A pesquisa de anticorpos e componentes virais no diagnóstico e acompanhamento de infecções causadas pelo SARS-CoV-2

**Celso Granato¹, Ana Maria Fraga², Alessandra Dellavance³,
Danielle Cristiane Baldo⁴, Karina Helena Cardozo⁵, Valdemir Melechco Carvalho⁶**

DOI: <https://doi.org/10.46833/reumatologiasp.2020.19.3.12-18>

Resumo Em função da velocidade com que a COVID-19 se expandiu, e da extensão com que atingiu a população brasileira, foi necessário um esforço sem precedentes dos laboratórios clínicos para oferecer testes diagnósticos adequados. O conhecimento dos métodos laboratoriais disponíveis para o diagnóstico da infecção e pós-infecção pelo SARS-CoV-2 é fundamental para o manejo da pandemia. Dessa forma, essa revisão tem por objetivo apresentar uma atualização sobre os principais testes diagnósticos usados no momento, seus princípios bioquímicos, aplicações e limitações. Tradicionalmente pouco utilizados para investigação de infecções de trato respiratório, os testes sorológicos são hoje amplamente empregados para o diagnóstico de COVID-19; com custo inferior (comparado aos testes moleculares) e relativa rapidez para liberação de resultado. A sorologia é um exame importante para apoio à decisão diagnóstica, principalmente nos pacientes em período pós-convalescência, e num contexto epidemiológico, para avaliação da soroprevalência na população. Aspectos como a dinâmica da produção dos anticorpos e seu papel na imunização contra a COVID-19 ainda carecem de investigação para que haja maior compreensão e interpretação dos dados. O diagnóstico padrão é feito por métodos moleculares, principalmente por PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real. A presença do vírus é avaliada pela existência do RNA viral na amostra respiratória; portanto, duas grandes limitações do teste molecular são a qualidade da coleta e a conservação da região genômica alvo do ensaio molecular. Apesar de serem comparativamente mais caros, os testes baseados em PCR são os que apresentam maiores sensibilidade e especificidade no diagnóstico da COVID-19; melhorias processuais e validação de reagentes alternativos foram incorporadas ao fluxo do exame, viabilizando o oferecimento. Uma nova abordagem para o diagnóstico da infecção pelo vírus SARS-CoV-2 por meio da detecção de proteínas virais por proteômica direcionada baseada em espectrometria de massas foi recentemente descrita por nosso grupo. Apesar de não alcançar a sensibilidade do teste de PCR, visto que as proteínas não podem ser multiplicadas como os ácidos nucleicos, o novo teste facilita a logística de coleta e transporte das amostras. Foi verificado que as proteínas são mais estáveis, permitindo o diagnóstico mesmo após o armazenamento das amostras em temperatura ambiente, possibilitando assim o envio de amostras de locais remotos.

Unitermos SARS-CoV-2. COVID-19. Diagnóstico laboratorial. Testes sorológicos. Diagnóstico molecular.

1. Consultor médico em doenças infecciosas. Divisão de Imunologia, Grupo Fleury, São Paulo-SP, Brasil.
2. Doutora em Genética. Pesquisadora da Divisão de Pesquisa e Desenvolvimento, Grupo Fleury, São Paulo-SP, Brasil.
3. Doutora em Ciências da Saúde. Pesquisadora da Divisão de Pesquisa e Desenvolvimento, Grupo Fleury, São Paulo-SP, Brasil.
4. Mestre em Ciências da Saúde. Assessora técnica da Divisão de Pesquisa e Desenvolvimento, Grupo Fleury, São Paulo-SP, Brasil.
5. Doutora em Química. Pesquisadora da Divisão de Pesquisa e Desenvolvimento, Grupo Fleury, São Paulo-SP, Brasil.
6. Doutor em Bioquímica. Pesquisador sênior da Divisão de Pesquisa e Desenvolvimento, Grupo Fleury, São Paulo-SP, Brasil.

Correspondência: Dr. Celso Granato,
e-mail: celso.granato@grupofleury.com.br.

Como citar este artigo: Granato C, Fraga AM, Dellavance A, Baldo DC, Cardozo KH, Carvalho VM. A pesquisa de anticorpos e componentes virais no diagnóstico e acompanhamento de infecções causadas pelo SARS-CoV-2. Rev Paul Reumatol. 2020 jul-set;19(3):12-8.
DOI: <https://doi.org/10.46833/reumatologiasp.2020.19.3.12-18>.

Os autores não contaram com apoio financeiro.

Os autores declaram não ter interesses associativos, comerciais, de propriedade ou financeiros que representem conflito de interesse nos produtos e empresas descritos neste artigo.

INTRODUÇÃO

Dentre os vários aprendizados que temos adquirido ao longo desse tempo, desde que foram descritos os primeiros casos da infecção causada pelo SARS-CoV-2, destaca-se o uso da sorologia, seja para diagnóstico, seja para acompanhamento dos pacientes suspeitos de infecção ou já sabidamente diagnosticados.

Na verdade, essa ferramenta laboratorial nunca foi extensamente empregada no acompanhamento desse tipo de infecção causada por vírus respiratórios, exceto em situações de pesquisa vacinal; portanto, nosso conhecimento da curva de anticorpos nessas circunstâncias era simplesmente uma incógnita.

Por outro lado, devido às restrições a que fomos submetidos para a realização de testes moleculares para o diagnóstico direto da infecção, a sorologia surgiu como uma alternativa possível, no sentido de ter um custo bem inferior às técnicas moleculares, permitir automatização e uso em larga escala, além de fornecer resultados rapidamente. Considerando esse período de aprendizado que temos tido, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) americano não recomenda o uso de sorologia para se estabelecer o diagnóstico de infecção pelo SARS-CoV-2, pois o aparecimento de anticorpos é tardio e pode, eventualmente, nem acontecer¹. A sorologia, no entanto, pode ser empregada em inquéritos soropidemiológicos, em situações de apoio ao diagnóstico molecular, se este não pôde ser realizado por qualquer razão ou, ainda, em crianças com suspeita de síndrome inflamatória multissistêmica¹.

Dessa forma foram desenvolvidos/produzidos grande número de testes, tanto de resultado imediato (chamados de “rápidos” ou imunocromatográficos), como aqueles com desenhos mais tradicionais, como ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), quimioluminescência (*Chemiluminescence immunoassay* – CLIA), entre outros².

Esses produtos foram aprovados para uso sem os habituais critérios exigidos pelas grandes entidades reguladoras, tais como o FDA (*Food and Drug Administration*) americano, ou o EMEA (*European Agency for the Evaluation of Medical Products*) europeu, que os liberou no contexto de *Emergence Use Authorization* (EUA), devido à situação dramática da evolução da pandemia.

Obviamente, existem diferenças marcantes entre os diversos produtos comercializados, particularmente se compararmos os testes rápidos com os tradicionais, mas vamos aqui procurar descrever as curvas que têm sido desenhadas e que foram obtidas com as técnicas mais tradicionais.

ESTRUTURA PROTEICA DO SARS-COV-2 E OS PEPTÍDEOS USADOS NA CAPTURA DOS ANTICORPOS

Os coronavírus são microrganismos envelopados, que têm seu material genético formado por RNA de fita simples, positivamente orientado. A estrutura proteica externa à partícula viral apresenta aqueles espinhos (chamados na língua inglesa de *spikes*) onde se localiza a região denominada RBD (*receptor binding domain* – domínio de ligação do receptor), que constitui a proteína com a qual o vírus se liga ao seu receptor principal na célula alvo (proteína ACE2). Nesse local reside a maior parte

dos domínios contra os quais anticorpos são produzidos para neutralizar o vírus. São descritos vários epítomos nessa região³.

Caminhando para a parte interna da partícula viral, encontramos o RNA envolto em uma proteína chamada de nucleoproteína ou nucleocapsídeo, que se constitui importante na resposta sorológica, tanto é que vários produtos comercializados visam à detecção isolada ou conjunta de anticorpos dirigidos contra epítomos dessa região (igualmente múltiplos)³.

Dessa forma, podem ser detectados anticorpos, neutralizantes ou não, dirigidos contra epítomos da *spike* ou do núcleo proteico, dependendo da constituição do produto desenvolvido⁴. Essa é uma das razões pelas quais a comparação entre produtos diferentes, embora seja frequentemente utilizada, é uma questão complexa.

Os vários produtos comercializados atualmente não fornecem muitos detalhes acerca dos peptídeos usados na captura dos anticorpos. Em geral referem que usam antígenos da *spike* e da nucleoproteína, ou de ambos, sem maiores detalhes quanto aos epítomos. Novamente, isso seria importante que se soubesse, até mesmo para comparar os resultados obtidos com os diferentes *kits* diagnósticos. Outra informação nem sempre disponível diz respeito à forma de obtenção desses peptídeos, uma vez que é sabido que, no caso do uso de células humanas para produção dessas proteínas, pode haver diferenças entre os antígenos “humanizados” e os naturais, o que pode implicar na diferença de qualidade dos *kits*.

DINÂMICA DA PRODUÇÃO DOS ANTICORPOS AO LONGO DO PERÍODO PÓS-INFECÇÃO PELO SARS-COV-2

Depois de um período de incubação variável entre 2 e 12 dias, a infecção se instala e inicia-se a fase clínica da infecção com toda a gama de apresentações da doença, descrita em outros trabalhos. Já se sabe atualmente que a maioria dos pacientes terão forma clínica oligossintomática ou completamente assintomática⁵. Esse aspecto pode influenciar a resposta anticórpica, seja no tempo transcorrido para a soroconversão, seja no nível de anticorpos produzidos⁶.

Ao longo desse período de incubação, a resposta imune inata já deve estar atuando, com a estimulação de células do sistema fagocítico-mononuclear (células dendríticas, monócitos, macrófagos), produção de inúmeras citocinas (interferon I/III, TNF alfa, IL-6, MIP 1 alfa, MIP 1 beta, MCP 1, IP 10)⁷ e a estimulação correspondente do sistema imune adaptativo, incluindo a produção dos anticorpos.

A maioria dos trabalhos relata que os anticorpos passam a ser detectados a partir do 7º dia após a infecção, atingindo o pico ao redor do 28º dia e, eventualmente, desaparecendo total ou parcialmente ao longo das semanas subsequentes⁸. Existem descrições de que os primeiros a surgir seriam os anticorpos da classe IgM, mas há relatos também de anticorpos das classes IgA e IgG^{9,10}. Dependendo de fatores ainda não completamente compreendidos, os níveis de anticorpos vão se elevando de forma mais lenta, em relação àquilo que se observa em outras infecções virais sistêmicas, de forma a que os níveis de anticorpos passam a ser detectáveis após 14 dias, 21 dias ou mais, sendo

que a sensibilidade máxima da maioria dos testes seja atingida após 24-30 dias depois da infecção¹¹.

Observa-se que pacientes com formas clínicas graves e idosos tendem a apresentar anticorpos mais frequentemente (100%, aproximadamente), mais precocemente e em níveis mais elevados. Não se identificaram diferenças entre os gêneros e com relação à idade, consideradas outras variáveis⁴. Níveis menos elevados foram descritos em fumantes e indivíduos em uso de anti-inflamatórios, mas as razões para essa diferença não estão determinadas⁸.

Assim, por razões ainda não totalmente compreendidas, pacientes com formas clínicas menos graves tendem a produzir anticorpos em concentrações menos elevadas em relação aos pacientes com formas clínicas mais graves. Segundo Grzelak, 32% dos indivíduos pouco sintomáticos teriam soroconversão ao longo do primeiro mês pós-infecção. Isso sugere que pacientes com formas leves da doença, ainda que tenham tido RNA viral detectado nas vias aéreas superiores, podem não soroconverter^{6,11}.

As curvas descritas para os anticorpos das classes IgM e IgA costumam ser bastante semelhantes e isso provavelmente está relacionado com o fato de se tratar de infecção adquirida pela via respiratória ou pelo contato das mucosas⁹. Em média, esses anticorpos têm um período de detecção ao redor de 3 a 4 semanas⁹.

Por sua vez, os anticorpos da classe IgG podem passar a ser detectáveis junto ou até antes dos anticorpos da classe IgM, mas a dinâmica de sua produção é mais lenta. Recomendando-se não fazer a busca desses anticorpos antes da 2ª semana após o início dos sintomas, mas preferencialmente após 3 a 4 semanas, para se atingir um nível de sensibilidade mais alto¹². Em função do curto período de tempo transcorrido desde a descrição da pandemia e da utilização dos testes sorológicos, ainda não temos uma noção precisa do tempo de detectabilidade desses anticorpos. Nossa experiência pessoal (dados ainda não publicados) é de que esses anticorpos medidos pelas técnicas "clássicas" perduram por pelo menos 3 a 4 meses, muito embora haja relatos de desaparecimento mais precoce de anticorpos, dependendo do tipo de teste empregado⁸.

Certamente, dependendo dos epítomos aplicados à fase sólida desses testes, eles podem representar apenas uma característica imunoquímica, ou alternativamente, funcional, caso permitam a detecção dos anticorpos neutralizantes.

Dessa forma, a comparação entre os diferentes produtos comercializados é bastante problemática, uma vez que os fabricantes dão informações muito superficiais em relação ao tipo de epítomos que utilizam em seus produtos¹³.

Até a data de redação deste texto ainda não existiam dados referentes a níveis protetores de anticorpos, tampouco de padrões internacionais de anticorpos, uma vez que certamente haverá diferenças dependendo do tipo de imunoensaio considerado (ELISA, CLIA, eletroquimioluminescência, entre outros).

Desde o início de julho de 2020, o CDC americano fez a recomendação de que se usassem sempre 2 técnicas distintas para melhorar a *performance* analítica, o valor preditivo positivo e negativo, particularmente em situações de baixa prevalência da infecção¹.

TESTES SOROLÓGICOS IMUNOCROMATOGRÁFICOS (OU TESTES RÁPIDOS)

Considerando a urgência e a gravidade da situação gerada pela pandemia associada ao SARS-CoV-2, houve aqui nessa área também a liberação pelos EUA de grande número de produtos comercializados por várias companhias¹⁴. Por permitirem resultados após 15 a 20 minutos, também foram denominados testes rápidos. Claro que houve diferenças de qualidade entre esses produtos¹⁵. Praticamente a totalidade deles usa a técnica de cromatografia por fluxo lateral (*lateral flow immunochromatography*).

Existe grande variedade de níveis de sensibilidade e especificidade entre esses testes, oscilando a sensibilidade para anticorpos entre 70,5% e 93,5% e especificidade entre 97,1% e 99,4%, segundo Flower *et al.*¹⁶. Em nossa experiência, observamos uma oscilação ainda maior entre as diferentes marcas, com sensibilidade para anticorpos da classe IgG variando entre 53% e 97% e especificidade entre 93% e 100%, e para IgM a sensibilidade variou entre 12% e 88% e especificidade entre 89% e 100%. Outro ponto de atenção foi a comparação da *performance* analítica dos testes rápidos entre diferentes lotes de uma mesma marca. A sensibilidade para IgG observada foi 60%, 70%, 76%, 86% e 95%, a depender do lote avaliado, e para IgM 55%, 72%, 80%, 87% e 100%. Tais variações mostram falta de reprodutibilidade intra-lote raramente observada em testes comerciais convencionais.

Importante lembrar também que um levantamento comparativo feito no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), por Duarte *et al.*¹⁷, revelou diferença entre amostras colhidas em ponta de dedo ou em veia periférica. Enquanto o teste de referência (ELISA no soro obtido por coleta em veia periférica) apresentou positividade de 93% em pacientes após 14 dias a contar do início do quadro clínico, esses mesmos pacientes apresentaram positividade de 53% em material obtido de ponta de dedo no mesmo momento (informação pessoal). A maioria dos testes rápidos requer 10 mL de soro ou plasma para a execução do exame e o dobro do volume para sangue total a partir da ponta de dedo e comumente não é possível obter esse volume de amostra. Não há dúvida sobre o comprometimento da sensibilidade do teste quando é utilizado menor volume de amostra que o preconizado.

Assim, aparentemente, esses testes rápidos prestam-se mais para levantamentos soroepidemiológicos do que para diagnóstico.

TESTES SOROLÓGICOS POR ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY) E POR CLIA (CHEMILUMINESCENCE IMMUNOASSAY)

Os testes de ELISA e CLIA são ensaios qualitativos e, embora os resultados sejam liberados como valores numéricos, apenas representam uma magnitude que não está relacionada à quantidade do analito presente na amostra¹⁵. São valores arbitrários, índices ou unidades relativas de luz (RLU) estabelecidos a partir de casuísticas compostas por grupo de doentes e grupo controle. Segundo as recomendações do *Clinical and Laboratory Stan-*

darts Institute (CLSI), os kits comerciais devem ser validados com amostragem local mesmo que tenham valores de referência definidos pela indústria responsável pelo desenvolvimento do teste. Em nossa experiência, partindo de casuística composta por amostras de pacientes com TR-PCR positivo para SARS-CoV-2 (formas brandas e graves) e grupo controle composto por amostras de doadores de sangue de 2018, vacinados para influenza na campanha 2020 sem qualquer sintoma de gripe, amostras positivas para outros vírus respiratórios, outras doenças virais (CMV, HIV, HVC, dentre outras) e amostras de pacientes autoimunes foi mandatória a revalidação dos kits de todas as marcas para redefinição dos valores de sensibilidade, especificidade e valores preditivos. De forma geral, os valores de sensibilidade e especificidade propostos por todos os fornecedores avaliados não foram alcançados quando executamos a validação. Como exemplo, utilizando os valores de corte estabelecidos pela indústria produtora de um dos kits, a sensibilidade era de 91% e a especificidade de 94% para IgG, enquanto na avaliação com a nossa casuística os valores foram de 86% e 97%, respectivamente. Em outra marca, a bula propunha 98% de especificidade para IgG e obtivemos 69%. Exemplos como esses confirmam a necessidade de rigorosa validação dos kits e, em especial, quando a produção em larga escala aconteceu em velocidade nunca vista.

TESTES MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE COMPONENTES VIRAIS

Assim que a sequência genômica SARS-CoV-2 foi divulgada¹⁸, pesquisadores de vários laboratórios foram capazes de desenvolver estratégias moleculares para o diagnóstico de COVID-19. A presença de RNA viral é investigada diretamente em amostras biológicas principalmente utilizando a técnica de RT-PCR (reação da cadeia de polimerase após transcrição reversa) em tempo real, na qual sequências únicas do SARS-CoV-2 são amplificadas e detectadas devido à emissão de fluorescência. Em um esforço colaborativo global sem precedentes, pesquisadores de todo o mundo disponibilizaram alíquotas do vírus inativado, para que fosse possível avaliar o desempenho e validar os testes moleculares; assim, alguns laboratórios já estavam preparados para fornecer diagnóstico adequado antes mesmo de haver casos suspeitos em suas regiões de atuação.

Em nossa experiência na validação do ensaio de RT-PCR em tempo real, comparamos a eficiência de diferentes conjuntos de *primers* e sondas para amplificar distintas regiões do genoma viral. Essas regiões foram escolhidas após análise *in silico* e alinhamentos de genomas de SARS-CoV-2 já depositados em bancos de dados públicos, para identificação de alvos moleculares exclusivos do vírus; além disso, consultamos referências que descreviam ensaios já validados^{19,20}. Após seleção, *primers* e sondas foram sintetizados, e as reações foram padronizadas em nosso laboratório, utilizando controles moleculares e vírus inativados batizados em amostras respiratórias. Em nossas mãos, os ensaios que alvejam o gene do nucleocapsídeo viral (gene N) apresentaram melhores desempenhos, com maiores sensibilidade analítica (menor limite de detecção) e especificidade; a extração de ácidos nucleicos com base em *beads* magnéticas gerou

melhor recuperação de RNA ao usar amostras de *swabs* nasofaríngeos/orofaríngeos em meio de transporte viral, mas maiores rendimentos foram obtidos com o uso de colunas de sílica em outras matrizes biológicas (por exemplo, escarro).

Amostras do trato respiratório superior (*swabs* de nasofaringe e orofaringe) são recomendadas pelas agências de saúde locais e internacionais para diagnóstico de COVID-19 em ambiente ambulatorial^{21,22}; no entanto, a escassez de insumos (*swabs*, meios de transporte viral), o desconforto durante a coleta e a necessidade de pessoal especializado, aliados ao risco de contaminação, justificam a necessidade do diagnóstico de SARS-CoV-2 utilizando matrizes biológicas alternativas. Há evidências que mostram boa correlação entre o uso de *swab* nasofaríngeo e saliva para diagnóstico de COVID-19 em grupos de pacientes hospitalizados²³⁻²⁵; o verdadeiro desafio é utilizar saliva para teste molecular em indivíduos assintomáticos ou oligossintomáticos, nos quais é esperado encontrarmos cargas virais menores, em uma faixa de sensibilidade inferior do teste. Nossa experiência demonstrou que há alta concordância na detecção do vírus utilizando as duas amostras, mesmo em pacientes não hospitalizados (manuscrito em preparação) e, portanto, amostras de saliva são uma boa alternativa para diagnóstico da doença. Além da saliva, o diagnóstico de COVID-19 foi validado em amostras do trato respiratório inferior (aspirado traqueal, lavado broncoalveolar, escarro), e é sugerido mediante as seguintes indicações: para pacientes em uso de ventilação mecânica ou traqueostomia, ou em casos com forte suspeita clínica de infecção, porém com resultado negativo em coleta de nasofaringe^{26,27}.

Atualmente, oferecemos três testes moleculares para detecção de SARS-CoV-2:

- Teste de RT-PCR em tempo real *in-house* (LDT-IVD);
- RT-PCR em tempo real realizado em plataforma em linha automatizada (cobas® SARS-CoV-2 – sistema cobas® 6800 – Roche);
- RT-PCR em tempo real em equipamento do tipo *point-of-care* (Xpert® Xpress SARS-CoV-2 – GeneXpert – Cepheid).

Além disso, a constante demanda por testes e a escassez de reagentes guiaram nossos esforços a fim de otimizar as reações, empregar reagentes alternativos e melhorar fluxos de trabalho e processos internos.

Para aumentar a capacidade produtiva de nosso teste molecular *in-house*, tivemos que reinventar nossos fluxos de trabalho, desenvolver novas soluções, adaptando-nos a um volume de exames sem precedentes. Por exemplo, atualmente as reações de RT-PCR em tempo real utilizam metade do volume de enzimas, sondas e *primers*, o que promoveu economia de suprimentos e redução do custo dos testes. Cinco plataformas distintas de extração de ácido nucleico automatizadas foram instaladas e validadas; quatro *mastermixes* (misturas de enzimas do tipo transcriptase reversa e polimerases) e dois fabricantes de *primer* e sonda foram aprovados para uso. Em suma, caso houvesse ruptura de fornecimento de algum componente da reação, teríamos opções já aprovadas. Em relação à parte operacional, podemos citar a imensa reestruturação do setor responsável pe-

los exames de biologia molecular do grupo. Houve significativos avanços no fluxo de interpretação dos resultados da PCR em tempo real: o processo tornou-se mais eficiente e padronizado devido à implementação de algoritmos de análise, interfaceamento de dados e treinamento constante dos analistas. Da coleta de amostra à emissão do laudo, integramos nossas equipes para mitigar erros, otimizar fluxos e unificar procedimentos.

Considerada o método ouro para diagnóstico da COVID-19, a técnica molecular, como qualquer outra metodologia, não é infalível. Mesmo após rigorosa validação, a estratégia precisa ser revisitada periodicamente; mutações no genoma viral podem induzir resultados falso-negativos, uma vez que o princípio da técnica de RT-PCR é baseado na detecção de alvos específicos. Além disso, a etapa pré-analítica é fundamental para o sucesso da investigação; coleta e condições adequadas de manuseio e transporte das amostras devem ser garantidas para aumentar os valores preditivos positivos e negativos; para o teste molecular, a coleta deve ser preferencialmente realizada durante a fase aguda da infecção, após três dias do início dos sintomas²⁸. A interpretação do resultado deve levar em conta as manifestações clínicas do paciente e, devido à falta de apresentação específica da COVID-19, outros exames podem ser solicitados para fechar o diagnóstico. A testagem molecular “em massa” deve ser aplicada considerando suas limitações: apesar dos altos índices de sensibilidade e especificidade, a liberação de resultados falso-positivos e negativos pode ter implicações sociais importantes, especialmente quando a metodologia é aplicada em larga escala.

DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO SARS-COV-2 POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas se consolidou na última década como um dos pilares analíticos nos laboratórios clínicos e já é tida como padrão ouro em diversas aplicações, como na triagem de erros inatos do metabolismo, no monitoramento terapêutico de drogas e na quantificação de hormônios esteroidais²⁹. A espectrometria de massas com ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) também se popularizou rapidamente no laboratório de microbiologia por permitir a identificação rápida de bactérias em amostras clínicas³⁰.

Uma derivação mais recente da espectrometria de massas, a proteômica direcionada³¹, também já vem sendo aplicada com sucesso na determinação de marcadores proteicos como tiroglobulina³², troponina I³³ e apolipoproteínas³⁴. A proteômica direcionada permite detectar e quantificar segmentos proteicos combinando a especificidade da espectrometria de massas com a assertividade da genômica. O desenvolvimento de ensaios baseados na proteômica direcionada pode ser mais rápido que a produção de anticorpos para o desenvolvimento de imunoenaios. Consequentemente, é esperado que esse tipo de ensaio ocupe espaços crescentes no laboratório clínico.

A detecção de espécies virais em amostras clínicas por espectrometria de massas, no entanto, era pouco explorada até a necessidade apresentada pela pandemia de COVID-19. Alguns estudos mostraram a aplicabilidade da proteômica direcionada na detecção de espécies virais, como a influenza A H3N2

e H1N1, após a expansão do vírus em cultura de células obtidas de raspados do trato respiratório superior³⁵. No entanto, tais provas de conceito ainda não estariam prontas para uma aplicação prática em rotina, pois dependiam de longos procedimentos de preparo da amostra e de leitura por espectrometria de massas. O único estudo anterior ao SARS-CoV-2 que demonstrou a detecção direta de vírus a partir de amostras clínicas foi o de Foster et al.³⁶. Nesse estudo, o metapneumovírus humano foi detectado em aspirados da nasofaringe após concentração por cromatografia de exclusão de tamanho, digestão triptica por uma noite e análise por 30 minutos por amostra por espectrometria de massas.

O desafio posto pela pandemia de COVID-19 motivou diversos grupos de pesquisa em proteômica direcionada a buscarem alternativas ao teste padrão-ouro por RT-PCR. Nosso grupo foi um dos primeiros a demonstrar a possibilidade de detecção direta do vírus a partir de amostras obtidas de raspados combinados da nasofaringe e orofaringe³⁷. Nesse estudo, por meio de análises proteômicas não direcionadas de amostras previamente caracterizadas por RT-PCR, foi possível detectar diversas proteínas virais, como a nucleoproteína (ou proteína do nucleocapsídeo), a glicoproteína *spike*, a proteína da membrana, as proteínas 3a, 7a e 8 e replicases. Na etapa seguinte, as coordenadas geradas a partir da lista de peptídeos detectados nas análises não direcionadas foram usadas para o desenho de ensaios por proteômica direcionada, que revelou que a nucleoproteína era o melhor alvo para a detecção do SARS-CoV-2. Dois peptídeos tripticos da nucleoproteína, IGMEVTPSGTWLTYT-GAIK e DGIIWVATEGALNTPK, foram selecionados para a construção de um método baseado em cromatografia bidimensional com fluxo turbulento associado a um espectrômetro de massas em tandem do tipo triplo quadrupolo. Empregando um sistema capaz de multiplexar as análises em 4 vezes, foi possível alcançar um tempo de leitura de 2,5 minutos por amostra. O mesmo estudo resolveu ainda outra questão importante relacionada com a aplicação da proteômica direcionada em análises em larga escala. Foi desenvolvido um método de preparo da amostra baseado em captura por partículas magnéticas totalmente automatizado com o emprego de robôs pipetadores. Essa abordagem permitiu a amostragem direta dos tubos contendo os raspados, reduzindo o risco de contaminação da equipe pelos agentes infecciosos. Outro aspecto favorável à detecção da proteína viral é a maior estabilidade da amostra. Nosso estudo demonstrou que o antígeno é estável até mesmo em temperatura ambiente por até 5 dias, facilitando a coleta e transporte de amostras de locais mais distantes dos grandes centros, situação muito frequente em um país das dimensões e peculiaridades geográficas do Brasil.

Embora não seja possível alcançar a sensibilidade obtida pelo RT-PCR, pois as proteínas não podem ser multiplicadas por meio de uma reação, como para os ácidos nucleicos, o ensaio por proteômica direcionada alcançou uma boa sensibilidade (83%) ao avaliar quase 1.000 amostras previamente caracterizadas por RT-PCR. O estudo demonstrou ainda a ausência de reações cruzadas com outras viroses respiratórias, como parainfluenza 1 e 4, influenza A/H1-2009, metapneumovírus humano, vírus

sincial respiratório, rinovírus, enterovírus e também para outras cepas de coronavírus (229E, NL63 e HKU1). No momento da publicação deste artigo, os primeiros estudos independentes que avaliaram o desempenho dos imunoenaios direcionados aos antígenos indicam sensibilidades inferiores a 60%³⁸⁻⁴⁰.

Assim como os testes genéticos, os ensaios de proteômica direcionada seriam suscetíveis a resultados falso-negativos produzidos por mutações nas sequências alvo. Alterações nas sequências de aminoácidos modificariam as massas moleculares dos peptídeos tornando-os não detectáveis pelas coordenadas de relação massa-carga utilizadas para a detecção por espectrometria de massas. Mutações em sequências adjacentes aos sítios de clivagem pela tripsina também afetariam a detecção. A proteômica direcionada já foi aplicada inclusive na identificação e quantificação de proteínas mutantes⁴¹, mas nesse caso é necessário o redesenho do ensaio para contemplar a detec-

ção das novas variantes. Embora nosso estudo tenha avaliado todas as sequências brasileiras já descritas e não tenha detectado mutações na região alvo, é importante avaliar a dinâmica da evolução do vírus por meio do sequenciamento do genoma completo. Como o ensaio por proteômica é direcionado a dois alvos na nucleoproteína, na ausência da detecção de um deles é recomendada a confirmação por RT-PCR.

Inicialmente projetado como um complemento ao padrão-ouro, o RT-PCR, o novo teste de detecção de SARS-CoV-2 baseado em proteômica direcionada abre novas perspectivas no diagnóstico de viroses respiratórias. Além da alta capacidade de processamento, a proteômica direcionada possibilitaria a adaptação para a detecção de outras espécies virais, inclusive de forma multiplexada no mesmo ensaio. O valor diagnóstico da detecção das proteínas ante o RNA é outro aspecto intrigante, que pode vir a ser esclarecido com estudos adicionais.

Referências

- Centers for Disease Control and Prevention. Overview of Testing for SARS-CoV-2 (COVID-19). CDC 2020 [16/09/2020]. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/testing-overview>. <https://doi.org/10.46234/ccdcw2020.085>.
- Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Emergency Use Authorizations for Medical Devices. U.S. Food and Drugs Administration; 2020.
- Amrun SN, Lee CY, Lee B, Fong SW, Young BE, Chee RS, et al. Linear B-cell epitopes in the spike and nucleocapsid proteins as markers of SARS-CoV-2 exposure and disease severity. *EBioMedicine*. 2020;58:102911. Epub 2020/07/22. PubMed PMID: 32711254; PubMed Central PMCID: PMC7375792. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102911>.
- Ripperger TJ, Uhrlaub JL, Watanabe M, Wong R, Castaneda Y, Pizzato HA, et al. Detection, prevalence, and duration of humoral responses to SARS-CoV-2 under conditions of limited population exposure. *medRxiv*. 2020. Epub 2020/08/15. PubMed PMID: 32817969; PubMed Central PMCID: PMC7430613. <https://doi.org/10.1101/2020.08.14.20174490>.
- Lippi G, Mattiuzzi C, Bovo C, Plebani M. Current laboratory diagnostics of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Acta Biomed*. 2020;91(2):137-45. Epub 2020/05/11. doi: 10.23750/abm.v91i2.9548. PubMed PMID: 32420937.
- Gzelak L, Temmam S, Planchais C, Demeret C, Tondeur L, Huon C, et al. A comparison of four serological assays for detecting anti-SARS-CoV-2 antibodies in human serum samples from different populations. *Sci Transl Med*. 2020;12(559). Epub 2020/08/17. PubMed PMID: 32817357. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abc3103>.
- Machhi J, Herskovitz J, Senan AM, Dutta D, Nath B, Oleynikov MD, et al. The Natural History, Pathobiology, and Clinical Manifestations of SARS-CoV-2 Infections. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2020;15(3):359-86. Epub 2020/07/21. PubMed PMID: 32696264; PubMed Central PMCID: PMC7373339. <https://doi.org/10.1007/s11481-020-09944-5>.
- Gudbjartsson DF, Norddahl GL, Melsted P, Gunnarsdottir K, Holm H, Eythorsen E, et al. Humoral Immune Response to SARS-CoV-2 in Iceland. *N Engl J Med*. 2020;383:1724-1734. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2026116>.
- Guo L, Ren L, Yang S, Xiao M, Chang, Yang F, et al. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Clin Infect Dis*. 2020;71(15):778-85. PubMed PMID: 32198501; PubMed Central PMCID: PMC7184472. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa310>.
- Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis*. 2020. Epub 2020/03/28. PubMed PMID: 32221519; PubMed Central PMCID: PMC7184337. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa344>.
- Wajnberg A, Mansour M, Leven E, Bouvier NM, Patel G, Firpo A, et al. Humoral immune response and prolonged PCR positivity in a cohort of 1343 SARS-CoV 2 patients in the New York City region. *medRxiv*. 2020:2020.04.30.20085613. <https://doi.org/10.1101/2020.04.30.20085613>.
- Tan W, Lu Y, Zhang J, Wang J, Dan Y, Tan Z, et al. Viral Kinetics and Antibody Responses in Patients with COVID-19. *medRxiv*. 2020:2020.03.24.20042382. <https://doi.org/10.1101/2020.03.24.20042382>.
- Hoste ACR, Venteo A, Fresco-Taboada A, Tapia I, Monedero A, López L, et al. Two serological approaches for detection of antibodies to SARS-CoV-2 in different scenarios: a screening tool and a point-of-care test. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2020;98(4):115167. Epub 2020/08/11. PubMed PMID: 32890908; PubMed Central PMCID: PMC7417941. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115167>.
- European Centre for Disease Prevention and Control. 2020 [12/09/2020]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/overview-rapid-test-situation-covid-19-diagnosis-eueea>.
- Andreasson U, Perret-Liaudet A, van Waalwijk, van Doorn LJ, Blennow K, Chiasserini D, et al. A Practical Guide to Immunoassay Method Validation. *Front Neurol*. 2015;6:179. Epub 2015/08/19. PubMed PMID: 26347708; PubMed Central PMCID: PMC74541289. <https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00179>.
- Flower B, Brown JC, Simmons B, Moshe M, Frise R, Penn R, et al. Clinical and laboratory evaluation of SARS-CoV-2 lateral flow assays for use in a national COVID-19 seroprevalence survey. *Thorax*. 2020. Epub 2020/08/12. PubMed PMID: 32796119; PubMed Central PMCID: PMC7430184. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2020-215732>.
- Santos VA, Rafael MM, Sabino EC, Duarte AJS. Sensitivity of the Wondfo One Step COVID-19 test using serum samples. *Clinics (Sao Paulo)*. 2020;75:e2013. <https://doi.org/10.6061/clinics/2020/e2013>.
- Holmes E. Novel 2019 coronavirus genome. 2020 [10/09/2020]. Available from: <https://virological.org/t/novel-2019-coronavirus-genome/319>.
- Centers for Disease Control and Prevention. Research Use Only 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time RT-PCR Primers and Probes. Updated June 6, 2020. CDC 2020 [10/09/2020]. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>.
- World Health Organization. Molecular assays to diagnose COVID-19: Summary table of available protocols. 24 January 2020. [12/09/2020]. Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/molecular-assays-to-diagnose-covid-19-summary-table-of-available-protocols>.
- Lutz IA. Protocolo laboratorial para a coleta, acondicionamento e transporte de amostras biológicas para investigação do novo Coronavírus (2019 - nCoV) (30/01/2019): Secretaria da Saúde de São Paulo - Instituto Adolfo Lutz; 2020 [12/09/2020]. Available from: http://www.ial.sp.gov.br/recursos/instituto-adolfo-lutz/publicacoes/coronavirus/orientacoes_de_coleta_2019-ncov31_01_20.pdf.
- Prevention CfDca. Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens for COVID-19. Updated Oct. 8, 2020: Centers for Disease Control and Prevention; 2020 [cited 2020 12/09/2020]. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/guidelines-clinical-specimens.html>.

23. Zheng S, Fan J, Yu F, Feng B, Lou B, Zou Q, et al. Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January-March 2020: retrospective cohort study. *BMJ*. 2020;369:m1443. Epub 2020/04/21. PubMed PMID: 32317267; PubMed Central PMCID: PMCPCMC7190077. <https://doi.org/10.1136/bmj.m1443>.
24. Pasomsu E, Watcharananan SP, Boonyawat K, Janchompoo P, Wongtabtim G, Suksuwan W, et al. Saliva sample as a non-invasive specimen for the diagnosis of coronavirus disease 2019: a cross-sectional study. *Clin Microbiol Infect*. 2020. Epub 2020/05/15. PubMed PMID: 32422408; PubMed Central PMCID: PMCPCMC7227531. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.05.001>.
25. Wyllie AL, Fournier J, Casanovas-Massana A, Campbell M, Tokuyama M, Vijayakumar P, et al. Saliva or Nasopharyngeal Swab Specimens for Detection of SARS-CoV-2. *N Engl J Med*. 2020;383(13):1283-6. Epub 2020/08/28. PubMed PMID: 32857487; PubMed Central PMCID: PMCPCMC7484747. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2016359>.
26. Lo IL, Lio CF, Cheong HH, Lei CI, Cheong TH, Zhong X, et al. Evaluation of SARS-CoV-2 RNA shedding in clinical specimens and clinical characteristics of 10 patients with COVID-19 in Macau. *Int J Biol Sci*. 2020;16(10):1698-707. Epub 2020/03/15. PubMed PMID: 32226287; PubMed Central PMCID: PMCPCMC7098032. <https://doi.org/10.7150/ijbs.45357>.
27. Pan Y, Zhang D, Yang P, Poon LLM, Wang Q. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(4):411-2. Epub 2020/02/24. PubMed PMID: 32105638; PubMed Central PMCID: PMCPCMC7128099. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30113-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30113-4).
28. Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng AC, Peacock SJ, Prescott HC. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA*. 2020;324(8):782-93. PubMed PMID: 32648899. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.12839>.
29. Carvalho VM. The coming of age of liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry in the endocrinology laboratory. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2012;883-884:50-8. Epub 2011/08/26. PubMed PMID: 21907642. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.08.027>.
30. Florio W, Tavanti A, Barnini S, Ghelardi E, Lupetti A. Recent Advances and Ongoing Challenges in the Diagnosis of Microbial Infections by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Front Microbiol*. 2018;9:1097. Epub 2018/05/29. PubMed PMID: 29896172; PubMed Central PMCID: PMCPCMC5986882. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01097>.
31. Method of the Year 2012. *Nat Methods*. 2013;10(1):1. PubMed PMID: 23547284. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2329>.
32. Hoofnagle AN, Becker JO, Wener MH, Heinecke JW. Quantification of thyroglobulin, a low-abundance serum protein, by immunoaffinity peptide enrichment and tandem mass spectrometry. *Clin Chem*. 2008;54(11):1796-804. Epub 2008/09/18. PubMed PMID: 18801935; PubMed Central PMCID: PMCPCMC2739673. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.109652>.
33. Huillet C, Adrait A, Lebert D, Picard G, Trauchessec M, Louwagie M, et al. Accurate quantification of cardiovascular biomarkers in serum using Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ™) and selected reaction monitoring. *Mol Cell Proteomics*. 2012;11(2):M111.008235. Epub 2011/11/11. PubMed PMID: 22080464; PubMed Central PMCID: PMCPCMC3277748. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.008235>.
34. Henderson CM, Bollinger JG, Becker JO, Wallace JM, Laha TJ, MacCoss MJ, et al. Quantification by nano liquid chromatography parallel reaction monitoring mass spectrometry of human apolipoprotein A-I, apolipoprotein B, and hemoglobin A1c in dried blood spots. *Proteomics Clin Appl*. 2017;11(7-8). Epub 2017/03/06. PubMed PMID: 28112871; PubMed Central PMCID: PMCPCMC5501987. <https://doi.org/10.1002/prca.201600103>.
35. Majchrzykiewicz-Koehorst JA, Heikens E, Trip H, Hulst AG, de Jong AL, Veen MC, et al. Rapid and generic identification of influenza A and other respiratory viruses with mass spectrometry. *J Virol Methods*. 2015;213:75-83. Epub 2014/12/08. PubMed PMID: 25500183. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.11.014>.
36. Foster MW, Gerhardt G, Robitaille L, Plante PL, Boivin G, Corbeil J, et al. Targeted Proteomics of Human Metapneumovirus in Clinical Samples and Viral Cultures. *Anal Chem*. 2015;87(20):10247-54. Epub 2015/09/29. PubMed PMID: 26376123. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01544>.
37. Cardozo KHM, Lebkuchen A, Okai GG, Schuch RA, Viana LG, Olive AN, et al. Fast and low-cost detection of SARS-CoV-2 peptides by tandem mass spectrometry in clinical samples. PREPRINT (Version 2) available at Research Square; 2020. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-28883/v2>.
38. Lambert-Niclot S, Cuffel A, Le Pape S, Vauloup-Fellous C, Morand-Joubert L, Roque-Afonso AM, et al. Evaluation of a Rapid Diagnostic Assay for Detection of SARS-CoV-2 Antigen in Nasopharyngeal Swabs. *J Clin Microbiol*. 2020;58(8). Epub 2020/07/23. PubMed PMID: 32404480; PubMed Central PMCID: PMCPCMC7383555. <https://doi.org/10.1128/JCM.00977-20>.
39. Mak GC, Cheng PK, Lau SS, Wong KK, Lau CS, Lam ET, et al. Evaluation of rapid antigen test for detection of SARS-CoV-2 virus. *J Clin Virol*. 2020;129:104500. Epub 2020/06/08. PubMed PMID: 32585619; PubMed Central PMCID: PMCPCMC7278630. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104500>.
40. Scohy A, Anantharajah A, Bodéus M, Kabamba-Mukadi B, Verroken A, Rodriguez-Villalobos H. Low performance of rapid antigen detection test as frontline testing for COVID-19 diagnosis. *J Clin Virol*. 2020;129:104455. Epub 2020/05/21. PubMed PMID: 32485618; PubMed Central PMCID: PMCPCMC7240272. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104455>.
41. Wang Q, Chaekady R, Wu J, Hwang HJ, Papadopoulos N, Kopelovich L, et al. Mutant proteins as cancer-specific biomarkers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(6):2444-9. Epub 2011/01/19. PubMed PMID: 21248225; PubMed Central PMCID: PMCPCMC3038743. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019203108>.