes características. Em Portugal, a deteção da infeção aguda por SARS-COV-2 é efetuada com recurso aos testes de diagnóstico laboratorial, RT-PCR, RT-LAMP, TMA-Aptima™ e o teste rápido de antígeno.

Esta monografia tem como objetivo sintetizar a informação existente em relação aos vários testes laboratoriais, de forma a esclarecer a adequabilidade de utilização de cada um deles e permitir a aplicação do método mais adequado às diferentes situações no terreno.

Palavras-chave: SARS-CoV-2, RT-PCR, RT-LAMP, TMA- Aptima™, TrAg

Abstract

The infectious respiratory disease, COVID-19, caused by the new SARS-CoV-2, has become an international public health emergency. The pandemic resulting from the high transmissibility and rapid spread of the virus caused a humanitarian crisis with social and economic impacts around the world. Initially, the symptoms are similar to those of a common flu such as fever, cough, fatigue and nasal congestion, but they can quickly progress to more serious health conditions such as severe acute respiratory syndrome and even death. In addition to the diversity of symptoms reported by infected patients, there are individuals who do not present any symptoms at all. Thus, the early detection of active viral infection becomes crucial for the control of this pandemic. In order to respond to this need, several laboratory diagnostic tests were developed, with different characteristics. In Portugal, the detection of acute SARS-COV-2 infection is performed using laboratory diagnostic tests, RT-PCR, RT-LAMP, TMA-Aptima™ and the rapid antigen test.

This monograph aims to synthesize the existing information in relation to the various laboratory tests, in order to clarify the suitability of using each one of them and allow the application of the most appropriate method to different situations in the field.

Keywords: SARS-CoV-2, RT-PCR, RT-LAMP, TMA- Aptima™, TrAg

Índice

Resumo	1
Abstract	2
Lista de Abreviaturas	4
1. Introdução	8
3. Materiais e Métodos	11
4. Epidemiologia	12
5. COVID-19.....	13
5.1 Transmissão.....	16
5.2 SARS-COV-2.....	18
5.2.1 Variantes	20
5.3 Patogenicidade	24
6. Diagnóstico Laboratorial.....	25
6.1 Real-Time reverse-transcription Polymerase Chain Reaction	26
6.2 Amplificação mediada por Transcrição- Aptima™	31
6.3 Amplificação Isotérmica mediada por Loop (LAMP)	33
6.4 Teste Rápido de Antígeno.....	37
7. Comparação dos métodos de diagnóstico	40
7.1 Impacto das variantes no diagnóstico laboratorial	42
8. Conclusão	44
9. Referências bibliográficas	45

Lista de Abreviaturas

2019-nCoV – *2019 novel coronavirus*

ACE-2 – *Angiotensin-Converting Enzyme 2*

ACE2, *Angiotensin-converting enzyme 2*

Alpha-CoV - Alphacoronavírus

AuNP, nanopartículas de alumínio

Beta-CoV - Betacoronavírus

BIP, *Backward inner primer*

Bst - *Bacillus stearothermophilus*

cDNA – DNA complementar

COVID-19, *Coronavirus disease 2019*

Ct – *Cycle threshold*

Delta-CoV - Deltacoronavírus

DGS – Direção Geral da Saúde

DNA - *deoxyribonucleic acid*

ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control

EUA, *Estados unidos da américa*

FDA – Food and Drug Administration

FIB, *Forward inner primer*

Gamma-CoV - Gammacoronavírus

GISAID – *Global Initiative on Sharing All Influenza Data*

HPA - *Hybridization Protection Assay*

IgM e IgG – Imunoglobulina M e Imunoglobulina G

LAMP – *Loop-mediated isothermal ampliation*

MERS-CoV – *Middle East respiratory syndrome coronavirus*

mRNA – RNA mensageiro

NSPs, *Non Structural Proteins*

OMS – Organização Mundial da Saúde

ORF, *Open reading frames*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

RDB, *receptor-binding domain*

RdRp, *RNA dependent RNA polymerase*

RNA, *ribonucleic acid*

RT – *Reverse Transcriptase*

RT-LAMP, *Reverse Transcriptase- Loop-mediated isothermal amplification*

rtRT-PCR – *real time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*

SARS - *Severe Acute Respiratory Syndrome*

SARS-CoV – Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus

SARS-CoV-2 – *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*

SGTF - *S-gene target failure*

TMA – Amplificação mediada por Transcrição

TMPRSS2 – *Transmembrane Protease Serine 2*

TRAg – Teste Rápido de Antígeno

VOC, *Variants of Concern*

VOI, *Variants of Interest*

VUM, *Variants Under Monitoring*

Índices de Figuras:

Figura 1: Possíveis vias de transmissão do SARS-COV-2	16
Figura 2: Representação gráfica da estrutura do SARS-CoV-2 e das proteínas virais...	19
Figura 3: Representação gráfica da técnica RT-PCR.....	27
Figura 4: Representação gráfica de como ocorre a amplificação no método de diagnóstico laboratorial RT-LAMP.....	34
Figura 5: Representação de leitura colorimétrica do método RT-LAMP.. ..	35
Figura 6: Princípio do ensaio imunocromatográfico.....	37
Figura 7: Interpretação dos resultados do teste rápido de antígeno para o diagnóstico de infecção ativa por SARS-CoV-2.....	38

Índice de Tabelas:

Tabela 1: Classificação dos doentes com COVID-19.....	14
Tabela 2: Variantes do SARS-CoV-2 classificadas como VOC pela OMS.. ..	21
Tabela 3: Comparação dos métodos de diagnóstico laboratorial.....	40

1. Introdução

A COVID-19 (do inglês, *Coronavirus disease 2019*), designação atribuída pela Organização Mundial da Saúde (OMS) às manifestações clínicas causadas pela infeção pelo novo coronavírus SARS-CoV-2 (do inglês, *Severe Acute Respiratory Syndrome-associated Coronavirus 2*), tem configurado uma crise humanitária pela sua alta transmissibilidade e impactos sociais e económicos. Numerosos estudos científicos têm avançado na caracterização do vírus, no processo de infeção, nas vias de transmissão e também no desenvolvimento de medidas de prevenção, contenção e controlo da doença. No entanto, o crescente conhecimento acerca do vírus e da infeção viral continua a levantar questões acerca da adequabilidade e aplicabilidade dos métodos de diagnóstico laboratorial disponíveis

Segundo a OMS, os primeiros casos descritos de pneumonia de causa etiológica desconhecida, foram relatados a 31 de dezembro de 2019, na província de Wuhan, na China. (Chen *et al.*, 2020). No dia 7 de janeiro de 2020, Zhu *et al.*, anunciaram a sequenciação do genoma do SARS-CoV-2. A sequência genética foi partilhada com a comunidade científica internacional a 12 de janeiro, através do banco de dados internacional *Global Initiative on Sharing All Influenza Data* (GISAID) (Coutard *et al.*, 2020).

Após o surgimento da COVID-19, ocorreu uma rápida propagação dos casos pelo mundo, sendo que a 13 de janeiro, já havia relatos dos primeiros casos no continente asiático. (Zu *et al.*, 2020). A 3 de março foram relatados os primeiros casos em Portugal. (Relatório de Situação 001/2020) (Direção Geral de Saúde, 2020).

O coronavírus foi isolado pela primeira vez em 1937, ficando apenas conhecido em 2002 e 2003, por ser o agente etiológico responsável pela síndrome respiratória aguda grave na espécie humana, denominada por SARS (do inglês, *Severe Acute Respiratory Syndrome*). Este vírus, foi responsável por um aumento exponencial de infeções agudas no sistema respiratório inferior com sintomatologia febril e insuficiência respiratória. A propagação da SARS foi controlada rapidamente e apenas foram afetados países como a China, o Canadá, e os Estados Unidos da América (Schwartz & Graham, 2020).

Após 18 anos do aparecimento dos primeiros casos do SARS-CoV, o novo coronavírus (SARS-CoV-2) pertencente à família *coronaviridae* é o responsável, quer a nível internacional quer a nível nacional, pela rápida propagação da COVID-19. Contudo, o SARS-CoV-2 é menos mortal do que os outros coronavírus, nomeadamente, o SARS-

CoV e o vírus responsável pela Síndrome Respiratória do Médio Oriente (MERS-CoV), que surgiu na Arabia Saudita, em 2012. O SARS-CoV-2 apesar de partilhar a mesma origem ancestral com os outros coronavírus (MERS-CoV e SARS-CoV) possui maior capacidade de disseminação que estes (Fauci *et al.*, 2020).

A transmissão do SARS-CoV-2 foi verificada não só por parte de indivíduos infetados sintomáticos como também por parte de indivíduos assintomáticos (Jin *et al.*, 2020). No caso dos sintomáticos, os sintomas são bastante diversos e o período de incubação, ou seja, o período que decorre entre a infeção até à manifestação de sintomas, pode ser variável de pessoa para pessoa. Ambas as características tornam a deteção da infeção viral difícil, contribuindo para um aumento significativo da sua transmissão. Após o período de incubação, os indivíduos infetados podem manter-se assintomáticos ou apresentar sintomatologia maioritariamente leve, com exceção de pessoas que pertençam a grupos de risco. Em casos mais graves, a COVID-19 pode implicar um internamento prolongado, refletindo uma sobrecarga no Sistema Nacional de Saúde (Jin *et al.*, 2020).

Assim, um dos principais desafios impostos por esta pandemia é o diagnóstico precoce da infeção viral ativa, de modo a evitar a transmissão e propagação do vírus entre os seres humanos, através do estabelecimento de isolamento profilático dos indivíduos infetados transmissores.

Atualmente, existem diferentes métodos para a realização do diagnóstico laboratorial da infeção ativa por SARS-CoV-2, entre eles: o **rRT-PCR** que é considerado o método de referência para o diagnóstico laboratorial do SARS-CoV-2. Este método consiste na pesquisa de RNA viral por amplificação de ácidos nucleicos pela reação em cadeia da polimerase em tempo real, precedida de transcriptase reversa (rRT-PCR), tendo como amostra biológica o exsudado nasofaríngeo e/ou orofaríngeo do utente e, mais recentemente, a saliva. (World Health Organization [WHO], 2020) Apesar do **rRT-PCR** ser o método de referência este apresenta algumas desvantagens, sendo a principal o tempo de espera na obtenção do resultado de diagnóstico (4 a 48 horas) (Younes *et al.*, 2020); o **TMA** (amplificação mediada por transcrição) é um método de diagnóstico automatizado utilizado em laboratórios hospitalares e de referência. Este teste deteta a presença de RNA viral através de uma reação de amplificação, seguida de transcrição. Este método possui uma elevada sensibilidade e especificidade, uma vez que a técnica utilizada permite a amplificação do RNA-alvo presente na amostra, sendo que o tempo para a obtenção de resultado é bastante curto (3h) (Pham *et al.*, 2020); o **LAMP** (amplificação isotérmica mediada por *loop*) é outro dos métodos de diagnóstico utilizado

recentemente em Portugal. Este método caracteriza-se também, por uma reação de amplificação, mas em condições isotérmicas (63° - 65°C), com recurso à transcriptase reversa. Uma das vantagens da utilização deste método é o tempo para a obtenção do resultado de diagnóstico ser bastante curto (30 a 40 minutos) (Ortiz-Prado *et al.*, 2020); os **Testes Rápidos de Antigénio (TRAg)** caracterizam-se por detetar proteínas virais do SARS-COV- 2 presentes na amostra biológica, utilizando tecnologias de base imunológica. O resultado é obtido entre 15 a 30 minutos, no entanto, este método de diagnóstico tem menor sensibilidade de deteção do que os referidos anteriormente (Lai & Lam, 2021; Mathuria *et al.*, 2020).

2. Objetivo

A presente revisão bibliográfica tem como objetivo descrever os diferentes métodos de diagnóstico laboratorial da infeção por SARS-CoV-2, caracterizá-los e compará-los entre si, identificando as vantagens e desvantagens da utilização de cada um. Pretende-se ainda esclarecer a adequabilidade de utilização de cada método de diagnóstico laboratorial consoante as suas características e valências, de modo a permitir a aplicação do método mais adequado às diferentes situações no terreno.

3. Materiais e Métodos

Com o objetivo de resumir e analisar as informações recolhidas até à data sobre o diagnóstico da infeção ativa por SARS-COV-2 foram analisados artigos científicos com foco nos métodos de diagnóstico. A pesquisa da bibliografia foi realizada no período de outubro de 2021 a maio de 2022 com recurso aos motores de busca: Web of Science, PubMed ou goodle scholar através da conjugação das seguintes palavras-chave: 1) “SARS-COV-2”, “CORONAVIRUS”, “RT-PCR”; 2) “SARS-COV-2”, “CORONAVIRUS”, “TESTE DE ANTIGÉNIO”; 3) “SARS-COV-2”, “CORONAVIRUS”, “LAMP”; 4) “SARS-COV-2”, “CORONAVIRUS”, “TMA”; 5) “SARS-COV-2”, “CORONAVIRUS”, “DIAGNÓSTICO LABORATORIAL”. As páginas de site oficial da Organização Mundial de Saúde (OMS) e da Direção Geral de Saúde Portuguesa (DGS), foram incluídas como referências bibliográficas e suplemento de pesquisa.

Dado o rápido desenvolvimento científico desta temática, artigos em processo de pré-publicação foram considerados para análise. Um total de 207 referências foram recolhidas e analisadas segundo os critérios: medidas de seleção, incluindo a data de publicação (até dezembro de 2021). Foram incluídos para análise 3 artigos de 2022, um por escassez de informação acerca da variante *Omicron* e como fonte de imagens. Por fim, 146 dessas referências foram obtidas e incluídas no estudo de comparação dos métodos de diagnóstico da infeção ativa por SARS-CoV-2.

4. Epidemiologia

A 30 de dezembro de 2019 foram reportados, nos hospitais de Wuhan na China, os primeiros casos de uma pneumonia viral de etiologia desconhecida em indivíduos que frequentaram os mercados de peixe e animais na província de Hubei. (Cheng & Shan, 2019), dado que aproximadamente metade dos casos registados (49%) partilhavam alguma forma de exposição e contacto com este mercado (Yan *et al.*, 2020).

Foram analisadas amostras de lavado broncoalveolar de indivíduos internados no hospital de Wuhan, tendo sido identificado e sequenciado, com recurso a tecnologias de sequenciação de nova geração (do inglês, Next Generation Sequencing - NGS), um vírus pertencente ao género Betacoronavírus, da família dos coronavírus. (Singh & Yi, 2021). Obteve-se assim, a primeira edição completa do genoma do novo coronavírus, inicialmente denominado 2019-nCoV (Tan *et al.*, 2020).

A pneumonia viral de etiologia desconhecida foi designada como síndrome respiratória aguda grave (SARS) causada por uma nova estirpe de coronavírus, designada por SARS-CoV-2 (Wu *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2020).

Após um mês do relato do aparecimento do primeiro caso, a Organização Mundial da Saúde comunicou mais 27 casos relacionados com a nova pneumonia de Wuhan. Mais tarde, a 11 de março de 2020, o número de casos tinha aumentado significativamente, tendo sido confirmados 121.564 indivíduos infetados e 4.373 mortes em mais de 110 países (Clarke *et al.*, 2021). A rápida disseminação do vírus, bem como o surgimento de surtos epidémicos em vários países, obrigou a OMS a declarar inicialmente a situação como “emergência de saúde pública internacional” (30 de Janeiro de 2020) e pouco mais tarde, como uma pandemia (11 de Março de 2020) (WHO, 2020). Aproximadamente um ano após este cenário (Março de 2021), os valores registados pela OMS subiram para cerca de 115 milhões de casos de infeção e mais de 2,56 milhões de mortes em todo o mundo. Em Portugal, o Relatório de Situação Epidemiológica atualizado a 31 de dezembro de 2021 apresentava 1.389,646 casos confirmados e 18.955 mortes (Relatório de Situação DGS 31/12/2021) (Direção Geral de Saúde, 2021).

Apesar do elevado número de casos registado em todo o mundo um estudo realizado pelo Imperial College London estimou que cerca de 89% da população mundial ($\simeq 7$ mil milhões de pessoas) seriam infetadas caso não fossem tomadas medidas de mitigação contra a propagação de SARS-CoV-2 (P. Walker *et al.*, 2020).

5. COVID-19

A COVID-19 (do inglês, *coronavirus disease-19*) é a designação dada ao conjunto de manifestações clínicas causadas pela infecção por SARS-CoV-2.

No início desta pandemia foram efetuados estudos clínicos em indivíduos hospitalizados com COVID-19, demonstraram que a maioria dos casos apresentavam sintomas associados a uma pneumonia viral. (Guan *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2020).

A maioria dos indivíduos infetados apresentam sintomas da doença após um período de incubação de 1 a 14 dias (em média 5,2 dias), sendo que sintomas mais graves como dispneia e pneumonia podem desenvolver-se num período médio de 8 dias após o início da doença (Wu & McGoogan, 2020).

Os sintomas mais frequentes associados à COVID-19 são: tosse, febre (temperatura igual ou superior a 38.0°C), ou agravamento do padrão habitual, cefaleias, dificuldade respiratória, dores musculares, perda total ou parcial do olfato e ausência ou perturbação do paladar. Sintomas menos comuns incluem produção de expetoração, diarreia, calafrios, náuseas, vômitos, dor de garganta e no peito (Chen *et al.*, 2020; Guan *et al.*, 2020).

No caso dos pacientes internados também se verificou o desenvolvimento de linfopenia acentuada, semelhante ao observado em pacientes com SARS e MERS, e os indivíduos que não sobreviveram desenvolveram linfopenia mais grave ao longo do tempo (Guan *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2020). Adicionalmente, a doença pode progredir para um quadro clínico mais grave, sendo necessário a utilização de ventilação mecânica e acompanhamento médico-hospitalar (Huang *et al.* 2020).

Em crianças, são também considerados sintomas clínicos da COVID-19 sintomas como dor de cabeça, vômitos e diarreia. Quando comparadas aos adultos, as crianças relataram sintomas como febre e tosse em frequências mais baixas e eram muito menos propensas a ter doença grave/crítica (5,9% vs. 18,5%) (Chang *et al.*, 2020; Dong *et al.*, 2020). No entanto, quando estratificados entre as faixas etárias, 10,6% das crianças com menos de 1 ano apresentavam sintomas graves/críticos, indicando que, embora as crianças tenham geralmente uma manifestação mais leve da doença, o impacto da doença varia de acordo com a faixa etária (Dong *et al.*, 2020). Supõe-se que este padrão nas

crianças se deve a uma menor expressão genética dos recetores ACE2 nas células epiteliais respiratórias em idades mais reduzidas (Nakra *et al.*, 2020).

No que toca ao desenvolvimento das complicações mais graves da COVID-19, os idosos (>60 anos), indivíduos hipertensos, diabéticos, doentes cardíacos e pessoas com problemas respiratórios são considerados grupo de risco. (Li *et al.*, 2020; Verity *et al.*, 2020;).

Devido à diversidade de sintomas de entre os indivíduos infetados, bem como a diversidade na evolução da doença, é possível classificar os indivíduos diagnosticados com COVID-19 em cinco níveis da doença, como é apresentado na tabela 1 (Norma DGS 004/2020) (Direção Geral de Saúde).

Tabela 1: Classificação dos doentes com COVID-19.

Infeção assintomática	Teste de diagnóstico laboratorial positivo para a infecção por SARS-CoV-2. Não apresentam sintomas.
Doença ligeira	Sintomas ligeiros, como febre, tosse, dores musculares, dores de cabeça, anosmia ou hiposmia, ageusia ou disgeusia, vómitos e diarreia.
Doença moderada	Febre com 3 ou mais dias de duração, ou dispneia, mas com saturação periférica de O ₂ $\geq 90\%$ (ou $\geq 92\%$ na idade pediátrica) em ar ambiente, e sem instabilidade hemodinâmica
Doença grave	Pneumonia e, pelo menos, um dos seguintes critérios: Dificuldade respiratória, frequência respiratória superior a 30 cpm, ou SpO ₂ inferior a 90% em ar ambiente; Instabilidade hemodinâmica.
Doença crítica	Síndrome de dificuldade respiratória aguda ou choque séptico.

A taxa de mortalidade é variável entre 2% a 5%, devido provavelmente a diferentes características do paciente e/ou taxas de prevalência de infecção. No entanto, é necessário ter em conta que a taxa de letalidade pode ser afetada pelo número relativo de testes diagnósticos realizados em indivíduos sintomáticos (Wu & McGoogan, 2020).

Adicionalmente, é necessário considerar que a rápida saturação das unidades de cuidados intensivos e consequente menor disponibilidade de recursos médicos possa ter afetado as taxas de mortalidade em alguns períodos, especialmente em focos epidêmicos (Wiersinga *et al.*, 2020).

5.1 Transmissão

Em consequência da infecção do trato respiratório, o principal mecanismo de transmissão do vírus *SARS-CoV-2* é através da exposição a gotículas respiratórias contaminadas e por contato direto com o paciente infectado (Huang *et al.*, 2020). O vírus pode ser transmitido de humano para humano (transmissão direta), principalmente entre pessoas que mantenham uma maior proximidade por tempo prolongado, como por exemplo membros familiares que coabitam. (Fan *et al.*, 2020).

Apesar de a transmissão direta ser considerada um dos principais mecanismos de disseminação, também pode ocorrer a transmissão indireta, existindo registros de contágios por contato com superfícies contaminadas. A exposição prolongada com indivíduos infectados e exposições mais breves com indivíduos sintomáticos (por exemplo, tosse, espirros) estão associadas a maior risco de transmissão do vírus, enquanto exposições breves ou contatos com indivíduos assintomáticos possuem um menor risco de transmissão. (Chu *et al.*, 2020).

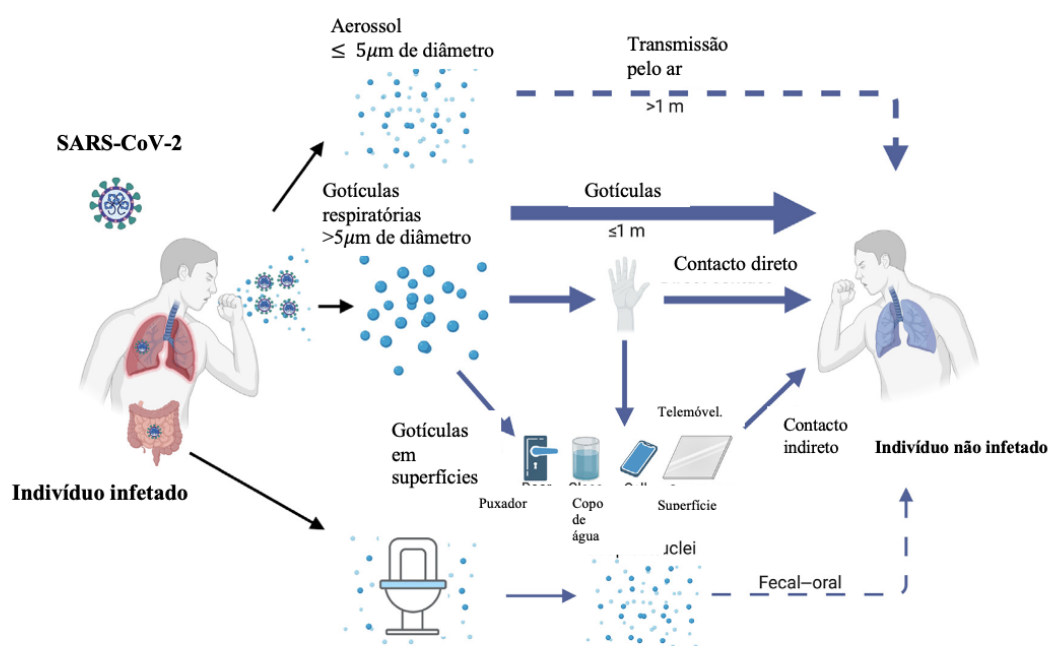


Figura 1: Possíveis vias de transmissão do *SARS-COV-2*. Desde o início da pandemia de COVID-19, ocorreram vários relatos de diferentes vias de transmissão entre humanos. A transmissão por gotículas (> 5 µm) é o modo de transmissão mais pronunciado e fortemente implicado relatado durante a pandemia. O contato direto entre um indivíduo infectado e um segundo indivíduo não infectado, tem sido considerado um

fator de transmissão de humano para humano, especialmente entre membros familiares com interações próximas entre os membros da família. A contagiosidade do *SARS-CoV-2* após a disposição em objetos (como por exemplo, maçanetas) está ainda sob investigação, mas provavelmente é um fator a ter em conta na transmissão do novo coronavírus, embora ocorra com menos frequência do que a transmissão por gotículas ou por contato. Ambos os eventos de transmissão de humano para humano por via aérea e fecal-oral foram relatados durante a epidemia causada pelo *SARS-CoV-2*, mas ainda não foram comprovadas. As setas sólidas mostram a transferência viral mais provável de uma pessoa infectada para outra, com uma redução na largura da seta de acordo com a contribuição relativa de cada via de transmissão. As linhas tracejadas mostram outros tipos de transmissão possíveis que ainda se encontram a ser estudados. Adaptado de: Harrison *et al.*, 2020.

A transmissão por aerossóis pode ocorrer ainda durante a permanência prolongada de indivíduos em ambientes fechados e mal ventilados (Buitrago-Garcia *et al.*, 2020; Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2021; WHO, 2021; Klompas *et al.*, 2020).

5.2 SARS-COV-2

Os coronavírus são vírus patogénicos comuns que infetam tanto o ser humano como animais. A designação "coronavírus" está associada à observação da sua estrutura ao microscópio eletrónico, onde é possível identificar picos na camada externa do envelope viral, assemelhando-se a uma coroa (corona).

Os coronavírus pertencem à ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, subfamília *Coronavirinae*, e classificam-se em 4 géneros: *Alphacoronavirus* (Alpha-CoV), *Betacoronavirus* (Beta-CoV), *Deltacoronavirus* (Delta-CoV) e *Gammacoronavirus* (Gamma-CoV). O Gamma-CoV e o Delta-CoV infetam apenas aves, enquanto o Alpha-CoV e o Beta-CoV apresentam a capacidade de infetar mamíferos (Aileni, 2022; Forni *et al.*, 2017; Singh & Yi, 2021).

Atualmente, são conhecidos seis coronavírus em humanos destacando-se o coronavírus da síndrome respiratória do Médio Oriente (MERS-CoV) e o coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV). (Asghari *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2020).

Através da sequenciação do genoma do SARS-CoV-2, verificou-se que este pertence ao género betacoronavirus, sub-génio sarbecovírus e que possui homologia genética de aproximadamente 80% de homologia com o MERS-CoV e 50% com o SARS-CoV (Lu *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020).

O SARS-CoV-2 apresenta um genoma composto por ácido ribonucleico (RNA do inglês, *ribonucleic acid*) de polaridade positiva, cadeia simples e com aproximadamente 30 Kb de comprimento. (Udugama *et al.*, 2020). O genoma é composto por locais designados como *ORFs* (do inglês, *Open Reading Frames*), que codificam proteínas acessórias (Naqvi *et al.*, 2020) e proteínas não estruturais NSPs (do inglês, *Non Structural Proteins*) (Krichel *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2020). Possui 5 genes essenciais que codificam quatro proteínas estruturais, e uma proteína fundamental para o processo de replicação e transcrição e viral, designada por RNA polimerase dependente de RNA (RdRp do inglês, *RNA dependent RNA polymerase*) atuando em conjunto com proteínas não estruturais para manter a conformação do genoma. As quatro proteínas estruturais (Fig.2) são: a glicoproteína transmembranar de superfície *spike* (S), a proteína do envelope viral (E), a proteína da matriz (M) e a proteína do nucleocapsídeo (N) (J. Abduljalil, & B. Abduljalil, 2020; Parsamanesh *et al.*, 2021). Na partícula viral, a proteína N envolve o genoma do

vírus de modo a formar uma estrutura helicoidal, que está circundada pela proteína E do envelope viral. A proteína S é uma proteína transmembranar que medeia a ligação do envelope viral aos recetores da célula hospedeira. A ligação à célula hospedeira é realizada através do domínio de ligação ao recetor (RBD, do inglês *receptor-binding domain*) e da proteína S. Este RBD é constituído por dois um domínio S1 e um domínio S2. O domínio S2 permite a fusão com a membrana celular das células hospedeiras e o domínio S1 é responsável pela ligação ao recetor celular. (J Abduljalil, & B. Abduljalil, 2020; Parsamanesh *et al.*, 2021).

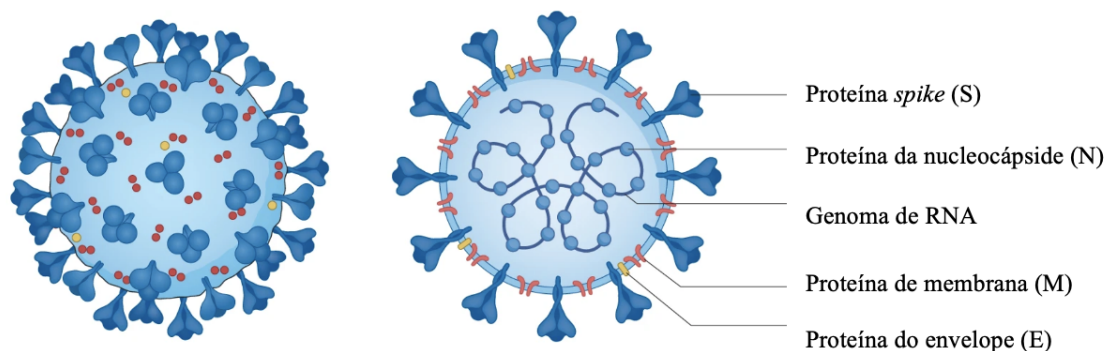


Figura 2: Representação gráfica da estrutura do SARS-CoV-2 e das proteínas virais. (S)- Proteína *Spike*; (N)- Proteína da nucleocápside; Genoma viral de RNA; (M)- Proteína de membrana e (E)- Proteína do Envelope. Adaptado de: Lamers & Haagmans, 2022.

Estudos filogenéticos indicam que o novo coronavírus-2 derivou de eventos evolutivos com recombinação entre as linhagens ancestrais do coronavírus SARS de origem de morcego (*bat-SL-CoVZC45*) (Lu *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2020). Deste modo, os dados apontam para que a origem do *SARS-CoV-2* tenha sido zoonótica e que devido a eventos de seleção natural, mais concretamente seleção purificadora e recombinação, tenham desenvolvido mecanismos que possibilitaram a infeção no Humano (Singh & Yi, 2021). Porém, devido a diferenças significativas encontradas entre o genoma do *SARS-CoV-2* e o genoma do SARS de morcego, a hipótese mais plausível, mas sem evidências é de que o novo coronavírus tenha tido um hospedeiro intermédio antes de conseguir infetar as células humanas, no entanto, não existem até à data, evidências científicas que sustentem esta afirmação nem que discriminem qual foi o animal intermediário (Singh & Yi, 2021).

5.2.1 Variantes

No decorrer da pandemia provocada pelo novo coronavírus foi descrita a existência de variantes genéticas do vírus SARS-COV-2 associadas ao aumento da transmissibilidade, gravidade da doença e uma diminuição da imunidade humoral. (Thakur *et al.*, 2022). Surgiu assim, a necessidade de estudar e caracterizar as variantes em circulação de modo que fosse possível a mitigação da sua elevada transmissibilidade e aumento da gravidade da doença por estas causadas (Thakur *et al.*, 2022). Mas também a compreensão e entendimento do possível impacto que estas podem ter nos testes de diagnóstico aplicados.

A taxa evolutiva do SARS-CoV-2 foi estimada entre 0,0004 e 0,002 mutações por nucleotídeo por ano. (Candido *et al.*, 2020; Day *et al.*, 2020; Pereson *et al.*, 2021). Para a vigilância epidemiológica das variantes foram desenvolvidos 2 sistemas de monitorização: a linhagem de Atribuição Filogenética de Surto Global Nomeado (PANGO) (Rambaut *et al.*, 2020) e os sistemas NextStrain (Hodcroft, 2021).

Os dados obtidos através da sequenciação do genoma permitiram a categorização das variantes do SARS-CoV-2 em três grupos, de acordo com o risco que representam para a saúde pública (Organização Mundial de Saúde, 2021):

- Variantes de Preocupação (VOC do inglês, *Variants of Concern*): correspondem às variantes caracterizadas por um aumento na transmissibilidade e virulência ou diminuição na eficácia de medidas de saúde pública praticadas, medidas sociais e terapêuticas disponíveis.
- Variantes de Interesse (VOI do inglês, *Variants of Interest*): diz respeito às variantes onde se verificou a disseminação na comunidade em vários casos ou agrupamentos ou foi detetada em vários países.
- Variantes sob monitorização (VUM do inglês, *Variants Under Monitoring*): são definidas como variantes com alterações genéticas suspeitas que possam afetar as características do vírus com alguma informação de que possa representar um risco para a saúde e segurança pública no futuro.

As variantes classificadas como VOC, até à data de elaboração deste trabalho, estão sumarizadas na tabela 2.

Tabela 2: Variantes do SARS-CoV-2 classificadas como VOC pela OMS. Adaptado de: SARS-CoV-2 Variants: *Therapeutics and Diagnostics*, OMS (Organização Mundial de Saúde, 2021).

Nomenclatura OMS	Linhagem Pango	Clade/linhagem GISAID	Status	País de Origem
<i>Alpha</i>	B.1.1.7	GRY (formalmente GR/501Y.V1)	VOC:18-dezembro-2020	Reino Unido; setembro 2020
<i>Beta</i>	B.1.351	GH/501Y.V2	VOC:18-dezembro-2020	África do Sul; maio 2020
<i>Gamma</i>	P.1	GR/501Y.V3	VOC:11-janeiro-2021	Brasil; novembro-2020
<i>Delta</i>	B.1.617.2	G/478K.V1	VOC:11-maio-2021	Índia; outubro-2020
<i>Omicron</i>	B.1.1.529	GRA	VOC:26-novembro-2021	Países Sul Africanos-novembro-2021

5.2.1.1 Variante *Alpha* (B.1.1.7)

Esta variante contém mutações na proteína S que incluem a mutação RBD e deleções no domínio N-terminal, nas posições 69-70 e 144 (Tao *et al.*, 2021). A deleção da posição 69-70 impede a amplificação de um dos três segmentos genéticos num teste de diagnóstico de RT-PCR, que utiliza como sequência alvo a região do domínio de ligação ao receptor RBD do genoma do *SARS-CoV-2*, resultando num fenómeno conhecido como *S-gene target failure* (SGTF) (Tao *et al.*, 2021; Volz *et al.*, 2021)

Esta variante foi responsável pela maioria das infeções nos Estados Unidos da América e na maioria dos países europeus (Gangavarapu *et al.*, 2022; Hodcroft, 2021; Tao *et al.*, 2021).

Estudos epidemiológicos apontam para uma taxa de transmissão e mortalidade 50% superior às variantes que circulavam anteriormente no Reino Unido (Davies *et al.*, 2021; Leung *et al.*, 2021; Tao *et al.*, 2021; Volz *et al.*, 2021;).

5.2.1.2 Variante *Beta* (B.1.351)

A variante *Beta* é caracterizada pela presença de três mutações no RBD e cinco mutações domínio N-terminal (Tao *et al.*, 2021; Tegally *et al.*, 2021). Esta variante esteve associada ao aumento de casos diários na África do Sul de aproximadamente 2.000 para 20.000 desde outubro de 2020 a janeiro de 2021. Contudo não se sabe se a variante *Beta* está associada a cargas virais mais elevadas ou a uma elevada gravidade da doença porque, uma vez que, quando detetada já não se verificava a co-circulação com outras variantes. No entanto, é importante salientar que em junho de 2021 a variante *Beta* chegou a representar mais de 50% das infeções em muitos países da África Subariana (Gangavarapu *et al.*, 2022; Hodcroft, 2021; Tao *et al.*, 2021).

5.2.1.3 Variante *Gamma* (P.1)

A variante *Gamma* contém três mutações no RBD (Faria *et al.*, 2021; Tao *et al.*, 2021). Esta variante, foi inicialmente detetada no Brasil com uma taxa de infeção acima do que seria esperado face à percentagem de população previamente infetada. Este facto levanta a questão de que se esta variante poderá infetar indivíduos previamente infetados com outras variantes (Buss *et al.*, 2021; Faria *et al.*, 2021; Sabino *et al.*, 2021; Tao *et al.*, 2021). Estima-se que resulte em cargas virais 3 a 4 vezes superiores do que as variantes anteriores e seja responsável por uma mortalidade estimada de 1,1 a 1,8 vezes maior (Faria *et al.*, 2021; Tao *et al.*, 2021). Em junho de 2021, a variante *Gamma* foi responsável por uma elevada percentagem de infeções em vários países da América do Sul e Caraíbas e 10% das infeções nos EUA (Tao *et al.*, 2021; Washington *et al.*, 2021).

5.2.1.4 Variante *Delta* (B.1.617.2)

A variante *Delta* contém mutações no RBD, uma mutação no local de clivagem da furina proximal, várias mutações na região ORF3 e ORF7 e uma mutação no gene da nucleocápside (Tao *et al.*, 2021). A principal preocupação com esta variante prende-se com o facto de diminuir a eficácia das vacinas. (Mlcochova *et al.*, 2021; C. Liu *et al.*, 2021; J. Liu *et al.*, 2021; Planas *et al.*, 2021; Tao *et al.*, 2021;)

Esta variante surgiu na Índia no início de 2021, tendo sido responsável por uma elevada percentagem de infeções por SARS-CoV-2. Esta variante demonstrou uma elevada transmissibilidade, disseminando-se por 54 países e substituindo rapidamente a variante *Alpha* no Reino Unido (Tao *et al.*, 2021; Thomas *et al.*, 2021) e nos EUA (Tao *et al.*, 2021; Washington *et al.*, 2021).

5.2.1.5 Variante *Omicron* (B.1.1.529)

A variante *Omicron* possui pelo menos 30 substituições de aminoácidos na proteína S e 15 mutações no domínio de ligação ao recetor (RBD) (Meo *et al.*, 2021). Os primeiros casos desta variante foram relatados no início de novembro de 2021, no Botswana e na África do Sul. (Meo *et al.*, 2021; WHO, 2021).

O grupo de cientistas Saxena *et al.*, 2022 realizou um estudo filogenético, com base no maior número de mutações identificadas na proteína S, em que constataram que a variante *Omicron* é a variante mais divergente do SARS-CoV-2 inicialmente sequenciado (Saxena *et al.*, 2022). Esta constatação pode significar que esta variante possa ter um índice de transmissibilidade e infetividade superior às restantes, bem como uma baixa efetividade da imunidade gerada por infeções com outras variantes genéticas e das vacinas atualmente disponíveis (CDC, 2021; WHO, 2021). Até à data de elaboração deste trabalho a variante *Omicron* foi a última variante classificada como VOC.

Embora as variantes do SARS-CoV-2 difiram nas taxas de transmissão, gravidade da doença e risco de reinfeção, não há evidências de que sejam afetadas diferencialmente por medidas de saúde pública, como o uso de equipamentos de proteção individual (máscaras respiratórias) e o distanciamento social (Tao *et al.*, 2021).

5.3 Patogenicidade

Como referido anteriormente, no trato respiratório superior, o SARS-CoV-2 infeta células humanas através da afinidade da proteína S com o recetor ACE2 (do inglês, *Angiotensin-converting enzyme 2*) presente na superfície da membrana celular (Cevik *et al.*, 2020; Harrison *et al.*, 2020; Meyerowitz *et al.*, 2021;). Após a ligação ao recetor ACE2 na célula-alvo, a proteína *spike* é clivada pela serina protéase transmembranar TMPRSS2 no sítio S2. Essa clivagem ativa a subunidade S2 para fundir as bicamadas lipídicas virais e do hospedeiro, libertando o complexo ribonucleoproteico viral na célula (Shulla *et al.*, 2011; Coutard *et al.*, 2020). A entrada do vírus na célula-alvo, leva à libertação do seu RNA para o núcleo das células infetadas, levando ao início da produção das proteínas virais, ocorrendo a replicação viral de forma descontrolada (Meyerowitz *et al.*, 2021). A célula-alvo deixa de transcrever e traduzir o seu DNA, passando a efetuar a transcrição e tradução do genoma viral. Se o vírus não for eliminado por resposta inata ou adaptativa, este dissemina-se para o trato respiratório inferior por inalação de partículas virais do trato respiratório superior ou por disseminação gradual ao longo da árvore traqueobrônquica (Cevik *et al.*, 2020; Harrison *et al.*, 2020).

O vírus atinge as estruturas onde são efetuadas as trocas gasosas no pulmão e infecta células alveolares do tipo II. Tanto o SARS-CoV-2 como o vírus da gripe infetam preferencialmente células do tipo II em comparação com células do tipo I (Mason, 2020; Mossel *et al.*, 2008; Weinheimer *et al.*, 2012). O SARS-CoV-2 propaga-se dentro das células do tipo II, onde são libertadas um grande número de partículas virais (Mason, 2020). O resultado patológico da infecção por SARS-CoV-2 e, consequentemente, da COVID-19 é um dano alveolar disseminado com membranas hialinas ricas em fibrina e algumas células gigantes multinucleadas (Mason, 2020; Xu *et al.*, 2020). Os indivíduos idosos estão particularmente em risco devido à sua resposta imunitária diminuída e à sua capacidade reduzida de reparar o epitélio danificado. Os idosos também têm uma depuração muco ciliar reduzida, o que pode permitir que o vírus se propague mais facilmente no trato respiratório (Ho *et al.*, 2001; Mason, 2020).

6. Diagnóstico Laboratorial

As características do novo coronavírus, como a elevada transmissibilidade entre indivíduos e a variabilidade de manifestações clínicas associadas à infeção, tornam o diagnóstico laboratorial uma ferramenta importantíssima no combate da pandemia. A sinalização precoce da doença e o isolamento dos doentes, levam à diminuição da propagação do vírus e consequentemente à proteção de indivíduos mais vulneráveis passíveis de desenvolver quadros clínicos agudos (Harapan *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2021). Deste modo, torna-se fundamental desenvolver e aplicar metodologias de diagnóstico eficazes e com capacidade de detetar a infeção por SARS-CoV-2 desde quadros assintomáticos a quadros sintomáticos agudos (Kevadiya *et al.*, 2021).

O diagnóstico da infeção por SARS-COV-2 é baseado em 3 componentes, são estes: sintomas clínicos, dados epidemiológicos e resultado de um teste diagnóstico à presença de ácido ribonucleico do vírus SARS-CoV-2 (Kevadiya *et al.*, 2021; Udugama *et al.*, 2020). Deste modo o diagnóstico laboratorial tem 3 principais objetivos: 1) deteção RNA viral, especialmente em indivíduos com baixa carga viral, diminuindo assim a ocorrência de falsos negativos; 2) deteção correta da diferenciação entre diferentes organismos patogénicos, reduzindo a existência de falsos positivos; 3) alto rendimento, com baixo custo e pouco tempo para a obtenção do resultado (Younes *et al.*, 2020). Outro fator que torna o diagnóstico laboratorial a chave para a mitigação desta pandemia é o facto de os sintomas desenvolvidos serem comuns a outras infeções virais do trato respiratório superior e inferior, como a infeção pelo vírus Influenza (gripe), sendo por isso necessário um teste específico para a presença do SARS-COV-2 (Harapan *et al.*, 2020). Posto isto, é imprescindível o correto diagnóstico laboratorial e confirmação de infeção pelo novo coronavírus. A determinação da presença do vírus aliada a uma avaliação clínica e epidemiológica de cada indivíduo, leva à obtenção de um diagnóstico rápido e correto, o que permite isolar os indivíduos infetados o mais cedo possível (Udugama *et al.*, 2020).

6.1 Real-Time reverse-transcription Polymerase Chain Reaction

O rRT-PCR (do inglês, Real-Time reverse-transcription Polymerase Chain Reaction) é uma técnica de biologia molecular que tem como objetivo a deteção e amplificação de sequências genéticas alvo. É uma técnica altamente sensível e específica na amplificação de ácido desoxirribonucleico (DNA do inglês, *deoxyribonucleic acid*) (Emery *et al.*, 2004; Udugama *et al.*, 2020).

O rRT-PCR é considerado o método *gold standart* no diagnóstico de infeções agudas do trato respiratório (Kevadiya *et al.*, 2021; Tahamtan & Ardebili, 2020). Esta técnica consiste na extração de RNA viral de exsudados nasofaríngeos, orofaríngeos ou nasais (com recurso a zaragatoa), aspirados do trato respiratório superior ou inferior, lavado bronco-alveolar e expetoração (Kevadiya *et al.*, 2021; Tahamtan & Ardebili, 2020; Tsang *et al.*, 2021). Após a extração, procede-se ao isolamento e conversão do RNA viral em DNA complementar (cDNA), através da enzima transcriptase reversa. Uma vez que o SARS-COV-2 é um vírus de RNA esta enzima vai realizar a conversão necessária de RNA para DNA. Por último ocorre a amplificação do cDNA (DNA complementar) da amostra através da reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR), com recurso à utilização de *primers* específicos de genes virais e sondas de hidrólise marcadas com fluorocromo (Pfefferle *et al.*, 2020; Sule & Oluwayelu, 2020; Tsang *et al.*, 2021). Pode ver-se a descrição da técnica na figura 3.

A primeira etapa desta técnica produz cadeias complementares de DNA, de forma a serem usados na segunda etapa, onde o número de cópias do DNA é amplificado ao longo da repetição dos ciclos térmicos. Os *primers* específicos do gene alvo direcionam a etapa de amplificação apenas para a região selecionada do genoma (Tsang *et al.*, 2021). Os testes de rRT-PCR disponíveis para o diagnóstico de infeção por SARS-CoV-2 podem incluir os seguintes genes como alvo: S (do inglês, *spike*), a RNA dependente RNA polimerase (RdRp), o invólucro (E do inglês, *Envelop*) e a nucleoproteína (N) (Tsang *et al.*, 2021). Em Portugal, segundo a Direção Geral de Saúde Portuguesa (DGS), para que um caso suspeito de infeção por SARS-CoV-2 seja confirmado é necessário que o teste laboratorial rRT-PCR para este vírus, seja positivo para no mínimo dois genes alvo distintos e que pelo menos um destes seja específico para SARS-CoV-2 diferenciando-o dos outros coronavírus (Orientação DGS 015/2020) (Direção Geral de Saúde, 2020).

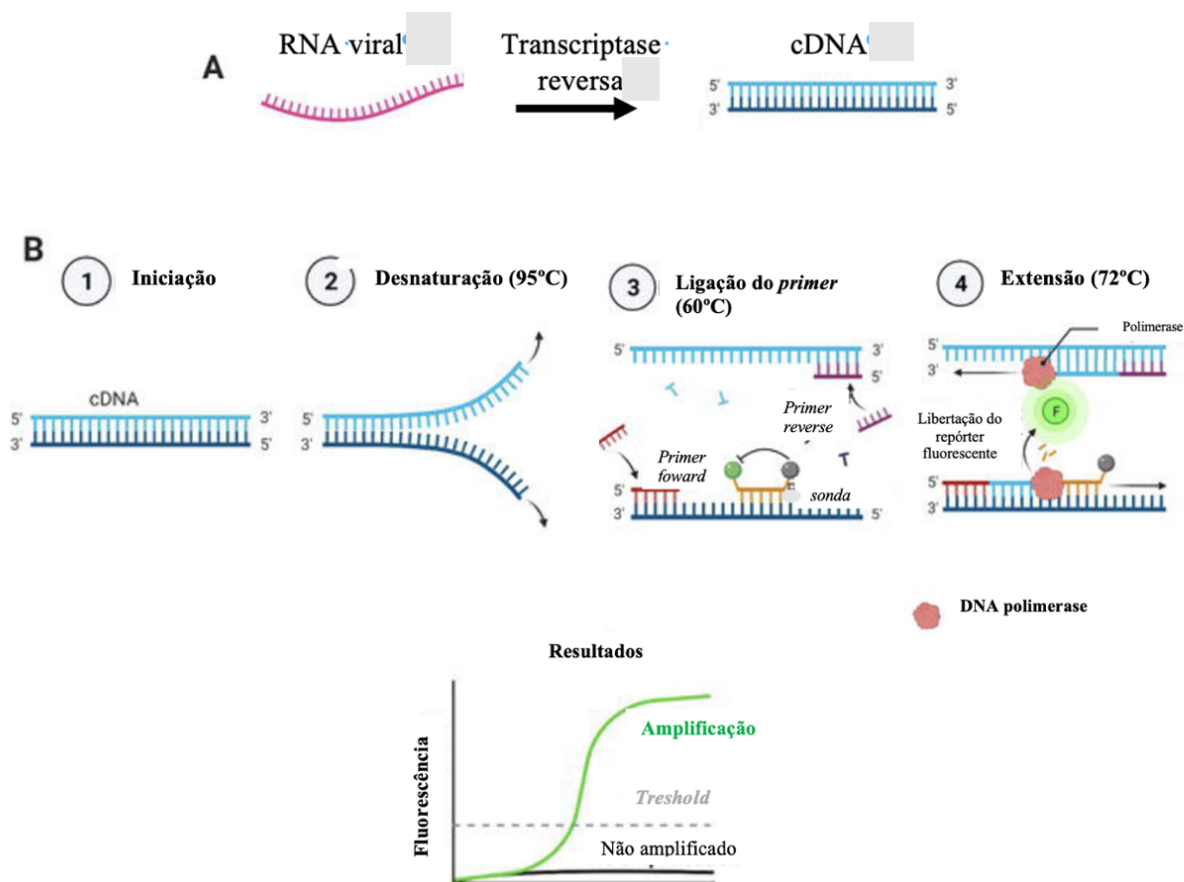


Figura 3: Representação gráfica da técnica RT-PCR. (A) O RNA viral de cadeia simples é convertido em DNA de cadeia dupla pela enzima transcriptase reversa. (B) Na PCR, o cDNA (DNA complementar) atua como molde (1). As duas cadeias do cDNA são separadas (desnaturadas) através de altas temperaturas (2). Isso permite o emparelhamento dos *primers* (para frente e para trás) e da sonda com suas regiões complementares nas cadeias de DNA do molde (3). A DNA polimerase estende os *primers* para sintetizar novas cadeias de DNA. Neste processo, ocorre a separação do repórter fluorescente (F) e do supressor (T). (C) Explicação da geração do sinal de leitura. No estado fundamental, o supressor está próximo ao repórter e, portanto, suprime sua emissão. Após clivagem pela polimerase (durante a etapa de extensão), o repórter é libertado. Isso alivia sua inibição, produzindo assim um sinal fluorescente. Assim, com um aumento na amplificação do DNA molde, há um aumento correspondente no sinal fluorescente detectável. Adaptado de Chittoor-Vinod, V. (2021).

Esta técnica permite uma aproximação à quantificação de partículas virais presentes na amostra, através do resultado obtido em Ct (do inglês, *Cycle threshold*). O Ct corresponde ao número de ciclos necessários para que a fluorescência exceda o *threshold* definido com base nos sinais de fluorescência inespecíficos (*background*) (Mackay *et al.*, 2002). Desta forma, os valores de Ct são inversamente proporcionais à quantidade de RNA viral presente na amostra, ou seja, quanto menor for o valor de Ct, maior é a quantidade de carga viral presente na amostra em estudo (Aranha *et al.*, 2021; Mackay *et al.*, 2002; Singanayagam *et al.*, 2020). De acordo com a DGS, o valor de Ct no qual todos os valores acima registrados são considerados como amostras negativas na pesquisa de SARS-CoV-2 é de 35 (Orientação DGS 015/2020) (Direção Geral de Saúde, 2020).

A OMS relatou que a carga viral mais alta em amostras do trato respiratório superior, que ocorre entre 0 e 4 dias após o início dos sintomas, diminui para metade (54%) após 10 a 14 dias (Guan *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020; WHO, 2020). No entanto, como o valor de Ct não está ainda *standartizado* e depende de variáveis analíticas, o resultado do diagnóstico da infeção por SARS-CoV-2 apenas é fornecido ao utente como um resultado qualitativo, ou seja, amostras com um Ct superior a 35 são classificadas como amostras negativas, enquanto amostras com Ct inferiores a 35, são classificadas como positivas (Aranha *et al.*, 2021; Singanayagam *et al.*, 2020; A. Walker, *et al.*, 2021).

A RT-PCR permite a visualização, em tempo real, ciclo a ciclo, com elevada especificidade e sensibilidade de acordo a intensidade de fluorescência (Mackay *et al.*, 2002).

A sensibilidade de um teste de diagnóstico laboratorial corresponde à porção de indivíduos infetados, neste caso, pelo SARS-CoV-2 e diagnosticados de maneira correta pelo teste; enquanto a especificidade corresponde à porção de indivíduos não doentes e que o teste classifica corretamente (Alta sensibilidade -> ocorrência de poucos falsos negativos, alta especificidade -> ocorrência de poucos falsos positivos) (Burtis & Bruns, 2016).

O método de diagnóstico RT-PCR é importante nos estágios iniciais da infeção do SARS-CoV-2, por detetar diretamente o ácido nucleico do vírus, antes de se iniciar a produção de anticorpos. Deste modo, é possível identificar a infeção quando o seu nível de transmissibilidade é ainda muito baixo. (Sheikhzadeh *et al.*, 2020).

Para além disso, esta técnica pode ser executada numa grande diversidade de amostras, desde amostras do trato respiratório superior (exsudados nasofaríngeos, orofaríngeos, aspirados nasais, lavagem nasal ou saliva) a amostras do trato respiratório inferior (lavagem bronco alveolar, expetoração ou aspirado traqueal) (Sheikhzadeh *et al.*, 2020). No entanto, existem diferenças ao nível da sensibilidade da técnica consoante o tipo de amostra utilizada (European Centre for Disease Prevention and Control [ECDPC], 2020). O ECDC sugere que a combinação de amostras de exsudados orofaríngeos e nasofaríngeos, são o tipo de amostra que demonstra maior sensibilidade no teste de diagnóstico RT-PCR quando comparado apenas com o exsudado nasofaríngeo (ECDPC,

2020). As amostras do trato respiratório inferior não são viáveis para o diagnóstico laboratorial da infecção por *SARS-CoV-2*, uma vez que requerem a utilização de um dispositivo médico de aspiração, um operador qualificado e ainda o seu manuseamento oferece um maior risco de contaminação para o profissional que realiza a colheita (Yang *et al.*, 2020).

Para que o teste molecular seja eficiente, a fase ideal de recolha de amostras deverá ser nos primeiros sete dias após o início dos sintomas, de modo que o diagnóstico seja efetuado na fase aguda da doença (Lai & Lam, 2021).

As limitações associadas a esta técnica estão associadas à fase pré analítica e analítica do processo. Os erros analíticos que podem ocorrer durante a execução da técnica RT-PCR poderão ser originários, por um lado, do mau funcionamento do equipamento, de ensaios não validados de forma adequada ou por uma falha não detetada pelo controlo de qualidade. Por outro lado, o erro pode ter por base a variabilidade na sequência do RNA viral, o momento da colheita- fora da janela de diagnóstico, *primers* ou sondas desadequadas e *anealling* não específico (Rahbari *et al.*, 2021; Vandenberg *et al.*, 2021; Younes *et al.*, 2020). Outros dos problemas associados à técnica é a existência de variabilidade nos protocolos de extração que podem comprometer a eficiência da PCR (Huggett *et al.*, 2005).

Um ponto importante a ter em conta é que o vírus SARS-CoV-2 tem como material genético o RNA que é uma molécula instável e de fácil degradação. Assim sendo, a colheita e armazenamento devem ser realizados de forma adequada para evitar interferências com a técnica, nomeadamente contaminações (Rahbari *et al.*, 2021; Vandenberg *et al.*, 2021; Younes *et al.*, 2020).

É importante ressaltar que a sensibilidade da RT-PCR varia de acordo com o tipo de amostra e é diretamente proporcional à quantidade de carga viral presente na amostra (Afzal, 2020; P. Walker *et al.*, 2020). Assim sendo, o período da colheita e o controlo da fase analítica deve ser respeitado para uma maior eficiência do teste. De salientar que uma baixa carga viral, associada sobretudo a indivíduos assintomáticos, uma infecção muito inicial ou com tratamento antiviral ativo pode traduzir-se em resultados falsos-negativos (P. Walker *et al.*, 2020).

As desvantagens descritas salientam que a maior parte das limitações deste teste de diagnóstico laboratorial RT-PCR são na realidade externas à técnica em si. Desta forma, o RT-PCR é considerado o *gold-standart* por ser uma técnica com uma elevada

sensibilidade e especificidade na detecção de RNA viral do novo coronavírus, confirmando sempre o diagnóstico de COVID-19 (Martín *et al.*, 2021).

6.2 Amplificação mediada por Transcrição- Aptima™

A técnica Aptima - amplificação mediada por transcrição (TMA do inglês, *Transcription-Mediated Amplification*) para a detecção qualitativa de ácido ribonucleico de SARS-CoV-2. É um método de diagnóstico molecular automatizado para o equipamento Hologic® Panther platform, desenvolvido pela empresa Hologic, Inc., San Diego, CA (Aptima- SARS-CoV-2, *W-21492-001*) (Aptima, 2022). Este método foi desenvolvido para maximizar o rendimento dos testes de diagnóstico molecular em laboratórios de referência, hospitalares e em laboratórios de proximidade. (Aptima, 2022). É utilizado para a detecção qualitativa de RNA viral de SARS-CoV-2 de duas regiões alvo, ORF1a e ORF1b, com recurso a três etapas: extração e purificação, amplificação e detecção de RNA. As amostras de RNA viral são provenientes de exsudados nasofaríngeos, orofaríngeos e nasais ou ainda de lavados/aspirados nasofaríngeos e nasais (Aptima, 2022).

Este teste utiliza esferas magnéticas para a captura do RNA-alvo que possuem sequências de DNA complementar das regiões ORF1ab do RNA do SARS-CoV-2. Estas cadeias complementares vão hibridar com o RNA alvo presente na amostra. Através da ação da enzima, transcriptase reversa (RT do inglês, *Reverse Transcriptase*), o RNA-alvo é transcrito em cDNA. De seguida, por ação de outra enzima, a RNase, a cadeia de RNA-alvo é degradada, seguindo-se a produção de uma cadeia complementar à cadeia de cDNA, pela ação da enzima RT. Desta forma é produzido uma dupla cadeia de DNA, da região alvo ORF1a e ORF1b do RNA do SARS-CoV-2. Por último, por ação da RNA polimerase são produzidas inúmeras cópias do transcrito-alvo. Desta forma, cada uma das cópias é replicada pela RT e amplificada num processo cíclico (Aptima, 2022).

A detecção do RNA viral presente na amostra ocorre sempre que é amplificado e transcrito uma cadeia de cDNA, pois esta técnica utiliza o ensaio HPA (do inglês, *Hybridization Protection Assay*). Esta técnica de hibridização utiliza uma sonda de DNA específica com uma molécula que contém éster de acridina, que emite um sinal quimioluminescente, sempre que é hibridizada com o RNA produzido na reação. Assim, como cDNA é reutilizado, permite o aumento exponencial de fragmentos de RNA amplificados, o que permite a detecção de cargas virais mais baixas. Outra grande vantagem deste método é o facto de todo o processo ocorrer num único tubo de reação, o que diminui o risco de contaminações (Aptima, 2022). Os dados de desempenho analítico demonstram que o ensaio é altamente específico e sensível para detecção de RNA viral

SARS-CoV-2 e tem alta concordância clínica (100% de concordância positiva, 98,7% de concordância negativa) com um ensaio de RT-PCR validado para SARS -CoV-2 RNA. (Pham *et al.*, 2020).

Deste modo, o ensaio TMA-SARS-CoV-2 é altamente sensível e específico e fornece uma solução de teste automatizada de alto rendimento para testes de diagnóstico em larga escala para o SARS-CoV-2. O sistema de ensaio é capaz de processar e gerar resultados até 1000 amostras por dia, permitindo que, laboratórios de referência e hospitalares, laboratórios clínicos de proximidade processem e analisem com eficiência elevados volumes de amostras para a detecção de RNA SARS-CoV-2 (Craney *et al.*, 2020; Pham *et al.*, 2020; Trémeaux *et al.*, 2020).

No entanto, como todos os métodos de diagnóstico, também o TMA apresenta algumas desvantagens, como a utilização da molécula de RNA como principal alvo de detecção e amplificação, uma vez que esta é uma molécula bastante instável. Uma outra desvantagem são a disponibilidade de material e os custos monetários associados a esta técnica, uma vez que sendo uma técnica patenteada, requer a utilização de reagentes e um equipamento específicos e de marca única, e que depende de um único fornecedor (Craney *et al.*, 2020; Pham *et al.*, 2020; Trémeaux *et al.*, 2020).

6.3 Amplificação Isotérmica mediada por Loop (LAMP)

Assim como a técnica RT-PCR, o RT-LAMP (do inglês, *Reverse Transcriptase Loop-mediated isothermal amplification*) utiliza uma enzima, a transcriptase reversa (RT) que é uma enzima capaz de sintetizar DNA utilizando RNA como molde. A nível da recolha da amostra, enquanto o RT-PCR, *gold standart* para diagnóstico de COVID-19, utiliza uma zaragatoa nasal para colher a amostra da mucosa do paciente, a qual é submetida à extração de RNA e à amplificação por RT-PCR. O RT-LAMP utiliza amostras de saliva que podem ser colhidas pelo próprio paciente. A etapa de amplificação do RT-LAMP ocorre numa única faixa de temperatura, 60 a 65°C, diferente do RT-PCR cuja reação ocorre em três temperaturas diferentes (etapas de desnaturação, *annealling* e amplificação) (Fowler *et al.*, 2021; Kitajima *et al.*, 2021; Mori & Notomi, 2009).

Em detalhe, a técnica RT-LAMP consiste em converter o RNA em cDNA (DNA complementar) por meio da enzima transcriptase reversa (RT do inglês, *Reverse Transcriptase*). Podem ser usados entre quatro a seis *primers* para a amplificação, dos quais dois são internos (FIB e BIP) e funcionam como base para a enzima DNA polimerase Bst (Bst, *Bacillus stearothermophilus* – resistente ao calor) iniciar a síntese da cadeia de cDNA. Por outro lado, os dois *primers* externos (F3 e B3) reconhecem a cadeia molde e fazem a extensão da cadeia de cDNA (Fowler *et al.*, 2021; Kitajima *et al.*, 2021).

A amplificação tem início quando um *primer* interno (F2) se liga ao seu receptor (F2c) (presente na amostra de RNA alvo) e começa a criar uma cadeia complementar no sentido 5' – 3'. Em seguida um *primer* externo (F3) liga-se ao seu receptor na cadeia complementar (F3c) e cliva o primeiro produto da cadeia complementar (F1c), que irá formar uma alça (*loop*). Isto acontece, porque o *primer* FIP se liga a ele mesmo, ou seja, a porção F1 da cadeia complementar, liga-se à porção F1c, da cadeia complementar, formando uma alça, como está demonstrado na figura 4. De seguida, ocorre o mesmo processo com o *primer* BIP, onde o *primer* interno (B2) se liga ao seu recetor (B2c) e cria uma cadeia complementar no sentido 3' – 5'. Assim, o *primer* externo de BIP, o B3, liga-se ao produto da cadeia molde B3c e começa a clivar o produto da cadeia complementar que estava a ser criado. Dessa forma o *primer* B1 liga-se com o B1c formando-se uma alça que segue até o fim da amplificação (Fowler *et al.*, 2021; Kitajima *et al.*, 2021).

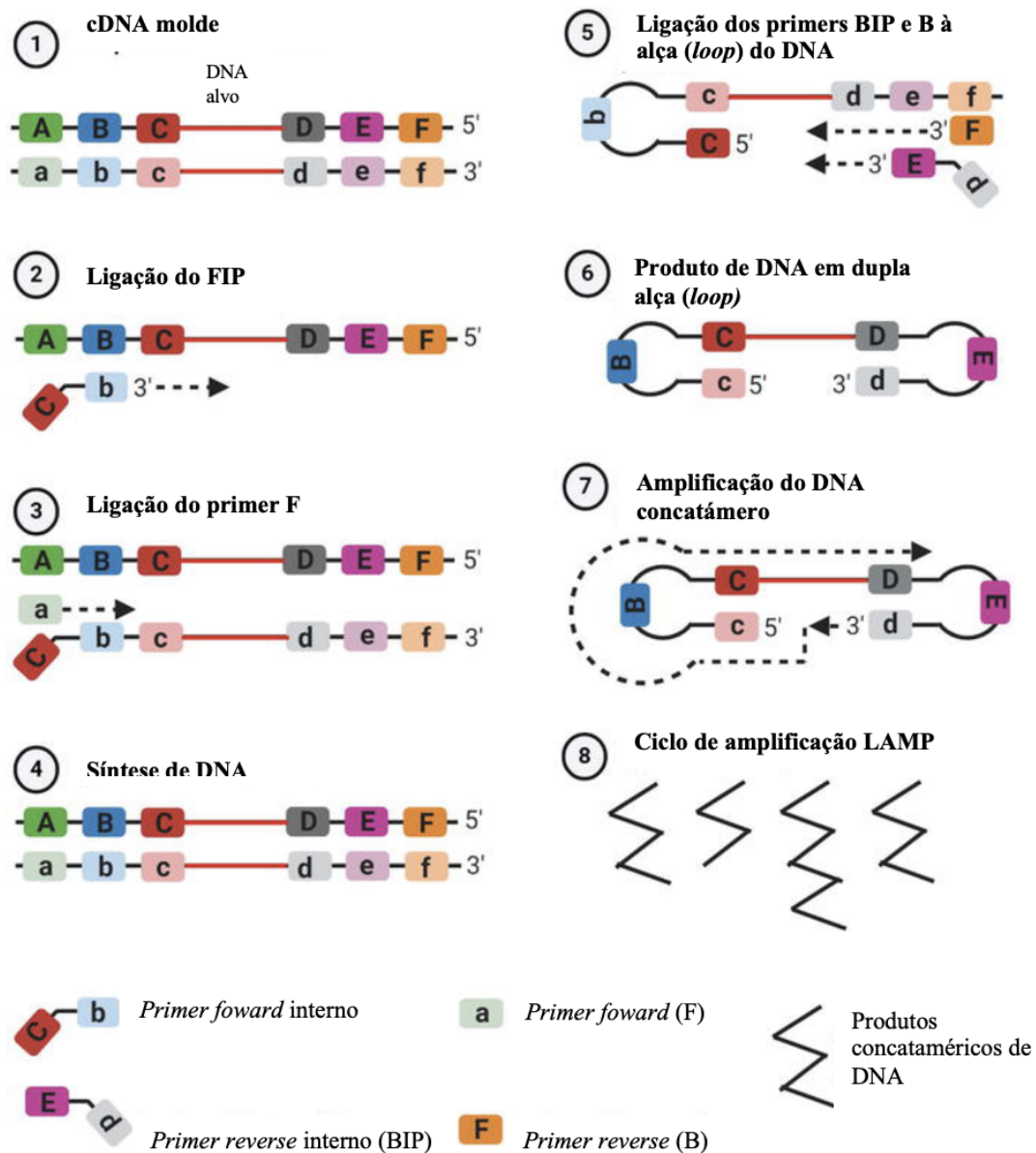


Figura 4: Representação gráfica de como ocorre a amplificação no método de diagnóstico laboratorial RT-LAMP. No exemplo pode ser observado seis regiões específicas escolhidas (A, B, C, D, E, F) que flanqueiam o DNA alvo de forma a delinear os primers (1). O *primer interno forward* (FIP, do inglês *forward inner primer*) entra no DNA alvo. Este primer engloba uma região complementar (C) em sua extremidade 5' (2). A nova cadeia sintetizada com o primer FIP é deslocada pelo primer forward (3). Os produtos de DNA sintetizados pelo primer forward são semelhantes ao molde de cDNA original (4). Devido à região de complementar no primer FIP, ele dobra-se sobre si mesmo formando uma alça. Esta cadeia é invadida pelo primer interno backward (BIP, do inglês *backward inner primer*) e pelo primer reverso backward (5). O produto formado pelo BIP na cadeia do FIP leva a duas alças nas extremidades, formando uma estrutura em forma de haltere (6). Essas cadeias podem ser estendidas para formar produtos de DNA concateméricos (7). Produtos concateméricos de comprimentos variáveis (8). Adaptado de: Chittoor-Vinod, 2021.

Os resultados do RT-LAMP podem ser interpretados de forma colorimétrica. A leitura do pH ocorre com o corante vermelho fenol. Quando o pH está entre 8,2 – 8,6, a amostra fica no tom de rosa, o que quer dizer que o resultado é negativo, e quando o pH se torna mais ácido, a amostra adquire uma coloração amarela que quer dizer que o teste teve resultado positivo. O pH é alterado pela atividade da DNA polimerase, isto é, enquanto a DNA polimerase está em atividade ela reduz o pH. Isso modifica a cor do vermelho fenol de rosa para amarelo, o que torna o teste positivo, indicando a presença do vírus na amostra (Fowler *et al.*, 2021; Kitajima *et al.*, 2021; Taleghani, & Taghipour, 2021).

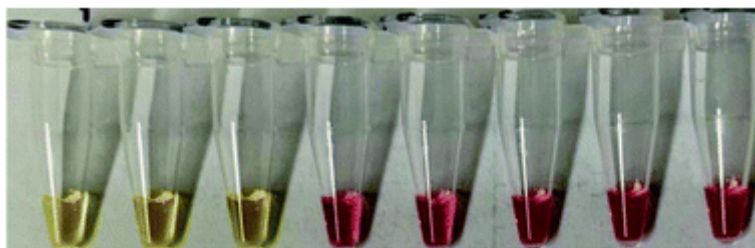


Figura 5: Representação de leitura colorimétrica do método RT-LAMP. Cor amarelo: amostra positiva (RNA de SARS-CoV-2 detetado); Cor vermelha: amostra negativa para SARS-CoV-2. Adaptado: Nawattanapaiboon *et al.*, 2021.

Devido à pandemia, foram desenvolvidos e validados vários estudos com a técnica RT-LAMP para o diagnóstico da infecção por SARS-CoV-2 (Park *et al.*, 2020; Yan *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2020). Recentemente foi também desenvolvido, um método de detecção de *endpoint* usando calceína, cuja fluorescência é extinta pela ligação de íons de manganês. Como os íons de manganês são ligados por íons de pirofosfato produzidos no decorrer da reação de amplificação, a calceína produz fluorescência brilhante numa reação positiva. (Tomita *et al.*, 2008).

Os cientistas Park *et al.*, 2020 desenvolveram uma metodologia de RT-LAMP para a detecção de SARS-CoV-2 visando a região Nsp3 do vírus. Esta técnica pode detetar até 100 cópias por reação do RNA SARS-CoV-2 (Park *et al.*, 2020). Outro grupo de cientista japoneses avaliou um kit RT-LAMP comercialmente disponível (Loopamp® 2019-SARS-CoV-2 Detection Reagent Kit, 2019) que demonstrou uma alta sensibilidade com limite de detecção de $1,0 \times 10^3$ cópias/ μL em 35 min. Além disso, o kit method-iLACO (método isotérmico baseado em LAMP para COVID-19) detetou a presença de SARS-CoV-2 tão baixo quanto 10 cópias por reação (Yu *et al.*, 2020).

O método LAMP possui várias vantagens na sua utilização: não necessita de purificação das amostras, devido à maior resistência da enzima RNA polimerase que é

usada na técnica; utiliza uma temperatura constante (condições isotérmicas), permitindo o uso de equipamentos simples de PCR (termocicladores) ou o uso de banhos-térmicos (Fowler *et al.*, 2021; Taleghani & Taghipour, 2021). O produto da reação forma uma mistura de DNA com tamanhos e estruturas específicas, o que torna a técnica mais seletiva e aumenta a sensibilidade. A técnica é extremamente específica para a sequência alvo, já que possui até seis sequências de *primers* específicos e não utiliza sondas fluorescentes para análise, o que torna o ensaio mais económico e sem necessidade de importação de reagentes. Podem ser utilizados corantes, o que torna a técnica capaz de ser observada em tempo real sem a necessidade de um equipamento de leitura (Taleghani & Taghipour, 2021).

Porém, esta técnica possui algumas desvantagens que requerem alguma atenção e experiência para a sua execução e obtenção de resultados válidos. O LAMP apresenta restrições na execução do desenho dos *primers*, não permitindo a leitura de vários alvos ao mesmo tempo. Existe ainda o risco de contaminação de outras pessoas durante o manuseamento da amostra, especialmente quando se trata de amostra de saliva, uma vez que o vírus ainda pode estar ativo (Kitajima *et al.*, 2021; Taleghani & Taghipour, 2021).

O RT-LAMP surgiu como uma nova abordagem para o diagnóstico molecular da COVID-19. Pretende ser uma técnica mais rápida e ter a mesma eficácia que o RT-PCR (Kitajima *et al.*, 2021; Taleghani & Taghipour, 2021).

Apesar das desvantagens, este método demonstrou ser altamente sensível na deteção de RNA viral do SARS-CoV-2, necessitando de aproximadamente uma hora para a obtenção de resultados (Kitajima *et al.*, 2021; Taleghani & Taghipour, 2021). A interpretação dos resultados obtidos é facilmente observada, não requerendo conhecimentos de biologia molecular. Adicionalmente, não necessita de instalações com níveis de biossegurança acima do nível 1, nem técnicos especializados na execução da técnica, podendo ser executada por indivíduos sem especialização analítica (Kitajima *et al.*, 2021; Mautner *et al.*, 2020).

Como este método não apresenta reatividade cruzada com outros vírus patogénicos do trato respiratório, é considerado um método ideal de diagnóstico molecular rápido (Mautner *et al.*, 2020).

6.4 Teste Rápido de Antígeno

O teste rápido de diagnóstico de antígeno de SARS-CoV-2 é um ensaio imunocromatográfico de fluxo lateral (Figura 6). Os testes de fluxo lateral são usados para determinar qualitativamente a presença ou ausência de proteínas virais (antígeno-alvo) em amostras biológicas. Este teste é utilizado para detetar o antígeno viral (proteína N e proteína S) (European Commission - Public Health, 2022) do SARS-CoV-2 em amostras de zangaratoa nasal nasofaríngeo ou em amostras de saliva. Após a amostra ser colhida é misturada com a solução tampão e introduzida no orifício de absorção na cassete do teste. Quando a amostra é adicionada, esta flui ao longo do dispositivo de teste, passando pela almofada do conjugado para a membrana nitrocelulose e depois para a almofada absorvente. Se o antígeno alvo estiver presente na amostra liga-se ao anticorpo específico, marcado com ouro coloidal, na tira de teste. O anticorpo e o antígeno marcado formam um complexo e continuam a migrar para a zona de reação na membrana de nitrocelulose, onde são capturados por anticorpos específicos e imobilizados na membrana. Consequentemente acumulam-se na posição marcada pela letra T (teste). O resultado da reação observa-se na zona de teste uma linha colorida a olho nu devido aos conjugados de nanopartículas de alumínio (AuNP) capturados pelas moléculas de analito ligadas (Peeling *et al.*, 2021; Taleghani & Taghipour, 2021).

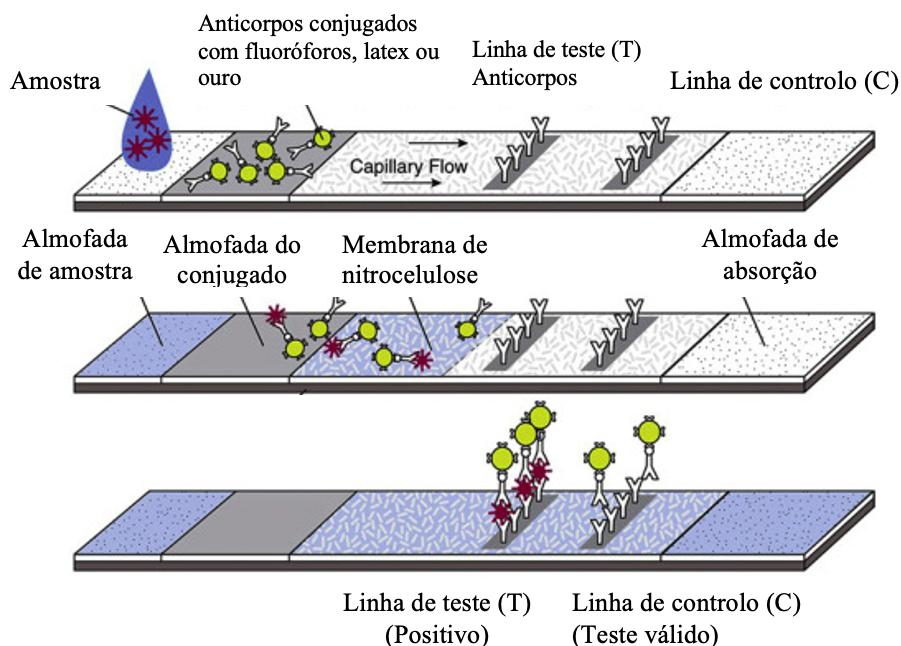


Figura 6: Princípio do ensaio imunocromatográfico. Adaptado de: Abduljalil, 2020.

O teste rápido de antígeno fornece um resultado entre 15 a 20 minutos. A interpretação dos resultados (figura 6) é realizada a olho nu, em que, se considera um resultado negativo se a linha colorida aparecer apenas na zona/linha de controlo (C) e se nenhuma linha colorida visível aparecer na zona de teste (T). Este resultado indica que não foi detetado o antígeno viral do *SARS-CoV-2* na amostra. Contrariamente, para se considerar um resultado positivo é necessário que sejam visíveis duas linhas coloridas na cassette de teste, uma na linha de controlo e outra na linha de teste. O resultado indica que na amostra analisada foi detetado o antígeno viral do *SARS-CoV-2* (Peeling *et al.*, 2021; Taleghani & Taghipour, 2021).

Importa salientar que sempre que se verificar a ausência de uma linha na zona de controlo, o resultado é considerado inválido e nenhuma conclusão deve ser considerada mais provável.

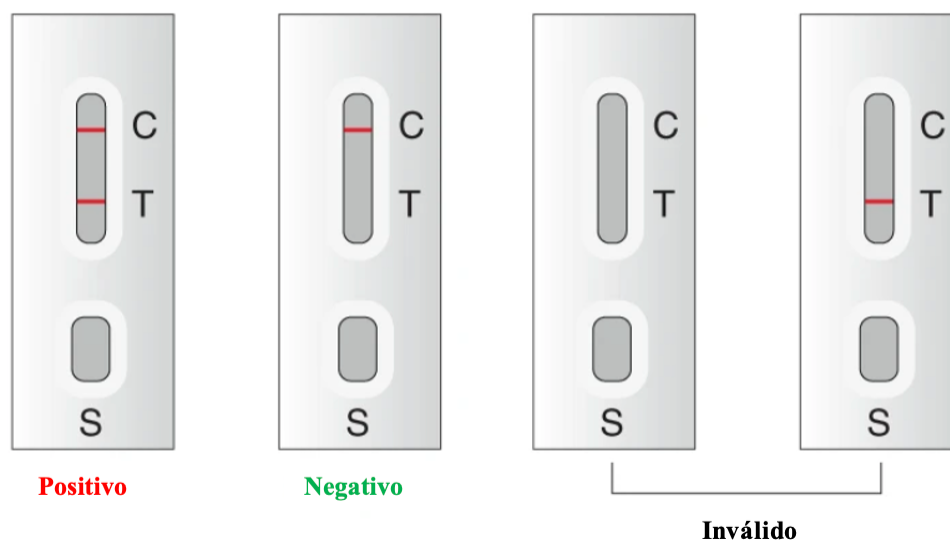


Figura 7: Interpretação dos resultados do teste rápido de antígeno para o diagnóstico de infeção ativa por SARS-CoV-2. Adaptado de: Kevadiya *et al.*, 2021

Os testes rápidos de antígeno aprovados pela comissão europeia, para a deteção laboratorial da infeção por SARS-COV-2, possuem valores de sensibilidade superior a 80% (European Commision - Public Health, 2022). Este valor foi inferido com base no resultado de testes de pacientes sintomáticos aleatórios, nos primeiros sete dias após o início dos sintomas ou participantes assintomáticos, em que o diagnóstico já tivesse sido confirmado por RT-PCR em laboratórios independentes. A especificidade destes testes é superior a 98% (European Commision - Public Health, 2022). Os antígenos detetado(s) no teste são expressos apenas durante a replicação viral. Desta forma, assim que é

estabelecida a infecção viral, esta pode ser detetada ainda nos seus estágios iniciais, o que torna este meio de diagnóstico bastante útil (Krüttgen *et al.*, 2021; Peeling *et al.*, 2021; Taleghani & Taghipour, 2021).

Apesar deste teste ser rápido, barato e de fácil manuseamento, apresenta algumas limitações, como a ocorrência de falsos positivos, bem como falsos negativos se as amostras não possuírem uma quantidade suficiente de proteína viral para produzir um teste positivo ou inconclusivo. Assim sendo, estes testes são menos sensíveis e menos precisos do que os testes moleculares. Além disso, como os testes de antigénios são qualitativos, podem ser interpretados de forma incorreta devido a erro de leitura. Se um teste de antigénio for negativo, é recomendado a realização de um teste RT-PCR confirmatório (Krüttgen *et al.*, 2021; Peeling *et al.*, 2021; Taleghani & Taghipour, 2021).

7. Comparação dos métodos de diagnóstico

A infecção provocada pelo vírus SARS-CoV-2 e o subsequente desenvolvimento da COVID-19 tornaram-se num grande problema de saúde pública em todo o mundo. Devido à sua elevada transmissibilidade e rápida disseminação é de grande importância que os métodos de diagnóstico disponíveis sejam eficazes na deteção de indivíduos infetados, quer sintomáticos quer assintomáticos, uma vez que o isolamento dos indivíduos infetados é a melhor arma no combate a esta pandemia.

Tendo em vista uma apreciação das vantagens e desvantagens dos métodos de diagnóstico utilizados atualmente, a Tabela 3 apresenta uma comparação sumária dos métodos de diagnóstico laboratorial para identificação da infecção ativa por SARS-CoV-2.

Tabela 3: Comparação dos métodos de diagnóstico laboratorial. (Mautner *et al.*, 2020)

Método de diagnóstico	Amostras	Método de deteção	Alvo de deteção	Sensibilidade	Especificidade	Tempo
RT-PCR	Exsudados nasofaríngeos, orofaríngeos, expetoração e amostras de saliva	PCR em tempo real	RNA viral	97%	96- 100%	45min-24h
TMA	Exsudados /lavados nasofaríngeos, nasais, orofaríngeos.	Amplificação mediada por transcrição	RNA viral	98%-100%	100%	3h
RT-LAMP	Exsudados nasofaríngeos e amostras de saliva	Amplificação isotérmica mediada por <i>loop</i>	RNA viral	80-100%	94- 100%	15-60 min
TrAg	Exsudados nasofaríngeos	Ensaio imunocromatográfico	Proteínas virais- Antígeno	80-95%	98-100%	15-20 min

O método de diagnóstico RT-LAMP é um método de diagnóstico molecular, que oferece resultados rápidos (15-60 min) e parece ser adequado para pacientes com carga viral relativamente alta (indivíduos com sintomas agudos). O teste rápido de antígeno é um ensaio imunocromatográfico, que oferece igualmente resultados rápidos (15-20 min), mas com sensibilidade inferior ao RT-LAMP. Estes dois métodos de diagnóstico apresentam uma elevada especificidade na deteção do SARS-CoV-2.

De acordo com as informações disponíveis na literatura, um indivíduo na fase inicial de infeção possui menor carga viral que um indivíduo numa fase de infeção mais tardia (Wiersinga *et al.*, 2020). Deste modo, o teste rápido de antígeno e o RT-LAMP são ambos adequados no diagnóstico de infeção aguda por SARS-CoV-2 em indivíduos com uma elevada carga viral. Estes dois métodos poderão não ser adequados no diagnóstico de indivíduos infetados assintomáticos, uma vez que possuem uma menor sensibilidade e por isso a deteção de baixas cargas virais pode ser comprometida. Desta forma, o teste rápido de antígeno e o RT-LAMP podem ser uma boa ferramenta de diagnóstico na fase inicial de sintomas, uma vez que são testes que fornecem um diagnóstico mais rápido e em casos de indivíduos com cargas virais mais elevadas, podem determinar em minutos o isolamento do mesmo, sendo mais aconselhável que este diagnóstico fosse confirmado pelo método *gold standart*.

Em relação ao método RT-PCR, este é considerado o método *gold standart* na confirmação da infeção ativa por SARS-CoV-2 e na confirmação do diagnóstico de COVID-19. Como referido anteriormente é um método com uma elevada sensibilidade e especificidade, no entanto, é necessário esperar algumas horas para a obtenção do resultado. Um tempo de espera mais demorado pode resultar num maior número de contágios, já que um indivíduo com suspeita de infeção ativa só fica em isolamento após um resultado positivo. Em Portugal, o teste de RT-PCR que possibilita a obtenção de resultados em 45 minutos, apenas está disponível para emergências médicas, estando apenas acessível a laboratórios hospitalares devido ao seu custo bastante elevado. No que diz respeito ao método de diagnóstico TMA, este é também um método molecular de diagnóstico com uma sensibilidade e especificidade elevadas, oferecendo uma solução de teste de diagnóstico laboratorial automatizado de alto rendimento para o diagnóstico da infeção ativa por SARS-CoV-2 em larga escala. O teste TMA apresenta uma sensibilidade superior à do método *gold standart*. Esta característica deve-se do teste TMA possuir capacidade de amplificar, com maior segurança, apenas o RNA-alvo contido na amostra. Esta técnica possibilita a deteção de cargas virais mais baixas, mas também uma maior

purificação da amostra. Estas características aliadas à técnica ser realizada num único tubo de reação, diminui a possibilidade de ocorrência de contaminação cruzada, bem como a diminuição de outros erros analíticos durante o processamento da amostra. Apesar do método TMA ser considerado o método de diagnóstico com maior sensibilidade e de conseguir detetar baixas cargas virais, é necessário algum investimento monetário que poderá não estar ao nível de todos os laboratórios de proximidade. Ao passo que o RT-PCR, em plataformas não automáticas, é mais acessível monetariamente, tanto em laboratórios hospitalares e de referência como em laboratórios de proximidade.

Numa avaliação geral dos vários métodos de diagnósticos podemos afirmar que o método mais eficiente para a deteção de baixas cargas virais será o método TMA. Desta forma sugere-se este método de diagnóstico como o mais adequado no diagnóstico precoce da infeção viral pelo novo coronavírus, tanto na fase inicial da infeção como em indivíduos assintomáticos.

Apesar de os testes rápidos de antigénio apresentarem baixa sensibilidade quando comparados com os outros métodos, estes são mais rápidos na obtenção de resultado, mais baratos, apresentam uma elevada especificidade e não requerem técnicos especializados. Desta forma, possuem uma grande vantagem num cenário de testagem em massa durante a ocorrência de surtos, uma vez que, conseguem detetar os indivíduos com cargas virais elevadas e por isso os possíveis transmissores. Esta característica é importante, pois nestas situações o objetivo é o controlo rápido da infeção e a identificação dos indivíduos infetados transmissores do vírus.

7.1 Impacto das variantes no diagnóstico laboratorial

Como referido na secção sobre as variantes do *SARS-CoV-2* em circulação, estas apresentam alterações na sequência genética ao nível da proteína S, mais concretamente no domínio de ligação ao recetor (RBD) desta. Estas mutações quando ocorrem em sequências das proteínas virais podem dificultar a sua identificação pelos testes de diagnóstico. Se a mutação ocorrer numa área chave para a ligação de *primer* ou *primers* nos métodos RT-PCR, TMA ou RT-LAMP, podem impedir a ligação dos mesmos e consequentemente a amplificação do RNA alvo. Desta forma, um resultado negativo não representaria a ausência de infeção, mas sim uma incapacidade de identificar a presença do vírus. Esta afirmação também é verdadeira para os testes rápidos de deteção de antigénios virais que detetam a proteína S. Estes são mais suscetíveis ao aumento de resultados falsos-negativos, à medida que vão ocorrendo as mutações (Ascoli, 2021). Ao

contrário do que acontece na proteína S, a ocorrência de mutações pontuais na proteína N é menos provável de acontecer e de afetar a função viral. Deste modo, a proteína N é considerada o melhor alvo para o diagnóstico, devido à conservação da sequência genética desta proteína. Ainda assim, é necessário ter em consideração que podem ocorrer mutações na sequência genética da proteína N. Em suma, o diagnóstico laboratorial deve ser efetuado sempre com recurso à deteção de duas zonas do genoma do *SARS-CoV-2*, que preferencialmente sejam zonas mais conservadas, ou seja, com menos probabilidade de sofrerem alterações nucleotídicas (Ascoli, 2021).

8. Conclusão

A atual pandemia provocada pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2) teve um grande impacto em todo o mundo, não só a nível da saúde pública, como também a nível económico, social e científico. Os desafios levantados levaram a modificações na forma como as pessoas se relacionam entre si e como vivem o seu dia-a-dia.

O isolamento dos indivíduos infetados, o mais precocemente possível, impede a disseminação do vírus e protege os indivíduos considerados de risco. Para isto, o diagnóstico laboratorial constitui a grande arma no combate a esta pandemia.

Esta revisão bibliográfica, teve como objetivo sumarizar informações-chave acerca da aplicabilidade dos diferentes métodos de diagnóstico. Avaliando a sua sensibilidade, especificidade e rapidez para emissão de um resultado.

O RT-PCR é o método considerado *gold standart* em todo o mundo, pela sua sensibilidade e especificidade, mas também por ser o método molecular com custos mais acessíveis quer para laboratórios de referência e hospitalares, quer para laboratórios de proximidade. No entanto, dependendo da situação no terreno existem outros métodos que podem representar uma mais-valia no diagnóstico. De referir a técnica de amplificação mediada por transcrição (TMA), que permite a obtenção de resultados em minutos e possui uma elevada sensibilidade. Também o teste rápido de antígeno obtém um resultado em poucos minutos, e que depois pode ser confirmado com um teste de maior sensibilidade. Caso a situação para a qual se pretende aplicar um método de diagnóstico for um surto, o teste rápido de antígeno poderá ser a melhor opção. Apesar da baixa sensibilidade em indivíduos assintomáticos ou com baixa carga viral, a realização de um teste de antígeno permite o isolamento dos indivíduos sintomáticos (e mais transmissíveis).

Ao longo deste trabalho foram descritos os principais métodos de diagnóstico laboratorial disponíveis até à data em território nacional e constatou-se que a sua aplicabilidade está intimamente relacionada com diversos fatores como a sua sensibilidade, situação no terreno, emergência no resultado e ainda custos associados para as instituições e infraestruturas envolvidas.

9. Referências bibliográficas

Abduljalil J. M. (2020). Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2: available approaches and limitations. *New microbes and new infections*, 36, 100713. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.100713>

Abduljalil, J. M., & Abduljalil, B. M. (2020). Epidemiology, genome, and clinical features of the pandemic SARS-CoV-2: a recent view. *New microbes and new infections*, 35, 100672. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.100672>

Afzal A. (2020). Molecular diagnostic technologies for COVID-19: Limitations and challenges. *Journal of advanced research*, 26, 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.08.002>

Aptima® SARS-CoV-2 General Information. W-21492-001 Rev. 010. Aptima SARS-CoV-2 - Panther System

Aranha, C., Patel, V., Bhor, V., & Gogoi, D. (2021). Cycle threshold values in RT-PCR to determine dynamics of SARS-CoV-2 viral load: An approach to reduce the isolation period for COVID-19 patients. *Journal of medical virology*, 93(12), 6794–6797. <https://doi.org/10.1002/jmv.27206>

Ascoli C. A. (2021). Could mutations of SARS-CoV-2 suppress diagnostic detection? *Nature biotechnology*, 39(3), 274–275. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-00845-3>

Asghari, A., Naseri, M., Safari, H., Saboory, E., & Parsamanesh, N. (2020). The Novel Insight of SARS-CoV-2 Molecular Biology and Pathogenesis and Therapeutic Options. *DNA and cell biology*, 39(10), 1741–1753. <https://doi.org/10.1089/dna.2020.5703>

Buitrago-Garcia, D., Egli-Gany, D., Counotte, M. J., Hossmann, S., Imeri, H., Ipekci, A. M., Salanti, G., & Low, N. (2020). Occurrence and transmission potential of asymptomatic and presymptomatic SARS-CoV-2 infections: A living systematic review

and meta-analysis. *PLoS medicine*, 17(9), e1003346.
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003346>

Buss, L. F., Prete, C. A., Jr, Abraham, C., Mendrone, A., Jr, Salomon, T., de Almeida-Neto, C., França, R., Belotti, M. C., Carvalho, M., Costa, A. G., Crispim, M., Ferreira, S. C., Fraiji, N. A., Gurzenda, S., Whittaker, C., Kamaura, L. T., Takecian, P. L., da Silva Peixoto, P., Oikawa, M. K., Nishiya, A. S., ... Sabino, E. C. (2021). Three-quarters attack rate of SARS-CoV-2 in the Brazilian Amazon during a largely unmitigated epidemic. *Science (New York, N.Y.)*, 371(6526), 288–292.
<https://doi.org/10.1126/science.abe9728>

Burtis, C. A., & Bruns, D. E. (2016). *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics* (7th ed.; B. G. Sawyer, Ed.). Elsevier.

Candido, D. S., Claro, I. M., de Jesus, J. G., Souza, W. M., Moreira, F., Dellicour, S., Mellan, T. A., du Plessis, L., Pereira, R., Sales, F., Manuli, E. R., Thézé, J., Almeida, L., Menezes, M. T., Voloch, C. M., Fumagalli, M. J., Coletti, T. M., da Silva, C., Ramundo, M. S., Amorim, M. R., ... Faria, N. R. (2020). Evolution and epidemic spread of SARS-CoV-2 in Brazil. *Science (New York, N.Y.)*, 369(6508), 1255–1260.
<https://doi.org/10.1126/science.abd2161>

Centers for Disease Control and Prevention. How COVID-19 spreads. 2020.
<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/prevent-getting-sick/how-covid-spreads.html>

Centers for Disease Control and Prevention. Scientific brief: SARS-CoV-2 and potential airborne transmission. 2020. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/more/scientific-brief-sars-cov-2.html>

Cevik, M., Kuppalli, K., Kindrachuk, J., & Peiris, M. (2020). Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2. *BMJ (Clinical research ed.)*, 371, m3862.
<https://doi.org/10.1136/bmj.m3862>

Chang, T. H., Wu, J. L., & Chang, L. Y. (2020). Clinical characteristics and diagnostic challenges of pediatric COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*, 119(5), 982–989.
<https://doi.org/10.1016/j.jfma.2020.04.007>

Chen, N., Zhou, M., Dong, X., Qu, J., Gong, F., Han, Y., Qiu, Y., Wang, J., Liu, Y., Wei, Y., Xia, J., Yu, T., Zhang, X., & Zhang, L. (2020). Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet (London, England)*, 395(10223), 507–513.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7)

Cheng, Z. J., & Shan, J. (2020). 2019 Novel coronavirus: where we are and what we know. *Infection*, 48(2), 155–163. <https://doi.org/10.1007/s15010-020-01401-y>

Chittoor-Vinod, V. (2021). Molecular Biology of PCR Testing for COVID-19 Diagnostics. In M. Agrawal, & S. Biswas (Eds.), *Biotechnology to Combat COVID-19. IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.96199>

Chu, D. K., Akl, E. A., Duda, S., Solo, K., Yaacoub, S., Schünemann, H. J., & COVID-19 Systematic Urgent Review Group Effort (SURGE) study authors (2020). Physical distancing, face masks, and eye protection to prevent person-to-person transmission of SARS-CoV-2 and COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Lancet (London, England)*, 395(10242), 1973–1987. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31142-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31142-9)

Clarke, J. M., Majeed, A., & Beaney, T. (2021). Measuring the impact of covid-19. *BMJ (Clinical research ed.)*, 373, n1239. <https://doi.org/10.1136/bmj.n1239>

World Health Organization. (2020). Coronavirus, N. (2019). situation report-1. Geneva: Consultado em Julho de 2021.

Coutard, B., Valle, C., de Lamballerie, X., Canard, B., Seidah, N. G., & Decroly, E. (2020). The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral research*, 176, 104742.
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104742>

Craney, A. R., Velu, P. D., Satlin, M. J., Fauntleroy, K. A., Callan, K., Robertson, A., La Spina, M., Lei, B., Chen, A., Alston, T., Rozman, A., Loda, M., Rennert, H., Cushing, M., & Westblade, L. F. (2020). Comparison of Two High-Throughput Reverse Transcription-PCR Systems for the Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Journal of clinical microbiology*, 58(8), e00890-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00890-20>

Davies, N. G., Abbott, S., Barnard, R. C., Jarvis, C. I., Kucharski, A. J., Munday, J. D., Pearson, C., Russell, T. W., Tully, D. C., Washburne, A. D., Wenseleers, T., Gimma, A., Waites, W., Wong, K., van Zandvoort, K., Silverman, J. D., CMMID COVID-19 Working Group, COVID-19 Genomics UK (COG-UK) Consortium, Diaz-Ordaz, K., Keogh, R., ... Edmunds, W. J. (2021). Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science (New York, N.Y.)*, 372(6538), eabg3055. <https://doi.org/10.1126/science.abg3055>

Day, T., Gandon, S., Lion, S., & Otto, S. P. (2020). On the evolutionary epidemiology of SARS-CoV-2. *Current biology: CB*, 30(15), R849–R857. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.031>

Direção Geral de Saude. (2020). *Orientação 015/2020: COVID-19: Diagnóstico Laboratorial*.

Direção Geral de Saúde. (2021). Norma no 019/2020 de 26/10/2020. <https://www.dgs.pt/normas-orientacoes-e-informacoes/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0192020-de-26102020-pdf.aspx>. Consultado em: 20 de outubro de 2021

Direção Geral de Saúde. (2021). Relatório de Situação 31/12/2021. <https://covid19.min-saude.pt/relatorio-de-situacao/>. Consultado em: 4 de março 2022

Dong, Y., Mo, X., Hu, Y., Qi, X., Jiang, F., Jiang, Z., & Tong, S. (2020). Epidemiology of COVID-19 Among Children in China. *Pediatrics*, 145(6), e20200702. <https://doi.org/10.1542/peds.2020-0702>

Emery, S. L., Erdman, D. D., Bowen, M. D., Newton, B. R., Winchell, J. M., Meyer, R. F., Tong, S., Cook, B. T., Holloway, B. P., McCaustland, K. A., Rota, P. A., Bankamp, B., Lowe, L. E., Ksiazek, T. G., Bellini, W. J., & Anderson, L. J. (2004). Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for SARS-associated coronavirus. *Emerging infectious diseases*, 10(2), 311–316. <https://doi.org/10.3201/eid1002.030759>

European Centre for Disease Prevention and Control. (2020). COVID-19 testing strategies and objectives. 15 September 2020. *ECDC: Stockholm*.

European Commission - Public Health, (2022). EU Common list of COVID-19 antigen tests Agreed by the Health Security Committee)

Fan, C., Liu, L., Guo, W., Yang, A., Ye, C., Jilili, M., Ren, M., Xu, P., Long, H., & Wang, Y. (2020). Prediction of Epidemic Spread of the 2019 Novel Coronavirus Driven by Spring Festival Transportation in China: A Population-Based Study. *International journal of environmental research and public health*, 17(5), 1679. <https://doi.org/10.3390/ijerph17051679>

Faria, N. R., Mellan, T. A., Whittaker, C., Claro, I. M., Candido, D., Mishra, S., Crispim, M., Sales, F., Hawryluk, I., McCrone, J. T., Hulswit, R., Franco, L., Ramundo, M. S., de Jesus, J. G., Andrade, P. S., Coletti, T. M., Ferreira, G. M., Silva, C., Manuli, E. R., Pereira, R., ... Sabino, E. C. (2021). Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science (New York, N.Y.)*, 372(6544), 815–821. <https://doi.org/10.1126/science.abh2644>

Fauci, A. S., Lane, H. C., & Redfield, R. R. (2020). Covid-19 - Navigating the Uncharted. *The New England journal of medicine*, 382(13), 1268–1269. <https://doi.org/10.1056/NEJMe2002387>

Forni, D., Cagliani, R., Clerici, M., & Sironi, M. (2017). Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes. *Trends in microbiology*, 25(1), 35–48. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.09.001>

Fowler, V. L., Armson, B., Gonzales, J. L., Wise, E. L., Howson, E., Vincent-Mistiaen, Z., Fouch, S., Maltby, C. J., Grippon, S., Munro, S., Jones, L., Holmes, T., Tillyer, C., Elwell, J., Sowood, A., de Peyer, O., Dixon, S., Hatcher, T., Patrick, H., Laxman, S., ... Kidd, S. P. (2021). A highly effective reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for the rapid detection of SARS-CoV-2 infection. *The Journal of infection*, 82(1), 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.10.039>

Gangavarapu, Alaa Abdel Latif, Julia Mullen, Manar Alkuzweny, Emory Hufbauer, Ginger Tsueng, Emily Haag, Mark Zeller, Christine M. Aceves, Karina Zaiets, Marco Cano, Jerry Zhou, Zhongchao Qian, Rachel Sattler, Nathaniel L. Matteson, Joshua I. Levy, Raphael T.C. Lee, Lucas Freitas, Sebastian Maurer-Stroh, GISAID core and curation team, Marc A. Suchard, Chunlei Wu, Andrew I. Su, Kristian G. Andersen, Laura D. Hughes. (2022). Outbreak. info genomic reports: scalable and dynamic surveillance of SARS-CoV-2 variants and mutations. *medRxiv*. doi: 10.1101/2022.01.27.22269965

Guan, W. J., Ni, Z. Y., Hu, Y., Liang, W. H., Ou, C. Q., He, J. X., Liu, L., Shan, H., Lei, C. L., Hui, D., Du, B., Li, L. J., Zeng, G., Yuen, K. Y., Chen, R. C., Tang, C. L., Wang, T., Chen, P. Y., Xiang, J., Li, S. Y., ... China Medical Treatment Expert Group for Covid-19 (2020). Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *The New England journal of medicine*, 382(18), 1708–1720. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2002032>

Harapan, H., Itoh, N., Yufika, A., Winardi, W., Keam, S., Te, H., Megawati, D., Hayati, Z., Wagner, A. L., & Mudatsir, M. (2020). Coronavirus disease 2019 (COVID-19): A literature review. *Journal of infection and public health*, 13(5), 667–673. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.03.019>

Harrison, A. G., Lin, T., & Wang, P. (2020). Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends in immunology*, 41(12), 1100–1115. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>

- Ho, J. C., Chan, K. N., Hu, W. H., Lam, W. K., Zheng, L., Tipoe, G. L., Sun, J., Leung, R., & Tsang, K. W. (2001). The effect of aging on nasal mucociliary clearance, beat frequency, and ultrastructure of respiratory cilia. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 163(4), 983–988. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.4.9909121>
- Hodcroft, E. CoVariants: SARS-CoV-2 mutations and variants of interest (*NextStrain*). *CoVariants* (2021). <https://covariants.org/> . Consultado a 8 de Abril de 2022
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z. L. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature reviews. Microbiology*, 19(3), 141–154. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., Xiao, Y., ... Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet (London, England)*, 395(10223), 497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., & Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and immunity*, 6(4), 279–284. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364190>
- Jin, Y. H., Cai, L., Cheng, Z. S., Cheng, H., Deng, T., Fan, Y. P., Fang, C., Huang, D., Huang, L. Q., Huang, Q., Han, Y., Hu, B., Hu, F., Li, B. H., Li, Y. R., Liang, K., Lin, L. K., Luo, L. S., Ma, J., Ma, L. L., ... , for the Zhongnan Hospital of Wuhan University Novel Coronavirus Management and Research Team, Evidence-Based Medicine Chapter of China International Exchange and Promotive Association for Medical and Health Care (CPAM) (2020). A rapid advice guideline for the diagnosis and treatment of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infected pneumonia (standart version). *Military Medical Research*, 7(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s40779-020-0233-6>
- Kevadiya, B. D., Machhi, J., Herskovitz, J., Oleynikov, M. D., Blomberg, W. R., Bajwa, N., Soni, D., Das, S., Hasan, M., Patel, M., Senan, A. M., Gorantla, S., McMillan, J., Edagwa, B., Eisenberg, R., Gurumurthy, C. B., Reid, S., Punyadeera, C., Chang, L., &

Gendelman, H. E. (2021). Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. *Nature materials*, 20(5), 593–605. <https://doi.org/10.1038/s41563-020-00906-z>

Kitajima, H., Tamura, Y., Yoshida, H., Kinoshita, H., Katsuta, H., Matsui, C., Matsushita, A., Arai, T., Hashimoto, S., Iuchi, A., Hirashima, T., Morishita, H., Matsuoka, H., Tanaka, T., & Nagai, T. (2021). Clinical COVID-19 diagnostic methods: Comparison of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) and quantitative RT-PCR (qRT-PCR). *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 139, 104813. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2021.104813>

Klompas, M., Baker, M. A., & Rhee, C. (2020). Airborne Transmission of SARS-CoV-2: Theoretical Considerations and Available Evidence. *JAMA*, 324(5), 441–442. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.12458>

Krichel, B., Falke, S., Hilgenfeld, R., Redecke, L., & Uetrecht, C. (2020). Processing of the SARS-CoV pp1a/ab nsp7-10 region. *The Biochemical journal*, 477(5), 1009–1019. <https://doi.org/10.1042/BCJ20200029>

Krüttgen, A., Cornelissen, C. G., Dreher, M., Hornef, M. W., Imöhl, M., & Kleines, M. (2021). Comparison of the SARS-CoV-2 Rapid antigen test to the real star Sars-CoV-2 RT PCR kit. *Journal of virological methods*, 288, 114024. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.114024>

Lai, C., & Lam, W. (2021). Laboratory testing for the diagnosis of COVID-19. *Biochemical and biophysical research communications*, 538, 226–230. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.10.069>

Lamers, M. M., & Haagmans, B. L. (2022). SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nature reviews. Microbiology*, 20(5), 270–284. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00713-0>

Leung, K., Shum, M. H., Leung, G. M., Lam, T. T., & Wu, J. T. (2021). Early transmissibility assessment of the N501Y mutant strains of SARS-CoV-2 in the United Kingdom, October to November 2020. *Euro surveillance: bulletin Europeen sur les*

maladies transmissibles = *European communicable disease bulletin*, 26(1), 2002106.
<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.26.1.2002106>

Li, Q., Guan, X., Wu, P., Wang, X., Zhou, L., Tong, Y., Ren, R., Leung, K., Lau, E., Wong, J. Y., Xing, X., Xiang, N., Wu, Y., Li, C., Chen, Q., Li, D., Liu, T., Zhao, J., Liu, M., Tu, W., ... Feng, Z. (2020). Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. *The New England journal of medicine*, 382(13), 1199–1207. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001316>

Liu, C., Ginn, H. M., Dejnirattisai, W., Supasa, P., Wang, B., Tuekprakhon, A., Nutalai, R., Zhou, D., Mentzer, A. J., Zhao, Y., Duyvesteyn, H., López-Camacho, C., Slon-Campos, J., Walter, T. S., Skelly, D., Johnson, S. A., Ritter, T. G., Mason, C., Costa Clemens, S. A., Gomes Naveca, F., ... Screaton, G. R. (2021). Reduced neutralization of SARS-CoV-2 B.1.617 by vaccine and convalescent serum. *Cell*, 184(16), 4220–4236.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.06.020>

Liu, J., Liu, Y., Xia, H., Zou, J., Weaver, S. C., Swanson, K. A., Cai, H., Cutler, M., Cooper, D., Muik, A., Jansen, K. U., Sahin, U., Xie, X., Dormitzer, P. R., & Shi, P. Y. (2021). BNT162b2-elicited neutralization of B.1.617 and other SARS-CoV-2 variants. *Nature*, 596(7871), 273–275. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03693-y>

Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., Chen, J., ... Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet (London, England)*, 395(10224), 565–574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)

Mackay, I. M., Arden, K. E., & Nitsche, A. (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic acids research*, 30(6), 1292–1305. <https://doi.org/10.1093/nar/30.6.1292>

Martín, J., Tena, N., & Asuero, A. G. (2021). Current state of diagnostic, screening and surveillance testing methods for COVID-19 from an analytical chemistry point of view. *Microchemical journal: devoted to the application of microtechniques in all branches of science*, 167, 106305. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106305>

Mason R. J. (2020). Pathogenesis of COVID-19 from a cell biology perspective. *The European respiratory journal*, 55(4), 2000607. <https://doi.org/10.1183/13993003.00607-2020>

Mathuria, J. P., Yadav, R., & Rajkumar (2020). Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2 - A review of current methods. *Journal of infection and public health*, 13(7), 901–905. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.06.005>

Mautner, L., Baillie, C. K., Herold, H. M., Volkwein, W., Guertler, P., Eberle, U., Ackermann, N., Sing, A., Pavlovic, M., Goerlich, O., Busch, U., Wassill, L., Huber, I., & Baiker, A. (2020). Rapid point-of-care detection of SARS-CoV-2 using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Virology journal*, 17(1), 160. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01435-6>

Meo, S. A., Meo, A. S., Al-Jassir, F. F., & Klonoff, D. C. (2021). Omicron SARS-CoV-2 new variant: global prevalence and biological and clinical characteristics. *European review for medical and pharmacological sciences*, 25(24), 8012–8018. https://doi.org/10.26355/eurev_202112_27652

Meyerowitz, E. A., Richterman, A., Gandhi, R. T., & Sax, P. E. (2021). Transmission of SARS-CoV-2: A Review of Viral, Host, and Environmental Factors. *Annals of internal medicine*, 174(1), 69–79. <https://doi.org/10.7326/M20-5008>

Mlcochova, P., Kemp, S. A., Dhar, M. S., Papa, G., Meng, B., Ferreira, I., Datir, R., Collier, D. A., Albecka, A., Singh, S., Pandey, R., Brown, J., Zhou, J., Goonawardane, N., Mishra, S., Whittaker, C., Mellan, T., Marwal, R., Datta, M., Sengupta, S., ... Gupta, R. K. (2021). SARS-CoV-2 B.1.617.2 Delta variant replication and immune evasion. *Nature*, 599(7883), 114–119. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03944-y>

Mori, Y., & Notomi, T. (2009). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 15(2), 62–69. <https://doi.org/10.1007/s10156-009-0669-9>

Mossel, E. C., Wang, J., Jeffers, S., Edeen, K. E., Wang, S., Cosgrove, G. P., Funk, C. J., Manzer, R., Miura, T. A., Pearson, L. D., Holmes, K. V., & Mason, R. J. (2008). SARS-CoV replicates in primary human alveolar type II cell cultures but not in type I-like cells. *Virology*, 372(1), 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.09.045>

Nakra, N. A., Blumberg, D. A., Herrera-Guerra, A., & Lakshminrusimha, S. (2020). Multi-System Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C) Following SARS-CoV-2 Infection: Review of Clinical Presentation, Hypothetical Pathogenesis, and Proposed Management. *Children* (Basel, Switzerland), 7(7), 69. <https://doi.org/10.3390/children7070069>

Naqvi, A., Fatima, K., Mohammad, T., Fatima, U., Singh, I. K., Singh, A., Atif, S. M., Hariprasad, G., Hasan, G. M., & Hassan, M. I. (2020). Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1866(10), 165878. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165878>

Nawattanapaiboon, K., Pasomsub, E., Prombun, P., Wongbunmak, A., Jenjitwanich, A., Mahasupachai, P., Vetcho, P., Chayrach, C., Manatjaroenlap, N., Samphaongern, C., Watthanachockchai, T., Leedorkmai, P., Manopwisedjaroen, S., Akkarawongsapat, R., Thitithanyanont, A., Phanchana, M., Panbangred, W., Chauvatcharin, S., & Sriksirin, T., (2021). Colorimetric reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) as a visual diagnostic platform for the detection of the emerging coronavirus SARS-CoV-2. *The Analyst*, 146(2), 471–477. <https://doi.org/10.1039/d0an01775b>

Ortiz-Prado, E., Simbaña-Rivera, K., Gómez-Barreno, L., Rubio-Neira, M., Guaman, L. P., Kyriakidis, N. C., Muslin, C., Jaramillo, A., Barba-Ostria, C., Cevallos-Robalino, D., Sanches-SanMiguel, H., Unigarro, L., Zalakeviciute, R., Gadian, N., & López-Cortés, A. (2020). Clinical, molecular, and epidemiological characterization of the SARS-CoV-2 virus and the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), a comprehensive literature review. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 98(1), 115094. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115094>

Park, G. S., Baek, S. H., Ku, K., Kim, S. J., Kim, S. I., Kim, B. T., & Maeng, J. S. (2020). Colorimetric RT-LAMP Methods to Detect Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Bio-protocol*, 10(21), e3804. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3804>

Parsamanesh, N., Pezeshgi, A., Hemmati, M., Jameshorani, M., & Saboory, E. (2021). Neurological manifestations of coronavirus infections: role of angiotensin-converting enzyme 2 in COVID-19. *The International journal of neuroscience*, 1–8. Advance online publication. <https://doi.org/10.1080/00207454.2020.1849193>

Peeling, R. W., Olliaro, P. L., Boeras, D. I., & Fongwen, N. (2021). Scaling up COVID-19 rapid antigen tests: promises and challenges. *The Lancet. Infectious diseases*, 21(9), e290–e295. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00048-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00048-7)

Pereson, M. J., Mojsiejszuk, L., Martínez, A. P., Flichman, D. M., Garcia, G. H., & Di Lello, F. A. (2021). Phylogenetic analysis of SARS-CoV-2 in the first few months since its emergence. *Journal of medical virology*, 93(3), 1722–1731. <https://doi.org/10.1002/jmv.26545>

Pfefferle, S., Reucher, S., Nörz, D., & Lütgehetmann, M. (2020). Evaluation of a quantitative RT-PCR assay for the detection of the emerging coronavirus SARS-CoV-2 using a high throughput system. *Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 25(9), 2000152. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.9.2000152>

Pham, J., Meyer, S., Nguyen, C., Williams, A., Hunsicker, M., McHardy, I., Gendlina, I., Goldstein, D. Y., Fox, A. S., Hudson, A., Darby, P., Hovey, P., Morales, J., Mitchell, J., Harrington, K., Majlessi, M., Moberly, J., Shah, A., Worlock, A., Walcher, M., ... Clark, C. (2020). Performance Characteristics of a High-Throughput Automated Transcription-Mediated Amplification Test for SARS-CoV-2 Detection. *Journal of clinical microbiology*, 58(10), e01669-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.01669-20>

Planas, D., Veyer, D., Baidaliuk, A., Staropoli, I., Guivel-Benhassine, F., Rajah, M. M., Planchais, C., Porrot, F., Robillard, N., Puech, J., Prot, M., Gallais, F., Gantner, P., Velay, A., Le Guen, J., Kassis-Chikhani, N., Edriss, D., Belec, L., Seve, A., Courtellemont, L., ... Schwartz, O. (2021). Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization. *Nature*, 596(7871), 276–280. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03777-9>

Rahbari, R., Moradi, N., & Abdi, M. (2021). rRT-PCR for SARS-CoV-2: Analytical considerations. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 516, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.01.011>

Rambaut, A., Holmes, E. C., O'Toole, Á., Hill, V., McCrone, J. T., Ruis, C., du Plessis, L., & Pybus, O. G. (2020). A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nature microbiology*, 5(11), 1403–1407. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0770-5>

Sabino, E. C., Buss, L. F., Carvalho, M., Prete, C. A., Jr, Crispim, M., Fraiji, N. A., Pereira, R., Parag, K. V., da Silva Peixoto, P., Kraemer, M., Oikawa, M. K., Salomon, T., Cucunuba, Z. M., Castro, M. C., de Souza Santos, A. A., Nascimento, V. H., Pereira, H. S., Ferguson, N. M., Pybus, O. G., Kucharski, A., ... Faria, N. R. (2021). Resurgence of COVID-19 in Manaus, Brazil, despite high seroprevalence. *Lancet (London, England)*, 397(10273), 452–455. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00183-5)

Saxena, S. K., Kumar, S., Ansari, S., Paweska, J. T., Maurya, V. K., Tripathi, A. K., & Abdel-Moneim, A. S. (2022). Transmission dynamics and mutational prevalence of the novel severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 Omicron Variant of Concern. *Journal of medical virology*, 94(5), 2160–2166. <https://doi.org/10.1002/jmv.27611>

Schwartz, D. A., & Graham, A. L. (2020). Potential Maternal and Infant Outcomes from (Wuhan) Coronavirus 2019-nCoV Infecting Pregnant Women: Lessons from SARS, MERS, and Other Human Coronavirus Infections. *Viruses*, 12(2), 194. <https://doi.org/10.3390/v12020194>

Sheikhzadeh, E., Eissa, S., Ismail, A., & Zourob, M. (2020). Diagnostic techniques for COVID-19 and new developments. *Talanta*, 220, 121392. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121392>

Shulla, A., Heald-Sargent, T., Subramanya, G., Zhao, J., Perlman, S., & Gallagher, T. (2011). A transmembrane serine protease is linked to the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor and activates virus entry. *Journal of virology*, 85(2), 873–882. <https://doi.org/10.1128/JVI.02062-10>

Singanayagam, A., Patel, M., Charlett, A., Lopez Bernal, J., Saliba, V., Ellis, J., Ladhani, S., Zambon, M., & Gopal, R. (2020). Duration of infectiousness and correlation with RT-PCR cycle threshold values in cases of COVID-19, England, January to May 2020. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 25(32), 2001483. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.32.2001483>

Singh, D., & Yi, S. V. (2021). On the origin and evolution of SARS-CoV-2. *Experimental & molecular medicine*, 53(4), 537–547. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00604-z>

Sule, W. F., & Oluwayelu, D. O. (2020). Real-time RT-PCR for COVID-19 diagnosis: challenges and prospects. *The Pan African medical journal*, 35(Suppl 2), 121. <https://doi.org/10.11604/pamj.suppl.2020.35.24258>

Tahamtan, A., & Ardebili, A. (2020). Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. *Expert review of molecular diagnostics*, 20(5), 453–454. <https://doi.org/10.1080/14737159.2020.1757437>

Taleghani, N., & Taghipour, F. (2021). Diagnosis of COVID-19 for controlling the pandemic: A review of the state-of-the-art. *Biosensors & bioelectronics*, 174, 112830. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112830>

Tan, W., Zhao, X., Ma, X., Wang, W., Niu, P., Xu, W., Gao, G. F., & Wu, G. (2020). A Novel Coronavirus Genome Identified in a Cluster of Pneumonia Cases - Wuhan, China 2019-2020. *China CDC weekly*, 2(4), 61–62

Tao, K., Tzou, P. L., Nouhin, J., Gupta, R. K., de Oliveira, T., Kosakovsky Pond, S. L., Fera, D., & Shafer, R. W. (2021). The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants. *Nature reviews. Genetics*, 22(12), 757–773.

<https://doi.org/10.1038/s41576-021-00408-x>

Tegally, H., Wilkinson, E., Giovanetti, M., Iranzadeh, A., Fonseca, V., Giandhari, J., Doolabh, D., Pillay, S., San, E. J., Msomi, N., Mlisana, K., von Gottberg, A., Walaza, S., Allam, M., Ismail, A., Mohale, T., Glass, A. J., Engelbrecht, S., Van Zyl, G., Preiser, W., ... de Oliveira, T. (2021). Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature*, 592(7854), 438–443. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03402-9>

Thakur, S., Sasi, S., Pillai, S. G., Nag, A., Shukla, D., Singhal, R., Phalke, S., & Velu, G. (2022). SARS-CoV-2 Mutations and Their Impact on Diagnostics, Therapeutics and Vaccines. *Frontiers in medicine*, 9, 815389. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.815389>

Thomas, M. D., Matthay, E. C., Duchowny, K. A., Riley, A. R., Khela, H., Chen, Y. H., Bibbins-Domingo, K., & Glymour, M. M. (2021). A descriptive analysis of 2020 California Occupational Safety and Health Administration COVID-19-related complaints. *medRxiv : the preprint server for health sciences*, 2021.12.06.21262384. <https://doi.org/10.1101/2021.12.06.21262384>

Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., & Notomi, T. (2008). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature protocols*, 3(5), 877–882. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.57>

Trémeaux, P., Lhomme, S., Abravanel, F., Raymond, S., Mengelle, C., Mansuy, J. M., & Izopet, J. (2020). Evaluation of the Aptima™ transcription-mediated amplification assay (Hologic®) for detecting SARS-CoV-2 in clinical specimens. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 129, 104541. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104541>

Tsang, N., So, H. C., Ng, K. Y., Cowling, B. J., Leung, G. M., & Ip, D. (2021). Diagnostic performance of different sampling approaches for SARS-CoV-2 RT-PCR testing: a

systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Infectious diseases*, 21(9), 1233–1245. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00146-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00146-8)

Udugama, B., Kadhiresan, P., Kozlowski, H. N., Malekjahani, A., Osborne, M., Li, V., Chen, H., Mubareka, S., Gubbay, J. B., & Chan, W. (2020). Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. *ACS nano*, 14(4), 3822–3835. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c02624>

Vandenberg, O., Martiny, D., Rochas, O., van Belkum, A., & Kozlakidis, Z. (2021). Considerations for diagnostic COVID-19 tests. *Nature reviews. Microbiology*, 19(3), 171–183. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00461-z>

Verity, R., Okell, L. C., Dorigatti, I., Winskill, P., Whittaker, C., Imai, N., Cuomo-Dannenburg, G., Thompson, H., Walker, P., Fu, H., Dighe, A., Griffin, J. T., Baguelin, M., Bhatia, S., Boonyasiri, A., Cori, A., Cucunubá, Z., FitzJohn, R., Gaythorpe, K., Green, W., ... Ferguson, N. M. (2020). Estimates of the severity of coronavirus disease 2019: a model-based analysis. *The Lancet. Infectious diseases*, 20(6), 669–677. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30243-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30243-7)

Volz, E., Mishra, S., Chand, M., Barrett, J. C., Johnson, R., Geidelberg, L., Hinsley, W. R., Laydon, D. J., Dabrera, G., O'Toole, Á., Amato, R., Ragonnet-Cronin, M., Harrison, I., Jackson, B., Ariani, C. V., Boyd, O., Loman, N. J., McCrone, J. T., Gonçalves, S., Jorgensen, D., ... Ferguson, N. M. (2021). Assessing transmissibility of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Nature*, 593(7858), 266–269. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03470-x>

Walker, A. S., Pritchard, E., House, T., Robotham, J. V., Birrell, P. J., Bell, I., Bell, J. I., Newton, J. N., Farrar, J., Diamond, I., Studley, R., Hay, J., Vihta, K. D., Peto, T. E., Stoesser, N., Matthews, P. C., Eyre, D. W., Pouwels, K. B., & COVID-19 Infection Survey team (2021). Ct threshold values, a proxy for viral load in community SARS-CoV-2 cases, demonstrate wide variation across populations and over time. *eLife*, 10, e64683. <https://doi.org/10.7554/eLife.64683>

Walker, P., Whittaker, C., Watson, O. J., Baguelin, M., Winskill, P., Hamlet, A., Djafaara, B. A., Cucunubá, Z., Olivera Mesa, D., Green, W., Thompson, H., Nayagam, S., Ainslie, K., Bhatia, S., Bhatt, S., Boonyasiri, A., Boyd, O., Brazeau, N. F., Cattarino, L., Cuomo-Dannenburg, G., ... Ghani, A. C. (2020). The impact of COVID-19 and strategies for mitigation and suppression in low- and middle-income countries. *Science (New York, N.Y.)*, 369(6502), 413–422. <https://doi.org/10.1126/science.abc0035>

Washington, N. L., Gangavarapu, K., Zeller, M., Bolze, A., Cirulli, E. T., Schiabor Barrett, K. M., Larsen, B. B., Anderson, C., White, S., Cassens, T., Jacobs, S., Levan, G., Nguyen, J., Ramirez, J. M., Rivera-Garcia, C., Sandoval, E., Wang, X., Wong, D., Spencer, E., Robles-Sikisaka, R., ... Andersen, K. G. (2021). Genomic epidemiology identifies emergence and rapid transmission of SARS-CoV-2 B.1.1.7 in the United States. *medRxiv : the preprint server for health sciences*, 2021.02.06.21251159. <https://doi.org/10.1101/2021.02.06.21251159>

Weinheimer, V. K., Becher, A., Tönnies, M., Holland, G., Knepper, J., Bauer, T. T., Schneider, P., Neudecker, J., Rückert, J. C., Szymanski, K., Temmesfeld-Wollbrueck, B., Gruber, A. D., Bannert, N., Suttorp, N., Hippenstiel, S., Wolff, T., & Hocke, A. C. (2012). Influenza A viruses target type II pneumocytes in the human lung. *The Journal of infectious diseases*, 206(11), 1685–1694. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis455>

WHO (2020). Laboratory Testing for 2019 novel Coronavirus in suspected human cases. WHO. Disponível em: <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>

Wiersinga, W. J., Rhodes, A., Cheng, A. C., Peacock, S. J., & Prescott, H. C. (2020). Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA*, 324(8), 782–793. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.12839>

World Health Organization (2020). *Diagnostic testing for SARS-CoV-2*. Geneva. WHO reference number WHO/2019-nCoV/laboratory/2020.6.

World Health Organization. (2020). W. Coronavirus disease (COVID-19) Pandemic. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>.

World Health Organization. (2020). *Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance, 2 March 2020* (No. WHO/COVID-19/laboratory/2020.4). World Health Organization.

World Health Organization. (2020). Novel Coronavirus (2019-nCoV): situation report, 3. Consultado em Julho de 2021.

World Health Organization. (2021). *Tracking SARS-CoV-2 variants*. <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>. Consultado em: 20 de abril 2022

World Health Organization. (2021). *Update on omicron*. World Health Organization. <https://www.who.int/news/item/28-11-2021-update-on-omicron>. Consultado em: 20 de abril 2022

World Health Organization. (2021). *Update on SARS-COV-2 and Omicron VOC*. <https://www.who.int/publications/m/item/update-on-sars-cov-2-and-omicron-voc>. Consultado em: 20 de abril 2022

Wu, D., Wu, T., Liu, Q., & Yang, Z. (2020). The SARS-CoV-2 outbreak: What we know. *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 94, 44–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.03.004>

Wu, Z., & McGoogan, J. M. (2020). Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*, 323(13), 1239–1242. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2648>

Xu, Z., Shi, L., Wang, Y., Zhang, J., Huang, L., Zhang, C., Liu, S., Zhao, P., Liu, H., Zhu, L., Tai, Y., Bai, C., Gao, T., Song, J., Xia, P., Dong, J., Zhao, J., & Wang, F. S. (2020).

Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *The Lancet. Respiratory medicine*, 8(4), 420–422. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30076-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30076-X)

Yan, Y., Shin, W. I., Pang, Y. X., Meng, Y., Lai, J., You, C., Zhao, H., Lester, E., Wu, T., & Pang, C. H. (2020). The First 75 Days of Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) Outbreak: Recent Advances, Prevention, and Treatment. *International journal of environmental research and public health*, 17(7), 2323. <https://doi.org/10.3390/ijerph17072323>

Yang, Y., Yang, M., Shen, C., Wang, F., Yuan, J., Li, J., ... & Liu, Y. (2020). Evaluating the accuracy of different respiratory specimens in the laboratory diagnosis and monitoring the viral shedding of 2019-nCoV infections. *MedRxiv*. [https://doi: 10.1016/j.xinn.2020.100061](https://doi.org/10.1016/j.xinn.2020.100061)

Younes, N., Al-Sadeq, D. W., Al-Jighefee, H., Younes, S., Al-Jamal, O., Daas, H. I., Yassine, H. M., & Nasrallah, G. K. (2020). Challenges in Laboratory Diagnosis of the Novel Coronavirus SARS-CoV-2. *Viruses*, 12(6), 582. <https://doi.org/10.3390/v12060582>

Yu, L., Wu, S., Hao, X., Dong, X., Mao, L., Pelechano, V., Chen, W. H., & Yin, X. (2020). Rapid Detection of COVID-19 Coronavirus Using a Reverse Transcriptional Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Diagnostic Platform. *Clinical chemistry*, 66(7), 975–977. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa102>

Zhou, P., Yang, X. L., Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H. R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C. L., Chen, H. D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R. D., Liu, M. Q., Chen, Y., Shen, X. R., Wang, X., Zheng, X. S., ... Shi, Z. L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>

Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F., Tan, W., & China Novel Coronavirus Investigating and Research Team (2020). A Novel Coronavirus

from Patients with Pneumonia in China, 2019. *The New England journal of medicine*, 382(8), 727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>