



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR**

**Desenvolvimento de um teste de ELISA para a COVID-19 com a  
proteína do nucleocapsídeo do SARS-CoV-2**

**GILDEMAR JOSE BEZERRA CRISPIM**

Orientador: Bergmann Morais Ribeiro  
Co-orientador: Samira Bühler

2022



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR**

## **Desenvolvimento de um teste de ELISA para a COVID-19 com a proteína do nucleocapsídeo do SARS-CoV-2**

**GILDEMAR JOSE BEZERRA CRISPIM**

Orientador: Bergmann Morais Ribeiro  
Co-orientador: Samira Bühler

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

**2022**

GILDEMAR JOSE BEZERRA CRISPIM

**Desenvolvimento de um teste de ELISA para a COVID-19 com a  
proteína do nucleocapsídeo do SARS-CoV-2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Bergmann Morais Ribeiro (Orientador)

Prof. Dr. Fabrício Souza Campos (UFRGS)

Profa. Dra. Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira (UnB)

Prof. Dr. Tatsuya Nagata (Suplente)

*“Persistence is the shortest path to success”.*

*Charles Chaplin*

*Dedico*  
*Aos incrivelmente amados pais,*  
*Joaquim Alves Bezerra ( in memoriam)*  
*e Odaly Crispim Bezerra, assim*  
*como aos meus ilustres irmãos e*  
*filhos.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, o professor Dr. Bergmann Morais Ribeiro por sua dedicação e paciência durante o projeto. Seus conhecimentos fizeram grande diferença no resultado final deste trabalho. Seu inabalável foco na orientação assertiva de cada fase da pesquisa e também no enfrentamento de todas as adversidades oriundas da pandemia para cada fase do projeto.

À minha co-orientadora, professora Dra. Samira Bühner pela disponibilidade e atenção com meu aprendizado, sua contribuição relevante em cada etapa do meu desenvolvimento me trouxeram até aqui. Por permitir usar seu laboratório de excelência na Universidade Federal de Goiás.

Aos colegas Matheus, Leonardo, Djairo e Luana do Laboratório de Desenvolvimento e Produção de Testes Rápidos – LDPTTR do Centro Multiusuário de Pesquisa de Bioinsumos e Tecnologias em Saúde - CMBiotecs do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – IPTSP da Universidade Federal de Goiás. Vocês me receberam com muito carinho, sempre atenciosos, simpáticos e com boa vontade em ajudar tanto no laboratório como fora dele. A Dra. Mônica, pelas orientações assertivas nos experimentos, foram fundamentais, principalmente, na etapa final do meu projeto.

A Deus por me permitir concluir esse projeto, após período grave de infecção pela COVID-19. Aos amigos da assistência à saúde do Hospital Regional de Santa Maria-DF, pela ajuda na avaliação dos prontuários dos vários pacientes que tiveram suas amostras submetidas às análises da minha pesquisa.

Por último, mas não menos importante, aos meus pais Joaquim José Alves Bezerra (*in memoriam*) e Odaly Crispim Bezerra, que sempre me incentivaram e apoiaram em todas as áreas da minha vida. Aos meus filhos, Bárbara, Bruno, Caio e André, pelo amor e paciência com as minhas ausências.

A minha família, esposa, filhos e irmãos, por todo apoio ao longo dessa dura jornada de construção do conhecimento.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTO .....	vi
SUMÁRIO.....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	x
LISTA ABREVIACÕES E SÍMBOLOS UTILIZADOS.....	xi
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT .....	xv
1.INTRODUÇÃO.....	16
1.0 História da doença e dados epidemiológicos.....	16
1.2 Epidemiologia.....	16
1.3 Transmissão Viral.....	17
1.4 Aspectos clínicos .....	18
1.5 Característica do Vírus.....	18
1.6 Incubação .....	19
1.7 Níveis de Gravidade.....	20
1.8 Disponibilidades de métodos para diagnóstico.....	21
1.9 O Método de ELISA.....	22
1.10 Estrutura molecular do SARS-CoV-2 .....	23
1.11 Ciclo de infecção celular viral.....	23
1.12 Tipo de coronavírus humanos comuns e as variantes do SARS-CoV-2.....	24
1.13 Diagnósticos de COVID.....	28
1.14 Técnica de RT-qPCR para detecção de RNA viral do SARS-CoV-2 .....	29
1.15 PCR quantitativa em tempo real (qPCR).....	29
1.16 Expressão de proteínas heteróloga.....	32
1.17 Baculovírus como vetor de expressão.....	33
1.18 Cromatografia de afinidade.....	34
1.19 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos IgG anti-proteína N.....	35
2. JUSTIFICATIVA.....	35
3. OBJETIVOS.....	36
3.1 Objetivo Geral.....	36
3.2 Objetivos Específicos.....	36

4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1 Grupos de estudo e aspectos éticos .....	36
4.2 Proteínas nucleocapsídeo (N) do SARS-CoV-2 expressa em células de insetos usando um baculovírus recombinante.....	37
4.3 Expressão do antígeno N.....	39
4.4 A função biológica da proteína N do SARS-CoV-2 .....	40
4.5 Desenvolvimentos do teste do tipo ELISA (protótipo) para a COVID-19.....	41
4.6 Padronização do protótipo ELISA indireto- <i>in-house</i> .....	41
4.7 Cálculos do ELISA <i>in-house</i> .....	44
4.8 Soros utilizados.....	45
4.9 Determinação do cut-off.....	46
4.10 Análise estatística.....	46
5. RESULTADOS .....	47
6. DISCUSSÃO.....	52
7. PERSPECTIVAS.....	60
8. REFERÊNCIAS.....	61
9. ANEXOS.....	65

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Número de casos notificados de COVID no Brasil entre 2019 a 2022.....	17
<b>Figura 2.</b> Estrutura e proteínas estruturais pertencentes ao SARS-CoV-2.....	23
<b>Figura 3.</b> Esquema do genoma e estrutura da partícula do sARS-CoV-2.....	24
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática do ciclo de replicação do SARS-CoV-2.....	25
<b>Figura 5.</b> Métodos para detecção de SARS-CoV-2.....	29
<b>Figura 6.</b> Esquema de conversão de RNA do SARS-CoV-2 em cDNA para amplificação.....	30
<b>Figura 7.</b> Painel de análise da expressão do gene alvo em ciclo de fluorescência emitida durante a amplificação do DNA nas amostras, ciclo a ciclo.....	30
<b>Figura 8.</b> Diferentes formatos de teste tipo ELISA propostos para diagnóstico da COVID-19....	36
<b>Figura 9.</b> O Sistema de Expressão de Baculovírus Bac-to-Bac.....	40
<b>Figura 10.</b> Visão geral estrutural da proteína N do SARS-CoV-2 .....	42
<b>Figura 11.</b> Esquema de método <i>in-house</i> de ELISA indireto adaptado.....	43
<b>Figura 12.</b> Concentrações de antígenos N do SARS-CoV-2.....	44
<b>Figura 13.</b> Esquema de organização das amostras.....	45
<b>Figura 14.</b> Curva ROC sem ligações de fundo.....	49
<b>Figura 15.</b> Curva ROC com ligações de fundo.....	49

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Os principais sintomas no início da COVID-19 segundo Ministério da Saúde no Brasil em 2021.....	20
<b>Tabela 2.</b> Estimativas para o desfecho de casos hospitalares do Centro Chinês de Controle e Prevenção de Doenças em 2020.....	21
<b>Tabela 3.</b> Tipos de coronavírus.....	26
<b>Tabela 4.</b> Principais variantes notificadas pela Organização Mundial de Saúde em 2022.....	27
<b>Tabela 5.</b> Lista dos documentos exigidos para submissão de projetos realizados com seres humanos com a co-participação do IGES-DF para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP IGESDF.....	31
<b>Tabela 6.</b> Resultado das Análises.....	44
<b>Tabela 7.</b> Tabela de contingência para avaliar a validade interna do teste.....	47
<b>Tabela 8.</b> Os cálculos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) foram realizados da seguinte forma.....	47
<b>Tabela 9.</b> Análises das curvas ROC para os dois métodos.....	48
<b>Tabela 10:</b> Sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia.....	50
<b>Tabela 11:</b> Comparação entre a sensibilidade e especificidade quando descontadas ou não as reações inespecíficas.....	51
<b>Tabela 12:</b> Sensibilidade de três ensaios sorológicos comerciais de SARS-CoV-2 em pacientes sintomáticos com COVID-19 confirmado por RT qPC. ....	54
<b>Tabela 13:</b> Especificidade de três ensaios sorológicos SARS-CoV-2 comerciais em indivíduos de controle.....	54
<b>Tabela 14:</b> Análise descritiva da idade, segundo dias de sintomas.....	58

## LISTA DE ABREVIACÕES SÍMBOLOS UTILIZADOS

°	graus Celsius
>	maior que
<	menor que
AcMNPV	baculovirus <i>Autographa Californica Multiple Nucleopolyhedrovirus</i>
Ac-PH	promotor da poliedrina do AcMNPV
DE	' <i>Antibody-Dependent Enhanced</i> '
AP	peptídeo
ACE2	Enzima conversora da angiotensina 2
BCIP	'5-bromo-4 chloro-3-indolyl phosphate p-toluidine salt'
cDNA	DNA sintetizado a partir de um RNA mensageiro
C	proteína do core
DNA	Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotdeos
d.p.i	dias pós infeco
dsRNA	' <i>double-strandedRibonucleicacid</i> '
E	proteína do envelope
ELISA	' <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
<i>For</i>	primer Forward'
g	grama
GAG	glicosaminoglicanos
h	horas
HRSM	Hospital Regional de Santa Maria
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
IDRs	Regies estruturais conservadas

kDa	kiloDalton
kb	kilo(pares)base
LACEN/DF	Laboratório Central de Saúde Pública - Governo do Distrito Federal.
µg	microgramas
µg/mL	microgramas/mililitro
M	proteína associada à membrana
MAC-ELISA	<i>'IgM antibody capture- Enzyme-linked Immunosorbent Assay'</i>
MOI	Multiplicidade de infecção.
N	Proteína do Nucleocapsídeo N do SARS-CoV-2
NBD	Proteína do Nucleocapsídeo N do SARS-CoV-2 descontando branco
NBF	Proteína do Nucleocapsídeo N do SARS-CoV-2 sem descontar branco
µl	microlitro
ml	mililitros
µm	micrômetro
mM	milimolar
NASBA	<i>'nucleic acid sequence-based amplification'</i>
ng	nanogramas
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	<i>'open reading frame'</i>
PAGE	<i>'polyacrylamide gel electrophoresis'</i>
PAF	<i>'Platelet-activating factor'</i>
PBS	<i>'Phosphate buffe red saline'</i>
pb	pares de base
pH	concentração de íon hidroxônio livre
PRNTs	<i>'plaque reduction neutralization tests'</i>
Q-PCR	<i>'Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction'</i>
RdRp	<i>'RNA-dependent RNA polymerase'</i>
Rev	<i>primer Reverse"</i>

RNA	<i>'Ribonucleic Acid'(ácido ribonucleico)</i>
RT-PCR	<i>'Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction'</i>
RI	Reações inespecíficas
ROC	Curva características operacionais do receptor
SCF	<i>'soluble complement-fixing antigen'</i>
SDS	<i>'sodium decyl sulfate'</i>
ssRNA	<i>'single-stranded Ribonucleic acid'</i>
UTR	untranslated region
UV	ultravioleta
V	volts
VOC	Variante de preocupação do SARS-CoV-2
VOI	Variantes de Interesse de SARS-CoV-2
vAc	recombinante espécie AcMNPV
v/v	relação volume/volume
w/v	relação peso/volume

## RESUMO

A COVID-19 (do inglês *coronavirus disease 2019*), é uma doença cuja forma severa é caracterizada pela Síndrome Respiratória Aguda Grave, é causada pelo novo betacoronavírus SARS-CoV-2 (do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*). Desde o relato do primeiro caso na cidade de Wuhan, província de Hubei, China, em dezembro de 2019, o SARS-CoV-2 se espalhou rapidamente pelo mundo. No dia 30 de janeiro de 2020, a Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou a doença como uma emergência de saúde internacional e no dia 11 de março declarou haver uma pandemia (OMS,2020). A atual pandemia da COVID-19, vem exigindo o desenvolvimento de vários produtos e serviços biotecnológicos para detecção, tratamento e prevenção de infecções e doenças causadas por esse vírus. Além das ferramentas moleculares para detecção desse vírus, como a reação em cadeia da polimerase quantitativa com transcriptase reversa (RT-qPCR), técnicas sorológicas foram desenvolvidas e têm sido bastante empregadas para avaliar a soroconversão de pacientes infectados e imunizados. Neste trabalho nosso objetivo visou desenvolver um teste sorológico (ELISA-protótipo *in-house*) para detecção de anticorpos IgG anti-proteína N do SARS-CoV-2 circulantes em pacientes atendidos no Hospital Regional de Santa Maria-DF, Brasil. Tendo como ferramenta molecular utilizamos proteínas recombinantes produzidas com a utilização do sistema baculovírus/célula de inseto para expressão heteróloga utilizamos a expressão da proteína nucleocapsídeo (N) de SARS-CoV-2 em células de insetos, seguida de sua purificação por cromatografia de afinidade. O gene N foi clonado no genoma do *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) via transposição e o baculovírus recombinante resultante foi usado para infecção de células de lepidópteros (Sf9) adaptadas à suspensão de alta densidade. O antígeno foi testado em amostras obtidas de pacientes confirmados para COVID-19 por RT-qPCR do Hospital Regional de Santa Maria –DF e aplicado em um modelo de ELISA indireto – *in house*. O ELISA indireto *in-house* pode ser usado como ferramenta para o detecção de IgG de forma quantitativa. Após validação do protótipo às análises auferidas mostraram que a proteína N, tem potencial imunogênico, e que o protótipo ELISA – *in-house*, pode ser uma ferramenta utilizada no diagnóstico da COVID-19, tendo em vista os dados alcançados na análise estatística, onde apresentaram uma sensibilidade de 94,4%, especificidade de 92,1% e acurácia de 92,5% nas amostras com desconto das reações de fundo (reações inespecíficas), utilizando-se da curva ROC e com intervalo de confiança de 95% (IC95%) nos paciente que apresentaram sintomas inferiores a sete dias da infecção. As amostras com intervalo >7 a 14 dias, alcançaram a sensibilidade de 100% e a especificidade de 94,4% utilizando-se da curva ROC. Outro fator observado, indica que as análises sem o desconto das reações de branco (reações inespecíficas) diminuem a sensibilidade e especificidade em ambas as análises (NBD e NBF).

**Palavras-chave:** *Sars-Cov-2*, nucleocapsídeo N, Baculovírus recombinante, ELISA

## ABSTRACT

COVID-19 (coronavirus disease 2019), is a disease whose severe form is characterized by Severe Acute Respiratory Syndrome, is caused by the new betacoronavirus SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2). Since the report of the first case in the city of Wuhan, Hubei province, China, in December 2019, SARS-CoV-2 has spread rapidly around the world. On January 30, 2020, the World Health Organization (WHO) classified the disease as an international health emergency and on March 11 declared it a pandemic (WHO, 2020). The current COVID-19 pandemic has required the development of various biotechnological products and services for the detection, treatment and prevention of infections and diseases caused by this virus. In addition to molecular tools for detecting this virus, such as quantitative polymerase chain reaction with reverse transcriptase (RT-qPCR), serological techniques have been developed and have been widely used to assess seroconversion in infected and immunized patients. In this work, our objective was to develop a serological test (ELISA-in-house prototype) for the detection of circulating anti-SARS-COV-2 N-protein IgG antibodies in patients treated at the Hospital Regional de Santa Maria-DF, Brazil. Having as a molecular tool, we used recombinant proteins produced using the baculovirus/insect cell system for heterologous expression. We used the expression of the nucleocapsid (N) protein of SARS-CoV-2 in insect cells, followed by its purification by affinity chromatography. The N gene was cloned into the genome of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) via transposition and the resulting recombinant baculovirus was used to infect *Lepidoptera* cells (Sf9) adapted to the high density suspension. The antigen was tested in samples obtained from patients confirmed for COVID-19 by RT-qPCR at Hospital Regional de Santa Maria –DF and applied in an indirect ELISA model – *in house*. In-house indirect ELISA can be used as a tool for quantitative IgG detection. After validation of the prototype, the analyzes obtained showed that the N protein has immunogenic potential, and that the ELISA prototype - in-house, can be a tool used in the diagnosis of COVID-19, in view of the data obtained in the statistical analysis, where showed a sensitivity of 94.4%, specificity of 92.1% and accuracy of 92.5% in the samples with discount for background reactions (nonspecific reactions), using the ROC curve and with a confidence interval of 95% (CI95%) in patients who presented symptoms less than seven days after infection. Samples with an interval of >7 to 14 days reached 100% sensitivity and 94.4% specificity using the ROC curve. Another observed factor indicates that analyzes without discounting blank reactions (non specific reactions) decrease sensitivity and specificity in both analyzes (NBD and NBF).

**Keywords:** *Sars-Cov-2*, Nucleocapsid N, Recombinant Baculovirus, ELISA

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 História da doença e dados epidemiológicos

Desde o relato do primeiro caso na cidade de Wuhan, província de Hubei, China, em dezembro de 2019, o vírus tem se espalhado rapidamente no mundo. No dia 30 de janeiro de 2020, a Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou a doença como uma emergência de saúde internacional e no dia 11 de março de 2020 declarou haver uma pandemia, com aproximadamente 118.000 casos em 114 países e territórios (“Histórico da pandemia de COVID-19 - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde”, [s.d.]). Globalmente, até 21 de dezembro de 2022, houve 650.332.899 casos confirmados de COVID-19, incluindo 6.649.874 mortes, reportados à OMS, em 2022. Já alcançamos no Brasil a marca de 35.945.063 de casos confirmados, com um número de vítimas maior que 692.041 mortes provocadas pela COVID-19 (Figura 1) e esses números continuam subindo (MOURA et al., 2022). Assim, medidas de controle efetivas têm sido adotadas e implementadas, além do isolamento social e cuidados de higiene, e o desenvolvimento de testes confiáveis para o diagnóstico da doença (VASHIST, 2020, p. 19), considerado uma das principais limitações no combate à pandemia e a primeira de oito prioridades de pesquisa identificadas por um grupo de especialistas da OMS (SHERIDAN et al., 2020), vista a notória falta de testes pelo mundo. Após uma ampla divulgação de antígenos imunogênicos das estruturas virais do SARS-CoV-2, pesquisadores e indústrias farmacêuticas vêm desenvolvendo diferentes vacinas. Contudo, ainda não há um tratamento específico para COVID - 19.

### 1.2 Epidemiologia

A Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou definições de casos para variantes de SARS- CoV-2 de interesse (VOIs) e variantes de preocupação (VOCs). As VOCs são variantes do SARS-CoV-2 com aumento de transmissibilidade, um aumento na virulência ou mudança na apresentação clínica da doença, ou uma diminuição na eficácia das medidas sociais e de saúde pública ou diagnósticos, vacinas ou terapêuticas disponíveis, fatores esses que impactam a epidemiologia da COVID-19. À medida que a pandemia avança, novas variantes surgem, especialmente em áreas e grupos com alta incidência e baixa cobertura vacinal. Evidências de que as vacinas podem ser menos

protetoras contra uma variante específica pode ser averiguado por estudos de biologia estrutural e genômica, estudos em animais e testes de neutralização *in vitro*. Menor eficácia de uma vacina na proteção contra infecção provocada por uma variante em humanos, tal fato, fornece a evidência do caráter menos protetivo. Uma nova variante pode estar circulando no momento de um ensaio randomizado controlado de uma nova vacina e então ser detectada a tempo durante o estudo, como foi o caso para a variante Beta (B1.351) na África do Sul para várias vacinas (SHINDE et al., 2021). Novas variantes surgirão após a realização de ensaios clínicos ou em locais diferentes, e a maioria dos dados epidemiológicos sobre o desempenho da vacina contra novas variantes virá de observações e estudos de eficácia vacinal (VE). (MADHI et al., 2022).

### 1.3 Transmissão viral

SARS-CoV-2 é transmitido primariamente de uma pessoa infectada – seja sintomática, pré-sintomática ou assintomática – a outra, através de partículas virais contidas em gotículas orais ou nasais, expelidas durante espirros, tosse ou fala (ARONS et al., 2020; CORMAN et al., 2018; GANDHI; YOKOE; HAVLIR, 2020). As partículas virais podem ficar suspensas no ar por algum tempo, dependendo de vários fatores como confinamento do ambiente, umidade relativa do ar e carga viral, ou se depositarem em superfícies que estejam no entorno, como pisos e objetos. No caso de partículas virais suspensas, a contaminação se dá pela inalação e, no caso das partículas depositadas, através de manuseio das superfícies contaminadas e posterior contato com os olhos e a boca. Estudos em laboratório mostram que partículas de SARS-CoV-2 podem se manter viáveis por períodos que variam de minutos a horas, dependendo do tipo de superfície e da carga viral depositada sobre elas (VAN DOREMALEN et al., 2020). A possível transmissão fecal também tem sido discutida devido à alta carga de RNA de SARS-CoV-2 detectada por RT-PCR nas fezes de pacientes, inclusive por tempos excedentes ao período de viremia em amostras coletadas a partir do trato respiratório (DING; LIANG, 2020). No entanto, partículas virais infecciosas não foram isoladas a partir deste tipo de amostras e, portanto, essa via de transmissão ainda não está estabelecida (WÖLFEL et al., 2020).

#### 1.4 Aspectos Clínicos.

Análises filogenéticas dos diferentes coronavírus indicam que o SARS-CoV-2 é um vírus possivelmente relacionado às espécies de coronavírus de morcegos do gênero *Rhinolophidae* e da família *Rhinolophidae*. O coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2) é o agente causal da pandemia da COVID-19. Até o momento, vírus intimamente relacionados ao SARS-CoV-2 foram relatados em quatro espécies de morcegos: *Rhinolophus acuminatus*, *Rhinolophus affinis*, *Rhinolophus malayanus* e *Rhinolophus shameli*. Por ser um vírus RNA, possui uma maior taxa de mutações durante a sua replicação quando comparado a vírus de DNA. A COVID-19 é caracterizada pela presença de febre, sinais e sintomas respiratórios similares a da gripe sazonal (Tabela 1). Seu principal modo de transmissão é pessoa a pessoa, através das gotículas de saliva. Assim, contato com secreções e excreções respiratórias veiculadas por espirro, tosse, contato pessoal direto ou próximo a pessoas infectadas, e com objetos contaminados (fômites) quando levados à boca, nariz e olhos têm que ser evitados, para impedir a sua transmissão (MOBIN et al., 2021)..

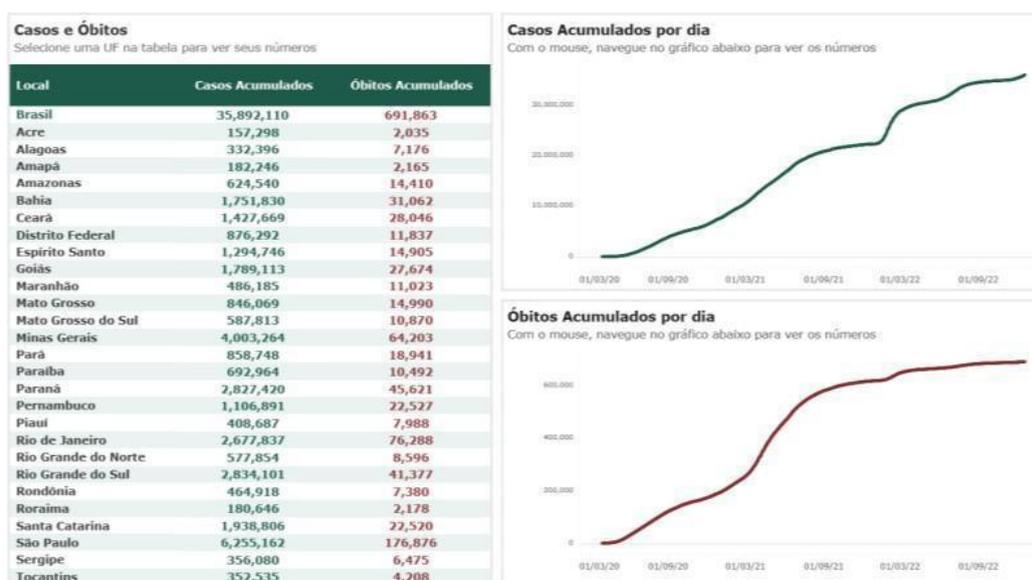
**Tabela 1. Os principais sintomas no início da COVID-19 segundo o Ministério da Saúde no Brasil em 2021.**

Sintoma	Frequência (%)
Febre	88,6 a 99
Fadiga	38,1 a 70
Tosse seca	59
Anorexia	40
Mialgias	35
Dispneia	31
Conjuntivite/perda olfato	0,8
Congestão nasal	4,8
Cefaléia	13,6
Secreção Respiratória	33,7

Fonte disponível em: [http://maismedicos.gov.br/images/PDF/2020\\_03\\_13\\_Boletim-Epidemiologico-05.pdf](http://maismedicos.gov.br/images/PDF/2020_03_13_Boletim-Epidemiologico-05.pdf). Acesso em 20 de Dezembro de 2022.

## 1.5 Características do vírus

A COVID-19 (do inglês *coronavirus disease 2019*), doença cuja forma severa é caracterizada pela Síndrome Respiratória Aguda Grave, é causada pelo novo betacoronavírus SARS-CoV-2 (do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*), um vírus RNA de fita única, sentido positivo, composto por quatro proteínas estruturais: i- a proteína do nucleocapsídeo (N), conservada e muito imunogênica, que envolve o RNA viral; ii- a glicoproteína spike (S), também imunogênica e capaz de induzir anticorpos neutralizantes, responsável pela ligação de alta afinidade ao receptor celular ACE2 (enzima de conversão da angiotensina 2); iii- a proteína de envelope (E), a menor proteína estrutural envolvida na patogênese, montagem e liberação dos virions e; iv- a proteína de membrana (M), a mais abundante no virion completo, envolvida na morfogênese (DONG et al., 2020).



**Figura 1. Número de casos notificados de COVID no Brasil entre 2019 a 2022.** (Disponível em: <https://www.conass.org.br/painelconasscovid19>, acessado em 17/12/2022).

## 1.6 Incubação.

Embora ainda não esteja bem estabelecido, tem-se observado que o período de incubação do vírus varia de 4 a 14 dias, sendo que a maioria dos casos ocorre nos primeiros quatro a cinco dias após a exposição (CHAN et al., 2020). Estudo de modelagem matemática (que tenta prever a progressão da doença), incluindo 181 casos chineses confirmados, estimou que os sintomas se desenvolvessem em 2,5% dos indivíduos

infectados após 2,2 dias e, em 97,5% destes, em até 11 dias (LAUER et al., 2020). O período médio de incubação neste estudo foi de 5,1 dias.

### 1.7 Níveis de gravidade.

A infecção sintomática pode variar de leve a gravíssima, sendo que a maioria dos indivíduos não apresenta manifestações graves (CHAN et al., 2020; WANG et al., 2021). O relatório do Centro Chinês de Controle e Prevenção de Doenças, que incluiu aproximadamente 44.500 casos confirmados, apontou as seguintes estimativas para o desfecho dos casos hospitalares (Tabela 2) (WU; MCGOOGAN, 2020, p. 201).

**Tabela 2. Estimativas para o desfecho de casos hospitalares do Centro Chinês de Controle e Prevenção de Doenças em 2020.**

Gravidade	Tipo	Percentual
Leve	Pneumonia leve	81 %
Grave	Dispneia, hipoxia ou > 50% de comprometimento pulmonar em 24-48h	14%
Gravíssima	Insuficiência respiratória choque ou falência múltipla de órgãos	5%

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a taxa de letalidade de COVID-19 variou de 5,8% em Wuhan a 0,7% no restante da China (“Histórico da pandemia de COVID-19 - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde”, [s.d.]). Casos fatais ocorreram em sua maioria entre idosos e/ou pessoas portadores de comorbidades, tais como doença cardiovascular, diabetes mellitus, doença pulmonar crônica, hipertensão e câncer (MIZRAHI et al., 2023; WU; MCGOOGAN, 2020; ZHOU et al., 2020). A proporção de infecções graves ou fatais tem se mostrado diferente entre países. Por exemplo, na Itália 12%, de todos os casos detectados de COVID-19 e 16% de todos os pacientes hospitalizados necessitam de UTI, com taxa de letalidade de 5,8% em meados de março de 2020 (GRASSELLI; PESENTI; CECCONI, 2020), enquanto, neste mesmo período na Coreia do Sul, este indicador foi de 0,9% (KIM et al., 2020), e apesar das ondas de infecção, esses números reduziram nos últimos meses (CORTÉS MARTÍNEZ et al., 2022; MIZRAHI et al., 2023). Observe-se que houve diferença nas

características dessas populações, pois, na Itália, a idade média dos indivíduos acometidos pela doença foi de 64 anos e, na Coreia, esta média foi de 40 anos. Além disso, a Coreia assumiu precocemente uma política de testagem massiva dos indivíduos, não se restringindo àqueles internados (KWON et al., 2020).

Alguns casos de COVID-19 apresentam complicações graves, levando à necessidade de atendimento em unidades de terapia intensiva (UTI) ou até mesmo levando ao óbito. Quanto aos casos mais complexos, ou evoluem dos sintomas iniciais citados acima (tabela 2), ou já manifestam quadro típico da infecção por SARS-CoV-2, por apresentarem dispneia ou sinais clínicos como diminuição da saturação ou cianose. Além da maior taxa de mortalidade por SARS-CoV-2, há também um grupo considerado de risco pela maior letalidade. Fazem parte desse grupo: idosos com 60 anos ou mais, gestantes de alto risco e pessoas com comorbidades diversas (Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde, 2022). Assim, também pertencem indivíduos de todas as idades que possuem doenças crônicas relacionadas aos pulmões, asma, aqueles que atualmente têm tuberculose ou sequelas de tuberculose prévia, diabetes, hipertensão, obesidade grave, doença renal crônica, doença hepática, imunodeficiência e problemas cardíacos ao grupo de risco. Estudos recentes relatam diabetes mellitus, hipertensão arterial sistêmica, doença cerebrovascular e idade como fatores de risco mais decisivos em relação à internação em UTI e óbito. Um estudo retrospectivo que avaliou aspectos neurológicos de casos confirmados de COVID-19 indicou que 41,1% foram considerados graves. Em comparação com os casos mais leves, os casos graves eram em indivíduos mais velhos ( $58,7 \pm 15,0$  anos versus  $48,9 \pm 14,7$  anos), tinham mais comorbidades (42 [47,7%] versus 41 [32,5%]), especialmente hipertensão (32 [36,4%] versus 19 [15,1%]) e menos sintomas considerados típicos, como febre (40 [45,5%] versus 92 [73%]) e tosse (30 [34,1%] versus 77 [61,1%]) (GUO, Y.-R. et al., 2020).

### 1.8 Disponibilidades de métodos para diagnóstico.

Os avanços alcançados pela comunidade científica e a disponibilidade do genoma completo de SARS-CoV-2, facilitou o desenvolvimento de oligonucleotídeos específicos e protocolos laboratoriais padronizados para diagnóstico da COVID-19 (Lu et al., 2020). Os primeiros protocolos de *Real Time Quantitative Reverse Transcription* PCR (qRT-PCR) utilizados no diagnóstico da COVID-19 foram publicados em 23 de janeiro de 2020 e tem sido utilizado como padrão de maior sensibilidade para o diagnóstico (CORMAN et al., 2018). No Brasil, seguimos o mesmo modelo de diagnóstico laboratorial para a

COVID-19, feito por qRT-PCR, a partir de amostras obtidas do trato respiratório superior e inferior, conforme estabelecido pela OMS. Embora considerado padrão ouro, este método é laborioso, oneroso (insumos caros), requer estrutura física especializada e equipe técnica qualificada, e sua acurácia depende da coleta de amostras com quantidade suficiente de vírus e de protocolos bem estabelecidos de coleta e processamento.

Pacientes com *swabs* orais negativos para SARS-CoV-2 apresentaram resultados positivos em *swab* nasal e sangue, com aumento deste fenômeno no estágio tardio da infecção (WANG et al., 2021). A coleta da amostra por swab da orofaringe durante o estágio inicial ou final da infecção pode não obter quantidades suficientes de vírus, somada a uma inadequada extração de RNA, acarreta uma sensibilidade próxima de 50% (GUO et al., 2020; VASHIST, 2020; WANG et al., 2021), ou seja, a proporção de resultados falso-negativos é significativa e isso gera impacto especialmente na contenção da pandemia e no número de óbitos resultante (LOEFFELHOLZ; TANG, 2020; PANG et al., 2020). Além disso, é notória a escassez mundial de insumos para qRT-PCR, o que implica no atraso da divulgação dos resultados, gerando insegurança e dificuldades para controlar a disseminação da doença. Esse é o principal motivo, seja pela incapacidade industrial instalada no mundo, sobretudo nos países em desenvolvimento e principalmente pelo custo dos reagentes. Assim, a execução de testes complementares a qRT-PCR para obtenção de um diagnóstico mais eficiente e rápido é estratégica no combate a COVID-19.

### 1.9 O Método de ELISA (do inglês “*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*”)

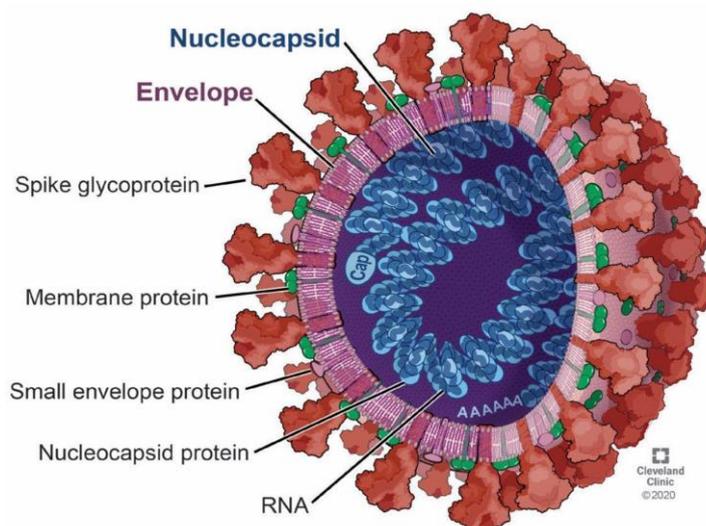
Dentre os testes sorológicos usados rotineiramente no diagnóstico de doenças infectocontagiosas, o ELISA merece destaque por ser um ensaio imunoenzimático que apresenta tempo médio de execução de 3h, elevada eficiência (sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade), possibilidade de automação, disponibilidade de reagentes quimicamente estáveis, facilidade de implementação nos laboratórios clínicos de hospitais e outras unidades de assistência à saúde, além capacidade de gerar resultados quantitativos (título de anticorpos) e de analisar simultaneamente um grande número de amostras (XIAO; WU; LIU, 2020).

Atualmente no Brasil, existem poucos testes sorológicos para COVID-19 com tecnologia nacional, ainda que muitas Universidades estejam trabalhando em grupos para apresentarem modelos protótipos para atender a expectativa e realidade nacional. No

momento, a maioria dos testes ainda precisam ser importados, o que gera a necessidade de maior disponibilidade de recursos, tornando nossos processos de aquisição e logística, muito onerosos e demorados para o enfrentamento da pandemia, acentuando a ineficiência na distribuição para centros de saúde e, conseqüentemente, divulgação tardia dos resultados. Neste contexto, o desenvolvimento de testes sorológicos nacionais para o diagnóstico da COVID-19 (ELISA), mais adequados e acessíveis para uso no Brasil, é estratégico no combate à pandemia. Testes sorológicos importados são validados com amostras biológicas de outros países, não levando em conta aspectos genéticos, socioeconômicos e ambientais do Brasil, o que pode afetar diretamente o desempenho (sensibilidade e especificidade) dos mesmos e a qualidade dos estudos epidemiológicos desenvolvidos. Alguns destes testes foram aprovados de forma urgente devido à pandemia (LOEFFELHOLZ; TANG, 2020), levantando dúvidas em relação às validações terem sido adequadamente qualificadas. Já existem manifestações de alguns países acerca do desempenho ruim de alguns testes sorológicos comercializados (VASHIST, 2020). Por fim, cabe fortemente destacar que o desenvolvimento de testes de diagnóstico para identificar o perfil sorológico da população em contato com o vírus ao longo da pandemia, promove segurança aos gestores de saúde pública para tomada de decisão junto ao enfrentamento da crise e fortalece a soberania nacional, reduzindo a dependência de produtos biotecnológicos estratégicos importados.

#### 1.10 Estrutura molecular do SARS-CoV-2.

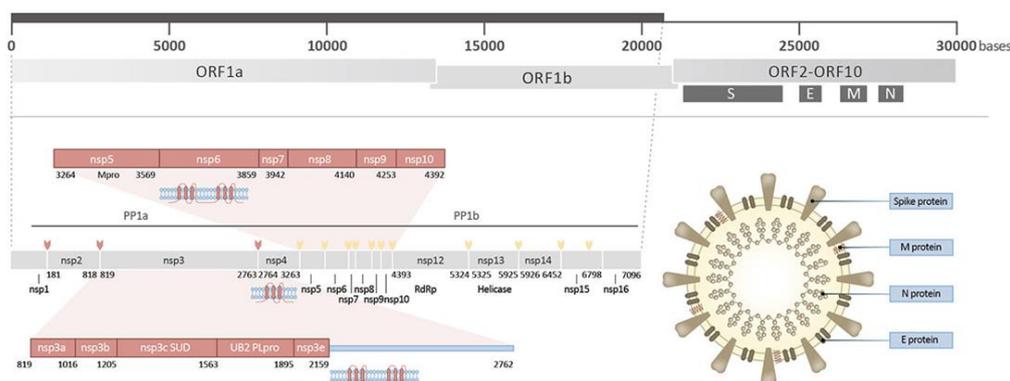
As proteínas S de coronavírus são glicoproteínas de fusão de classe I homotriméricas que são divididas em duas partes funcionalmente distintas (S1 e S2) (Figura 2). O domínio S1 exposto à superfície contém o domínio de ligação ao receptor (RBD) que envolve especificamente o receptor da célula hospedeira, determinando assim o tropismo e a patogenicidade do vírus. O domínio S2 transmembranar contém regiões de repetição heptada e o peptídeo de fusão, que medeiam a fusão de membranas virais e celulares após extensos rearranjos conformacionais (Figura 3). A enzima conversora da angiotensina 2 -ACE2 foi identificada como receptor funcional que permite a interação e posterior infecção por SARS-CoV 2.



**Figura 2. Estrutura e proteínas estruturais pertencentes ao SARS-CoV-2.** Fonte: The Cleveland Clinic Foundation. Disponível: <https://www.ccjm.org/content/87/6/321>, acessados em 19/12/2022.

### 1.11 Ciclo de infecção celular viral.

A alta identidade genômica e estrutural entre as proteínas S de SARS-CoV e SARS-CoV-2 (76% de identidade de aminoácidos) apoiou a identificação de ACE2 como o receptor de superfície celular para SARS-CoV-2. Notavelmente, os resíduos essenciais de contato do SARS-CoV que interagem com o ACE2 foram altamente conservados no SARS-CoV-2, bem como em membros da espécie Coronavírus relacionado à síndrome respiratória aguda grave que usa ACE2 ou possui propriedades de cadeia lateral de aminoácidos semelhantes.



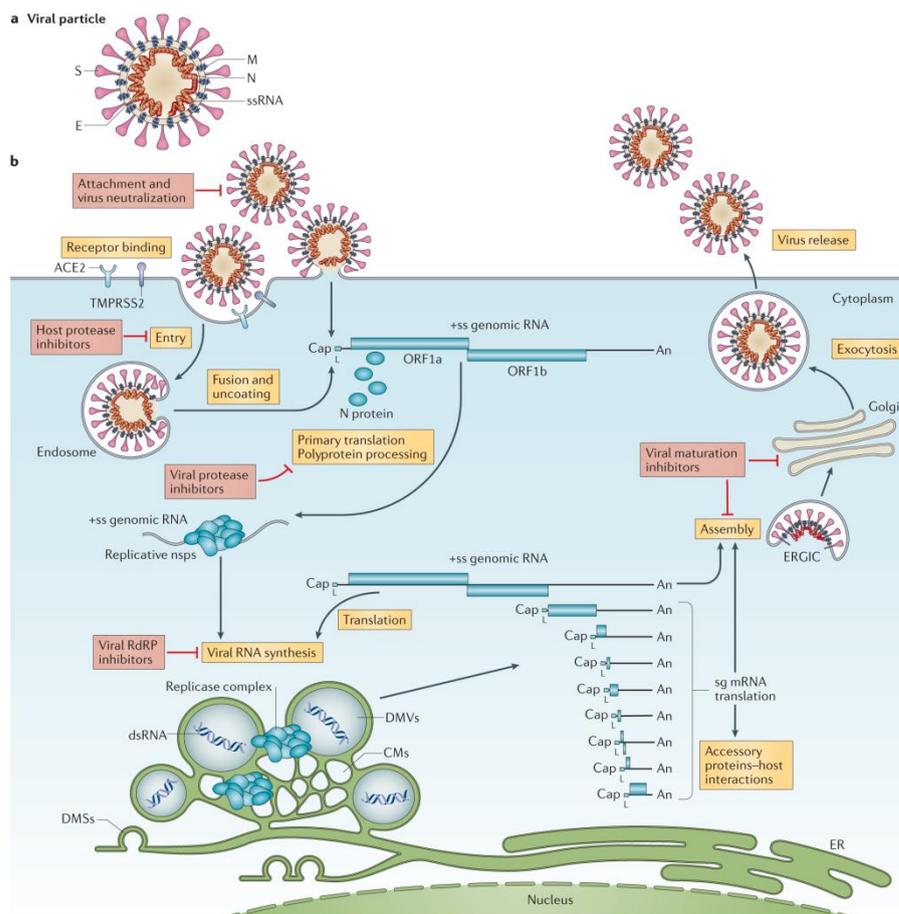
**Figura 3. Esquema do genoma e estrutura da partícula do SARS-CoV-2.** A posição dos diferentes genes estão indicados na figura como fases abertas de leitura (do inglês: Open Reading Frame, ORFs). Os genes não estruturais (ns) são codificados na porção 5' pelas ORF1a e ORF1b e os genes estruturais (S, E, N e M) são codificados pela porção 3' terminal do genoma. Fonte: modificado de: “*A Review of the SARS-CoV-2 (COVID-19) Genome and Proteome*”, GeneTex. Disponível: [https://www.genetex.com/MarketingMaterial/Index/SARS-CoV-2\\_Genome\\_and\\_Proteome](https://www.genetex.com/MarketingMaterial/Index/SARS-CoV-2_Genome_and_Proteome), acessado em 19/12/2022.

Esses dados foram corroborados pela resolução atômica da interface entre a proteína S do SARS-CoV-2 e ACE2. Por outro lado, a sequência RaTG13 S do coronavírus relacionada à síndrome respiratória aguda grave de morcego (93,1% de identidade de nucleotídeos para SARS-CoV-2) mostra a conservação de apenas um dos seis aminoácidos diretamente envolvidos na ligação de ACE2, embora, com base em toda a sequência genômica, o RaTG13 é o parente mais próximo do SARS-CoV-2 conhecido até o momento (96,2%) (Figura 4). O processo de evolução através da recombinação foi decisivo para a transmissão do vírus, de morcegos para humanos. O fenômeno conhecido como spillover (termo em inglês que pode ser traduzido como transbordamento) torna-se cada vez mais frequente. O spillover é usado em Ecologia para dizer que um vírus ou micróbio conseguiu se adaptar e ir de um hospedeiro para outro. E foi assim, migrando dos morcegos para os seres humanos, tendo, talvez, os pangolins como intermediários que o SARS-CoV-2 atingiu esses números impressionantes.

#### 1.12 Tipo de coronavírus humanos comuns e as variantes do SARS-CoV-2

Os coronavírus são nomeados pelos picos em forma de coroa em sua superfície. Existem quatro subgrupos principais de coronavírus, conhecidos como alfa, beta, gama e delta. Os coronavírus humanos foram identificados pela primeira vez em meados da década de 1960. Os sete coronavírus que podem infectar as pessoas estão caracterizados na tabela 3. (V'KOVSKI et al., 2021).

As pessoas em todo o mundo geralmente são infectadas com os coronavírus humanos 229E, NL63, OC43 e HKU1. Às vezes, os coronavírus que infectam animais podem evoluir e deixar as pessoas doentes e se tornar um novo coronavírus humano. Três exemplos recentes disso são SARS-CoV-2, SARS-CoV e MERS-CoV.



**Figura 4. Representação esquemática do ciclo de replicação do SARS-CoV-2.** Em a, partícula viral do coronavírus mostrando as proteínas estruturais, ou seja, spike (S), envelope (E), membrana (M), nucleocapsídeo (N). O genoma de RNA fita simples de sentido positivo (+ssRNA) é associado com a proteína N, enquanto M e E asseguram sua incorporação na partícula viral durante o processo de montagem. Os trímeros da proteína S se projetam do envelope viral derivado do hospedeiro e fornecem especificidade para os receptores de entrada celular. b) As partículas de coronavírus se ligam a fatores de ligação celular e interações S específicas com os receptores celulares (como a ACE2), juntamente com fatores do hospedeiro (como a serina protease da superfície celular TMPRSS2), promovem a captação e fusão viral na membrana celular ou endossomal. Após a entrada, a liberação e desnudamento do RNA genômico permite a tradução imediata de duas ORFs (ORF1a e ORF1b) formando duas poliproteínas. As poliproteínas pp1a e pp1ab resultantes são co-traducionalmente e pós-traducionalmente processadas nas proteínas não estruturais individuais (nsps) que formam o complexo de replicação e transcrição viral. Concordante com a expressão de nsps, a biogênese de organelas de replicação viral consistindo em vesículas de membrana dupla perinucleares (DMVs) características, membranas convolutas (CMs) e pequenas esférulas de membrana dupla (DMSs) abertas criam um microambiente protetor para replicação de RNA genômico viral e transcrição de mRNAs subgenômicos (mRNAs sg) compreendendo o conjunto aninhado característico de mRNAs de coronavírus. As proteínas estruturais traduzidas translocam para as membranas do retículo endoplasmático (ER) e transitam através do compartimento intermediário ER-Golgi (ERGIC), onde a interação com o RNA genômico recém-produzido e N-encapsidado resulta em brotamento no lúmen dos compartimentos vesiculares secretores. Finalmente, os vírions são secretados da célula infectada por exocitose. As principais etapas inibidas por compostos que estão sendo validados e que representam alvos antivirais atraentes estão destacadas em vermelho. Uma sequência 3' poliA (An); estrutura CAP (guanina metilada, importante na tradução do RNA) na porção 5'; dsRNA, RNA de fita dupla; L, sequência líder; RdRP, Fonte: V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S. et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2 (V'KOVSKI et al., 2021).

**Tabela 3. Tipos de coronavírus.**

<b>Nome</b>	<b>Tipo</b>	<b>Doença associada</b>
<b>HCoV-229E</b>	Alfa coronavírus	Doença respiratória leve/moderada
<b>HCoV-NL63</b>	Alfa coronavírus	Doença respiratória leve/moderada
<b>HCoV-OC43</b>	Beta coronavírus	Doença respiratória leve/moderada
<b>HCoV-HKU1</b>	Beta coronavírus	Doença respiratória leve/moderada
<b>MERS-CoV</b>	Beta coronavírus	Síndrome respiratória do Oriente Médio, ou MERS
<b>SARS-CoV</b>	Beta coronavírus	síndrome respiratória aguda grave, ou SARS
<b>SARS-CoV-2</b>	Beta coronavírus	COVID-19

Existem algumas variantes de preocupação identificadas até o momento (Tabela 4) e capazes de escapar parcialmente da imunidade gerada pela vacinação. Embora, cabe salientar que, as vacinas atuais contra a COVID-19 ajudam a reduzir a propagação do vírus e são altamente eficazes na redução de hospitalizações e mortes associadas à doença. Em maio de 2021, a OMS começou a atribuir letras do alfabeto grego a variantes de interesse e variantes de preocupação. Isso foi feito para torná-las mais fáceis de lembrar e para remover o estigma associado a referir-se a elas pelo país onde foram detectadas pela primeira vez, o que não é necessariamente reflexo de onde surgiram pela primeira vez e pode não estimular os países a relatar sua existência.

**Tabela 4. Principais variantes notificadas pela Organização Mundial de Saúde em 2022.**

<b>Variante</b>	<b>Características</b>
Alfa (B.1.1.7)	Detectada pela primeira vez no Reino Unido e designada como uma variante de preocupação em dezembro de 2020, e se espalhou em todo o mundo. Ela contém várias mutações importantes na proteína spike, a chave que o vírus usa para entrar nas células humanas, que o distingue da variante original de Wuhan. Uma delas é a mutação N501Y, que melhora a ligação da proteína spike aos receptores celulares, tornando o vírus mais contagioso. Ele também contém uma mutação D614G, que aumenta a replicação viral e uma mutação P681H, cuja função não é clara, mas que surgiu espontaneamente muitas vezes
Beta (B.1.351)	A variante Beta foi detectada pela primeira vez na África do Sul e também foi designada como variante de preocupação em dezembro de 2020. Sua prevalência global foi diminuída à medida que a variante Delta assumiu o controle. Além de três das mutações observadas na variante Alpha (ou Alpha plus) (E484K, N501Y e D614G), a Beta contém uma mutação K417N, que pode ajudar o vírus a evitar anticorpos neutralizantes gerados pela vacinação ou infecção anterior. Designada como uma variante de preocupação em janeiro de 2021, a Gama foi detectada pela primeira vez no Brasil.

---

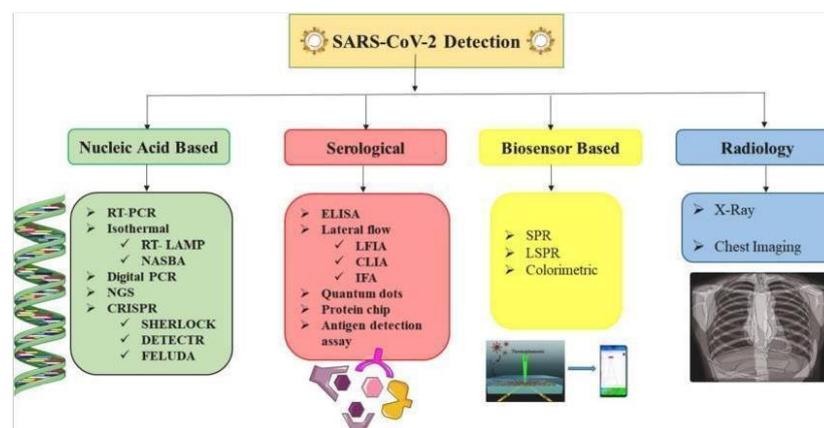
<p>Gama (P.1)</p>	<p>Como algumas outras variantes de preocupação, ele contém as mutações E484K, N501Y e D614G. Ela também contém uma mutação K417T – associada ao aumento da ligação às células humanas, o que pode facilitar a propagação do vírus – e uma mutação H655Y, cuja função é desconhecida.</p>
<p>Delta (B.1.617.2)</p>	<p>A variante Delta foi detectada pela primeira vez na Índia em maio de 2021 e espalhou por todo o mundo, ultrapassando rapidamente as variantes existentes para se tornar a variante dominante em muitos países. A Delta contém a mutação D614G, além de muitas outras não vistas em outras variantes de preocupação. Estas incluem uma mutação L452R, que possivelmente aumenta a capacidade infecciosa e pode ajudar o vírus a escapar da destruição pelas células imunes; uma mutação T478K, que pode ajudar o vírus a evitar o reconhecimento pelo sistema imunológico; e uma mutação P681R, que está associada a uma capacidade aprimorada de desencadear doenças graves. Também houve relatos de uma variante 'Delta plus', que foi identificada pela primeira vez no Nepal e carrega uma mutação K417N adicional.</p>
<p>Omicron (B.1.1.529)</p>	<p>A variante Omicron foi rapidamente identificada em vários países em novembro de 2021, depois que cientistas sul-africanos alertaram a OMS sobre um aumento repentino nos casos de COVID-19 na província de Gauteng, na África do Sul, coincidindo com a detecção da variante. A primeira infecção Omicron conhecida e confirmada foi de uma amostra coletada em 9 de novembro de 2021. Em 3 de dezembro de 2021, foi identificada em 22 locais e espalhou por todo o mundo, incluindo partes da América do Norte e do Sul, Europa, África, Ásia e Austrália. A Omicron tem um grande número de mutações. Estas incluem as mutações N501Y, D614G, K417N e T478K, que também são encontradas em outras variantes preocupantes, além de muitas outras que ainda não foram caracterizadas. A partir da variante ômicron, que se tornou dominante no mundo no início de 2022, novas subvariantes da ômicron surgiram e atualmente dominam as novas infecções.</p>

---

### 1.13 Diagnóstico de COVID.

O diagnóstico para a COVID-19 é realizado por testes de reação em cadeia da polimerase em tempo real com transcrição reversa (RT-qPCR) (RT-PCR), além de características radiológicas, laboratoriais e clínicas consistentes com esta condição (Figura 5) (YILDIRIM et al., 2021). Em relação ao diagnóstico da COVID-19, os testes de amplificação de ácidos nucleicos são considerados os mais sensíveis, sendo a RT-qPCR o método padrão-ouro, com sensibilidade geral de 0,96 (intervalo de confiança [IC] de 95%: 0,93-0,98) e falso negativo taxa de 0,06 (IC95%: 0,04-0,08), segundo meta-análise recente (REDDY et al., 2021). A tomografia computadorizada de tórax é outra peça fundamental para o diagnóstico da COVID-19 e acompanhamento da evolução do quadro do paciente (AI et al., 2020). Embora a identificação de lesões típicas causadas por SARS-CoV-2 seja relevante, apresentando alta sensibilidade, ela possui baixa

especificidade, uma vez que achados de imagem também podem estar presentes em outras infecções virais com sintomas contínuos semelhantes a COVID-19.



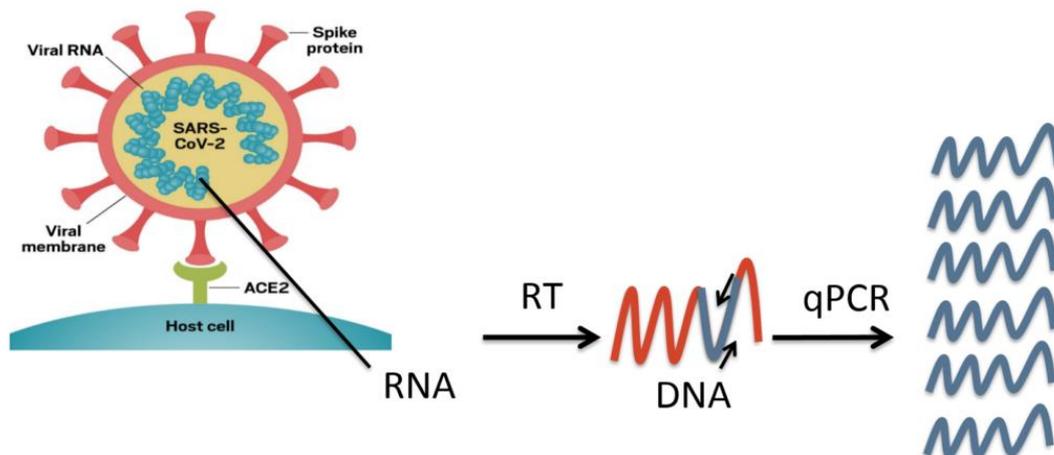
**Figura 5. Métodos para detecção de SARS-CoV-2.** Fonte: (SHARMA et al., 2021)

#### 1.14 Técnica de RT-qPCR para detecção de RNA viral do SARS-CoV-2

A amostra para análise é coletada das vias aéreas superiores, por meio de um swab introduzido na nasofaringe de pacientes infectados. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é a análise quantitativa de DNA e RNA. A técnica evoluiu rapidamente nos últimos anos e o crescente interesse em aplicações da PCR favoreceu o desenvolvimento da PCR quantitativa em tempo real, também conhecida como qPCR. Essa técnica é atualmente o padrão ouro para o diagnóstico da COVID-19 de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS).

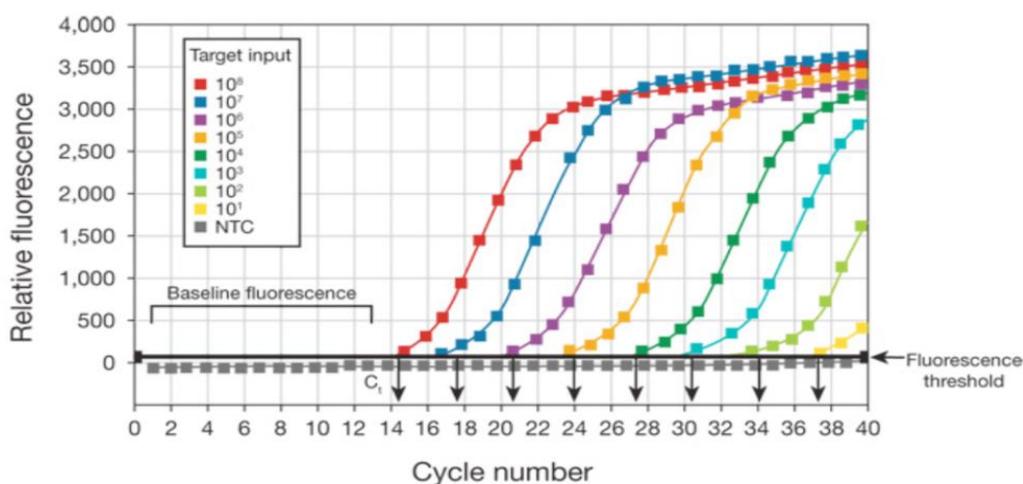
#### 1.15 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

A qPCR é uma derivação das descobertas de Karry Mullis na década de 80 que tem como principais características a detecção e quantificação de fluorescência emitida durante cada ciclo de uma reação de PCR e a sensibilidade de detectar poucas cópias de DNA presentes em uma dada amostra. Se uma pessoa estiver trabalhando com amostra de RNA, inicialmente é necessário realizar a sua conversão para DNA complementar (cDNA) antes com reagentes específicos, etapa conhecida como transcrição reversa (RT). Portanto, a PCR que utiliza o RNA como molde é conhecida como RT-qPCR. O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA, para avaliar seu material genético em uma amostra biológica é necessário fazer essa etapa de transcrição reversa no laboratório (Figura 6) (KUBISTA et al., 2006).



**Figura 6. Esquema de conversão de RNA do SARS-CoV-2 em cDNA para amplificação.** Fonte: (KUBISTA et al., 2006).

Após a obtenção da amostra de DNA ou cDNA, na qPCR o ácido nucleico é geralmente colocado em placas de 96 ou 384 poços juntamente com os reagentes para uma PCR convencional, mas a diferença é que será utilizado um reagente específico ao se intercalar na dupla-fita do DNA permite a quantificação do produto gerado após os ciclos de reação. Durante a amplificação, um software constrói em tempo real um gráfico relacionando os ciclos de termociclagem com a intensidade de fluorescência emitida durante a amplificação do DNA nas amostras, ciclo a ciclo (Figura 7).



**Figura 7. Painel de análise da expressão do gene alvo em ciclo de fluorescência emitida durante a amplificação do DNA nas amostras, ciclo a ciclo.** Fonte: (KUBISTA et al., 2006).

Para a avaliação da presença ou não do material genético do vírus em amostras respiratórias, é necessária a realização de uma coleta de amostra de *swab* de nasofaringe. Posteriormente, o RNA é isolado e este é convertido em cDNA. Para que possa ser realizada a qPCR para SARS-CoV-2, além dos reagentes de uma PCR convencional, uma

variedade de alvos genéticos do vírus é usada por diferentes fabricantes, com a maioria dos testes utilizando um ou mais alvos. Apesar de ser uma tecnologia com boa precisão, falsos negativos podem ocorrer em torno de 0,06 % das reações (KUBISTA et al., 2006).

#### 1.16 Expressão de proteínas heterólogas

Um dos ramos mais importantes da engenharia genética é a expressão de proteínas recombinantes usando sistemas de expressão biológica. Atualmente, diferentes sistemas de expressão são utilizados para a produção de proteínas recombinantes, incluindo bactérias, leveduras, bolores, mamíferos, plantas e insetos. Existem diversos sistemas funcionais e/ou comerciais de expressão de proteínas recombinantes e a escolha de cada sistema vai depender da finalidade almejada para a proteína de interesse. O rendimento e a atividade biológica da proteína recombinante são diferentes para cada sistema e dependem de diversos fatores como solubilidade, estabilidade e tamanho da proteína. Cada proteína apresenta problemas particulares de expressão devido à sequência única de aminoácidos.

A expressão proteica em *E.coli* tem como vantagem a habilidade de produção de proteínas heterólogas em grande quantidade. O rápido crescimento bacteriano quando comparado a células de mamíferos, permitindo a purificação e análise de expressão em um menor tempo (ROSANO & CECCARELLI, 2014). No entanto, bactérias não são capazes de glicosilar proteínas e realizar demais modificações pós-traducionais (BANEYX, 1999).

Leveduras apresentam avançadas vias de dobramento para proteínas heterólogas. Quando as sequências de sinalização são utilizadas, a levedura é capaz de processar e secretar a proteína corretamente dobrada. Outra vantagem é o rápido crescimento das leveduras em um meio simples de cultura, diminuindo o custo de produção. A tecnologia de fermentação é amplamente utilizada para a expressão de proteínas de interesse clínico e industrial. Apresenta como desvantagem a incapacidade de glicosilar proteínas animais corretamente, realiza em alguns casos hiperglicosilação pela expressão por *Sacchromyces cerevisiae* e degradação eventual de proteínas recombinantes pela expressão por *Pichiapastoris* (DALY; HEARN, 2005).

A grande vantagem da expressão proteica em células de mamífero é que a sinalização, o processamento e a secreção de proteínas eucarióticas são corretamente e eficientemente reconhecidas pelas células de mamíferos. No entanto, essa é uma abordagem com elevado custo atribuída aos meios de cultivos e apresenta como

dificuldades a manutenção das células relacionadas a oxigenação, acúmulo de dióxido de carbono e estabilidade da linhagem celular (PICANÇO-CASTRO et al., 2014).

A expressão proteica em células de inseto mediadas por Baculovírus produz grande quantidade de proteína heteróloga preservando sua atividade funcional (RIBEIRO et al., 2015). A manutenção das células requer meio de qualidade e quantidade suficiente de oxigenação. Já a desvantagem está relacionada à presença de proteases ou enzimas proteolíticas que podem degradar a proteína de interesse (VERMA; BOLETI; GEORGE, 1998).

### 1.17 Baculovírus como vetor de expressão

Baculovírus são vírus em forma de bastão e envelopados (do latim, baculum, cano, bengala, bastão), infectam animais da Classe Insecta (INCEOGLU et al., 2001). Estes vírus pertencem à família *Baculoviridae* com genoma na forma de DNA dupla-fita (dsDNA), circular, super envelopado e com tamanho variando entre 80.000 e 180.000 pares de bases (pb) (ROHRMANN, 2019).

Os baculovírus são utilizados no controle biológico de pragas agrícolas e florestais (CASTRO et al., 1999). Além disso, são mundialmente utilizados como vetores de expressão de proteínas heterólogas (KOST; CONDREAY; JARVIS, 2005). A sua habilidade de transdução de células de mamíferos como o baculovirus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) sugere que estes organismos possam ser utilizados como ferramentas em estudos de terapia gênica (HITCHMAN et al., 2011). Atualmente, milhares de proteínas recombinantes, desde enzimas citosólicas a proteínas ligadas à membrana, foram produzidas com sucesso em células de inseto infectadas por baculovírus recombinantes (KOST; CONDREAY; JARVIS, 2005).

O sistema de expressão de proteínas heterólogas utilizando baculovírus baseia-se na introdução de genes de interesse, oriundos de outros organismos na região de um gene não-essencial para replicação viral, sob o comando de um promotor forte, como por exemplo, o promotor do gene da poliedrina (polh). A deleção desse gene pela inserção do fragmento de DNA produz um vírus que é capaz de se replicar em células de inseto, mas não expressa a poliedrina (proteína formadora de um corpo de oclusão proteica que serve para a proteção dos nucleocapsídeos do baculovírus no ambiente). As células infectadas pelo vírus irão expressar a proteína heteróloga de interesse e podem ser facilmente visualizadas no microscópio óptico, caracterizadas pela perda de morfologia e hipertrofia nuclear (CASTRO et al., 1999; ROHRMANN, 2019; SMITH; SUMMERS; FRASER, 1983).

A utilização de baculovírus como sistema de expressão de proteínas heterólogas possui algumas vantagens como a habilidade de realizar modificações pós-traducionais adequadas; a capacidade de inserir grandes insertos ou múltiplos genes, devido ao grande genoma viral; a biossegurança do manuseio das células, já que baculovírus não são capazes de infectar células humanas, e uma alta produção da proteína heteróloga, devido à utilização de promotores fortes, como o promotor polh ou o promotor p10, derivado de uma proteína de massa molecular de 10 kDa chamada de P10, expresso nos estágios finais de infecção e que conferem uma alta expressão protéica (HU, 2005).

Estas vantagens possibilitam o uso de baculovírus na expressão de antígenos virais com finalidade vacinal e de diagnóstico, tanto humano, quanto veterinário. As vacinas contra Peste Suína (BAYOVAC CF 2™ e PORCILISPESTITM) foram produzidas pela expressão da glicoproteína de envelope E2 de CSFV (*classical swine fever virus*), já a vacina humana contra câncer cervical induzida por HPV (Cervarix®, GSK) foi produzida pela expressão das proteínas L1 de HPV-16 e HPV-18 (human papillomavirus) sob a forma de partículas tipo vírus (VLPs). Ambas estão sendo comercializadas mundialmente (ZHENG et al., 2004). Mais recentemente, as vacinas Fublock® (Protein Sciences Corporation, Cox et al., 2015), contra Influenza, contra COVID-19 NVX-CoV2373 (Novavax) (SHINDE et al., 2021) estão disponíveis no mercado.

### 1.18 Cromatografia de afinidade

A cromatografia de afinidade pode ser definida como um método cromatográfico líquido no qual um agente biológico ou ligante biomimético é utilizado para a retenção seletiva de compostos complementares. Esta forma de cromatografia líquida foi originalmente usada por Starkenstein em 1910 para a purificação de amilase através do uso de amido como suporte sólido. Este método continuou a desenvolver-se lentamente ao longo dos próximos 50 anos. No entanto, foi na década de 1960 que suportes adequados como agarose frizada, desenvolvido por Hjerten, tornaram-se disponíveis, bem como técnicas de imobilização relativamente simples para esses suportes. Um avanço importante nesta última área foi um artigo em 1967 por Axen, Porath e Ernback no qual o método de brometo de cianogênio para imobilização de proteínas e peptídeos foi publicado pela primeira vez. Esta abordagem foi então usada em 1968 por Cuatrecasas, Anfinsen e Wilchek para purificar enzimas através do uso de inibidores enzimáticos imobilizados. Foi também nessa época que o termo 'cromatografia de afinidade' foi proposto para descrever essa técnica (MAYERS; VAN OSS, 1998).

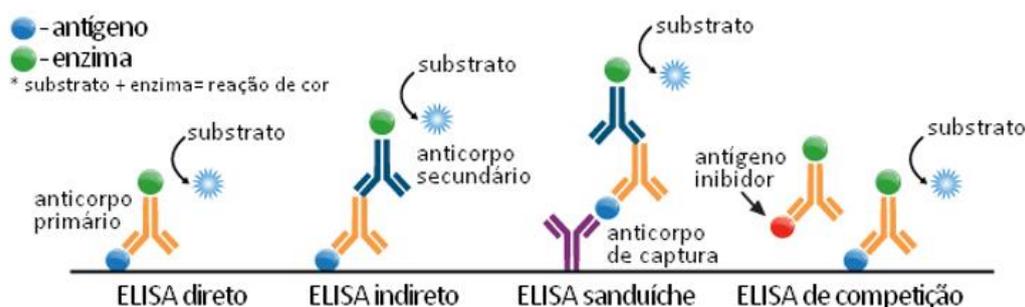
A cromatografia de afinidade é relativamente simples de realizar e é uma ferramenta

poderosa para a separação de macromoléculas biológicas. A alta seletiva desta abordagem muitas vezes permite o desenvolvimento de estratégias de purificação em uma única etapa, mesmo quando se trabalha com misturas diluídas e altamente complexas. Essa simplicidade e a variedade de ligantes que podem ser usados com essa abordagem a tornaram uma ferramenta importante em separações em escala de processo. No entanto, a cromatografia de afinidade moderna também desempenha um papel importante na análise e estudo de sistemas biológicos. Por exemplo, a maioria das formas de cromatografia líquida quiral, como aquelas que usam ciclodextrinas imobilizadas ou proteínas séricas, pode ser considerada uma subcategoria de cromatografia de afinidade. (MAYERS; VAN OSS, 1998).

#### 1.19 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos IgG anti-proteína N

O ELISA serve como um importante método analítico confiável e barato para diagnósticos, pesquisas biomédicas e epidemiológicas (MINIC et al., 2020). Um ELISA otimizado, padronizado e validado tem papel significativo no acompanhamento de perfil sorológico de populações que tiveram infecções naturais com o SARS-CoV-2 durante a pandemia ou foram vacinadas. Esta compreensão da resposta imune contra o vírus é de suma importância para tomada de decisões de gestores públicos. O desenvolvimento de um ELISA envolve procedimentos de diversas etapas que devem ser testadas: concentração do antígeno para revestir a placa de fundo U, temperatura, duração de cada etapa, tipo do tampão, bloqueio de saturação, métodos de preparação das amostras, escolha e diluição do anticorpo secundário e método de detecção do sinal (MINIC et al., 2020). Os testes do tipo ELISA são normalmente padronizados em laboratórios de referência para a detecção de anticorpos com sensibilidade e especificidade aceitáveis. Esse método versátil é capaz de identificar reações imunoenzimáticas quantitativa e qualitativa e especificar uma substância, que normalmente é um antígeno, que é imobilizado quimicamente em uma microplaca ou diretamente, por um anticorpo de captura (SHAH; MAGHSOUDLOU, 2016). Existem quatro tipos principais: ELISA direto, ELISA indireto, ELISA sanduíche e ELISA de bloqueio (Figura 8). A ELISA direta é realizada utilizando um anticorpo de detecção primária, formando assim um complexo antígeno-anticorpo. Então, o anticorpo de detecção primária é marcado diretamente com a enzima.

O ELISA indireto é semelhante ao ELISA direto, mas se utiliza um anticorpo secundário marcado, apresentando maior especificidade na detecção. O ELISA sanduíche é realizado utilizando um antígeno aderido a um suporte sólido, como a placa de ELISA (geralmente deixado para se ligar à placa previamente, o que comumente chamamos de sensibilizar a placa) e a seguir coloca-se sobre este os soros em teste (ex. soro humano), na busca de anticorpos contra o antígeno (AYDIN, 2015). Se houver anticorpos no soro em teste ocorrerá a formação da ligação antígeno-anticorpo, que posteriormente é detectada pela adição de um segundo anticorpo dirigido contra imunoglobulinas da espécie onde se busca detectar os anticorpos. Outro método é o ELISA de bloqueio ou competição, em que a presença de anticorpos em determinado soro é revelada pela competição com um anticorpo específico (mono ou policlonal) dirigido contra o antígeno. Igualmente, o resultado é dado pela adição de um conjugado, porém a coloração aparecerá nos orifícios onde não havia anticorpos.



**Figura 8. Diferentes formatos de teste tipo ELISA propostos para diagnóstico da COVID-19.** ELISA direto; ELISA indireto; ELISA duplo sanduíche; ELISA de Bloqueio. Fonte: (SARRA; MÜLFARTH, 2021).

## 2. JUSTIFICATIVA

A atual pandemia da COVID-19, causada pelo SARS-CoV-2, exige vários produtos e serviços biotecnológicos para detecção, tratamento e prevenção de infecções e doenças causadas por esse vírus. Além das ferramentas moleculares para detecção viral, como a RT-qPCR, técnicas sorológicas têm sido bastante empregadas para avaliar a soroconversão de pacientes infectados e imunizados (GONG et al., 2021). Portanto, a produção de antígenos de SARS-CoV-2 tornou-se indispensável para a fabricação de testes sorológicos, por exemplo, ELISA ou uso em estudos básicos, visando uma melhor compreensão da infecção por SARS-CoV-2 e respostas imunes desencadeadas pelo hospedeiro. Nesse contexto, optamos pela proteína N do SARS-CoV-2, que é responsável pelo empacotamento do genoma e tem se mostrado um dos principais alvos da resposta

humoral durante a infecção viral SARS-CoV-2 (OLIVEIRA; DE MAGALHÃES; HOMAN, 2020; WU; MCGOOGAN, 2020).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Desenvolver um teste sorológico (ELISA) para detecção de anticorpos anti-proteína N do SARS-COV-2 circulantes em pacientes atendidos no Hospital Regional de Santa Maria. Tendo como ferramenta proteínas recombinantes produzidas com a utilização do sistema baculovírus/célula de inseto para expressão heteróloga.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Padronização de ELISA indireto utilizando as proteínas produzidas;
- Testes de ELISA indiretos *in-house* para avaliação da sensibilidade, especificidade e acurácia do método proposto.

### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1 Grupos de estudos e aspectos éticos.

Neste trabalho foi realizado um mapeamento dos pacientes atendidos em hospitais da rede pública do Distrito Federal para obtenção das amostras de pacientes positivos para a COVID-19. As amostras foram obtidas por vigilância ativa no Hospital Regional de Santa Maria administrado pelo Instituto de Gestão Estratégica do Distrito Federal-IGESDF. Numa perspectiva de obtenção de oitocentas e vinte uma (821) amostras positivas (confirmadas por RT-PCR) e 54 amostras negativas, pré-pandemia.

Na avaliação para testagem do antígeno no protótipo foram utilizadas amostras coletadas no HRSM de diferentes fases da infecção: pacientes com início e sintomas entre o primeiro (1º) ao sétimo (7º) dia, do oitavo (8º) ao décimo quarto (14º), décimo quinto (15º) ao vigésimo primeiro (21º) e superior a vinte e um dias dos primeiros sintomas. Período utilizado como padrão para avaliação e validação de testes (<https://testecovid19.org/avaliacoes/>). Ao todo foram avaliados 821 (oitocentos e vinte um) prontuários de pacientes confirmados para COVID-19 acessando o sistema

TRAKCARE da SES/DF, verificando a evolução médica dos pacientes com resultados positivos de exame de RT-qPCR, e todo processo de anamnese do paciente.

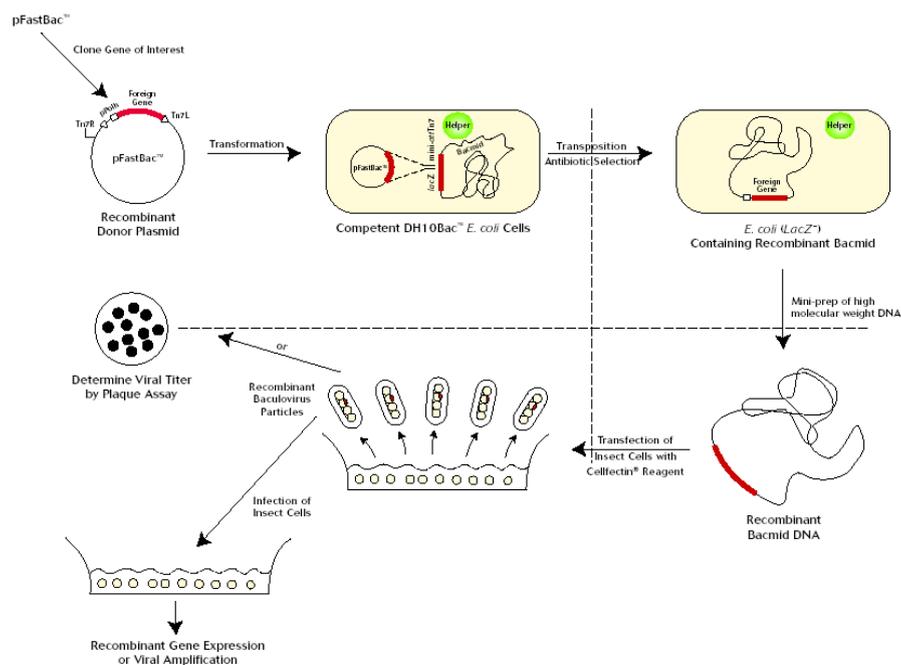
A coleta das amostras para os testes de COVID-19 foram realizadas no HRSM, segundo maior hospital de alta complexidade do Distrito Federal, localizado na cidade satélite de Santa Maria-DF, que foi o hospital de referência para os pacientes de média e alta complexidade para COVID-19. As amostras de pacientes positivas para a COVID-19, previamente diagnosticados através de métodos moleculares RT-qPCR, no laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal – LACEN, foram identificadas para estudo da dinâmica dos anticorpos IgG.

Os participantes foram submetidos a concordar com sua participação no estudo assinando o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE anexo 3), o qual permite a coleta das amostras e também a responder um breve questionário. As amostras foram devidamente coletadas, catalogadas e acondicionadas em congelador a  $-22^{\circ}\text{C}$ , organizadas metodologicamente no biobanco do Laboratório de Desenvolvimento e Produção de Testes Rápidos – LDPTTR do Centro Multiusuário de Pesquisa de Bioinsumos e Tecnologias em Saúde - CMBiotecs do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – IPTSP da Universidade Federal de Goiás- UFG. Todas as amostras de soro foram aliquotadas em *ependorf* de 1,5 mL e armazenada em congelador a  $-22^{\circ}\text{C}$  sendo descongeladas apenas para análises em ciclo único de descongelamento. A pesquisa obedeceu às diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos estabelecidos na Resolução N° 466, de 12 de dezembro de 2012 e às diretrizes para análise ética de projetos de pesquisas que envolvam armazenamento de material biológico humano ou uso de material armazenado em pesquisas anteriores estabelecidas na Resolução N° 441, de 12 de maio de 2011. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos (CEP:274/05). **CAAE: 30794920.7.0000.5317.**

4.2 Proteína nucleocapsídeo (N) do SARS-CoV-2 expressa em células de insetos usando um baculovírus recombinante.

Para a obtenção da amostra para testagem do protótipo de ELISA in-house, foi realizada a clonagem do gene e sua expressão e purificação em células de inseto foram conduzidas no laboratório de Baculovírus da Universidade de Brasília -UnB e os resultados foram publicados em 2021 (DE CAMARGO et al., 2022). Brevemente, o gene N de SARS-CoV-2 foi amplificado por RT-PCR. O gene N de SARS-CoV-2 foi purificado de uma amostra de swab nasofaríngeo gentilmente cedido pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal-LACEN-DF, Brasil. O produto de PCR foi

recombinado no vetor de entrada pDONR207 com BP Clonase Enzyme Mix (TFS), e o gene pDONR207-SARS-CoV-2- N resultante foi recombinado no vetor de destino pDEST8 com LR Clonase Enzyme Mix (TFS). Ao final, o gene pDEST8-SARS-CoV-2- N foi transformado em células *E. coli* DH10Bac (TFS) por eletroporação e o gene N, sob controle do promotor polh, foi inserido no genoma do baculovirus AcMNPV via transposição sítio dirigida (Bac-to- Bac®, Baculovirus Expression Systems, TFS), gerando o bacmídeo recombinante vAc - N-6xHis (Figura 9). Todos os procedimentos seguiram as recomendações dos fabricantes. Para recuperação de baculovírus infecciosos, um micrograma de DNA de vAc -N-6xHis foi transfectado em  $10^6$  células Sf9 derivada de *Spodoptera frugiperda* cultivadas em uma placa de seis poços usando o reagente de transfecção FuGENE® HD (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) e seguindo o protocolo do fabricante. As células Sf9 foram mantidas em meio TC-100 (Vitrocell, Campinas, São Paulo, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 25 µg/mL de anfotericina B e 50 mg/L de sulfato de gentamicina. Sete dias após a transfecção (p.t.), o sobrenadante foi coletado e o vírus recombinante foi titulado como descrito em O'REILLY; MILLER; LUCKOW, 1992. Em seguida, células Sf9 ( $1,5 \times 10^7$ ), cultivadas em frascos de 75 cm<sup>2</sup> foram infectadas em uma multiplicidade de infecção 1 (MOI) para aumentar o título do vírus. As células Sf9 infectadas apresentaram efeitos citopáticos típicos, como aumento do tamanho do núcleo, perda de fixação e formas irregulares. O inóculo viral amplificado foi utilizado para infecção (MOI 10) de células Sf9 em suspensão, que foram coletadas a 72 h pós infecção (p.i.). O padrão de expressão de proteínas foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12%, enquanto a expressão das proteínas de interesse foi confirmada por Western-blot (Sambrook e Russell, 2001), usando anticorpo primário contra a cauda de histidina e o secundário conjugado à enzima fosfatase alcalina (Figura 9). A purificação da proteína recombinante foi realizada a partir do extrato de células Sf9 em suspensão infectadas pelo vírus recombinante e coletadas a 72 h p.i. utilizando uma coluna HisTrap HP (GE Healthcare, Chicago, Illinois, U.S.A.) no aparelho AKTA lab-scale purification system, modelo AKTA Pure (GE Healthcare) Os dados foram coletados e analisados usando o software UNICORN 6.3 software (GE Healthcare). A identidade das proteínas purificadas foram confirmadas por SDS- PAGE e Western-blot, usando anticorpos anti-histidina e anti-proteína N comerciais. A proteína foi, então, utilizada nos testes imunológicos de ELISA indireto utilizando soro de pacientes previamente confirmados para infecção com testes moleculares.



**Figura 9. O Sistema de Expressão de Baculovírus Bac-to-Bac.** O Sistema de Expressão de Baculovírus Bac-to-Bac baseia-se na geração de baculovírus recombinante por transposição específica de sítio em *E. coli*, em vez de recombinação homóloga em células de insetos para produzir baculovírus recombinante. O cassete de expressão dos vetores pFastBac se recombina com o bacmídeo progenitor em DH10Bac *E. coli* para formar um bacmídeo de expressão. O bacmídeo original contém o fator de complementação *lacZ-alfa* para triagem eficiente de azul/branco de recombinantes positivos. O bacmídeo é então transfectado em células de insetos para produção de partículas de baculovírus recombinantes. Fonte disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/protein-expression-handbook/pex-handbook-insect-cell-based-protein-expression.html>. Acessado em 20 de Dezembro de 2022.

As principais vantagens dos sistemas de expressão Bac-to-Bac incluem: Títulos elevados (até  $10^8$  PFU/mL) permitem a expressão de proteínas em larga escala. O vetor pFastBac contém promotor de poliedrina para altos rendimentos de proteína recombinante (I) a clonagem TOPO rápida e confiável de 5 minutos ajuda a economizar tempo, (II) N- e C-terminal 6xHis tag para fácil purificação, (III) os sítios de protease TEV permitem a remoção da tag N- ou C-terminal, produzindo uma proteína nativa.

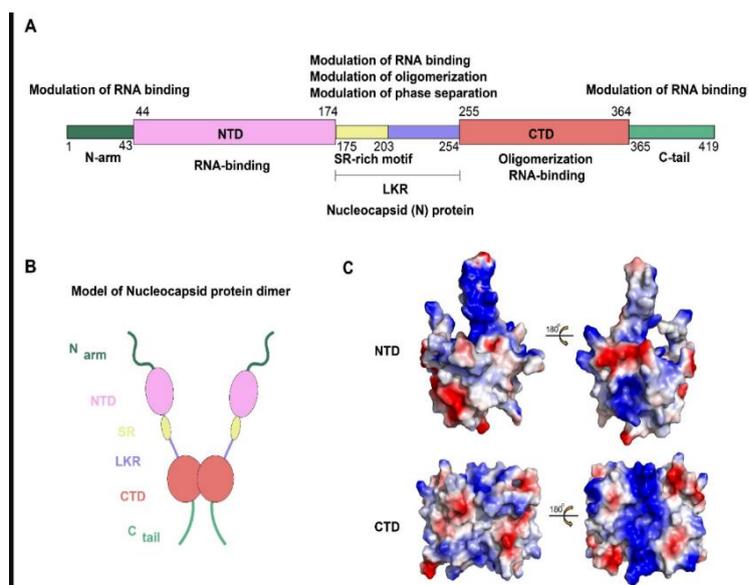
#### 4.3 Expressão do antígeno N usado no protótipo

O gene N do SARS-CoV 2 foi sintetizados quimicamente ou amplificado por PCR e clonado em vetores de expressão para bactérias (plasmídeos) e células de insetos (baculovírus). Esses vetores, por sua vez, foram utilizados para produção da proteína recombinante nas diferentes células. Após a confirmação da expressão da proteína por SDS-PAGE e Western-blot, a sua expressão foi otimizada e as proteínas purificadas por

cromatografia. A proteína foi, então, utilizada nos testes imunológicos de ELISA indireto utilizando soro de pacientes previamente confirmados para infecção com testes moleculares.

#### 4.4 A função biológica da proteína N do SARS-CoV-2

A proteína do nucleocapsídeo N é a molécula estrutural mais abundante do vírus, é altamente imunogênica e conservada entre os coronavírus humanos. Devido a essas características, ela tem sido bastante empregada nos testes sorológicos (AHMED et al., 2020). Essa possui 419 aminoácidos (ZENG et al., 2020) e é imunogênica (OLIVEIRA; DE MAGALHÃES; HOMAN, 2020; TILOCCA et al., 2020). A proteína N do SARS-CoV-2 é codificada pela nona ORF do vírus e é composta por 419 aminoácidos. Como outros CoVs, a proteína N do SARS-CoV-2 possui uma organização modular que pode ser dividida em regiões intrinsecamente desordenadas (IDRs) e regiões estruturais conservadas de acordo com as características da sequência. Os IDRs incluem três módulos: N-arm, região central de ligação flexível rica em Ser/Arg (LKR) e C-tail, enquanto as regiões estruturais conservadas incluem dois módulos: domínio N-terminal (NTD) e domínio C-terminal (CTD). Na estrutura primária, NTD e CTD são conectados por LKR e geralmente são flanqueados por N-arm e C-tail (Figura 10 A,B).

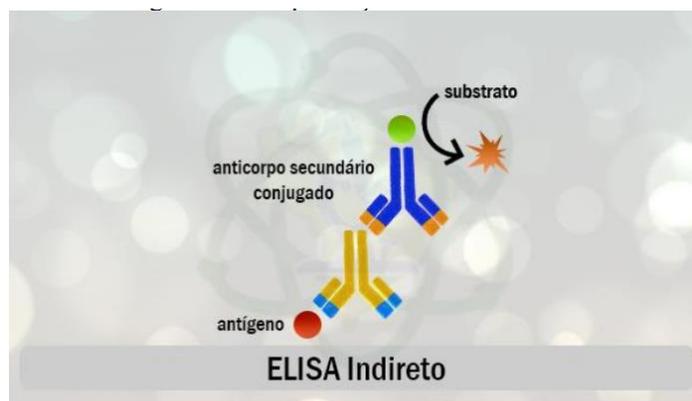


**Figura 10. Visão geral estrutural da proteína N do SARS-CoV-2.** (A, B) Esquema da organização modular da proteína N do SARS-CoV-2. As três regiões intrinsecamente desordenadas, incluindo o braço N, a região central de ligação flexível rica em Ser/Arg (SR) (LKR) e a cauda C, e o domínio N-terminal (NTD) e o domínio C-terminal (CTD) são ilustrado.

(C) Superfície eletrostática do SARS-CoV-2 N-NTD (PDB ID 6YI3) e N-CTD (PDB ID 7CE0). Azul denota potencial de carga positiva, enquanto vermelho indica potencial de carga negativa (BAI et al., 2021).

#### 4.5 Desenvolvimentos do teste do tipo ELISA indireto (protótipo) para a COVID-19

O princípio deste ensaio protótipo, visou detectar a presença de anticorpos IgG contra SARS-CoV-2 por sua ligação ao antígeno recombinantes (Nucleocapsídeo, N), sensibilizado na placa de fundo chato de 96 poços (Costar 3795), permitindo conhecer a concentração das reações, por meio de densidade óptica, em 450 nm em Leitora de ELISA (BIO-RAD iMark), e assim identificar as amostras com a presença ou não de anticorpos IgG contra SARS-CoV-2. O método empregado para a análise das amostras coletas dos pacientes do HRSM foi o protótipo de ELISA indireto (Figura 11).



**Figura 11.** Esquema de método *in-house* de ELISA indireto adaptado. (SARRA; MÜLFARTH, 2021).

#### 4.6 Padronização do protótipo ELISA indireto-*in house*.

O ELISA indireto foi realizado no Laboratório de Desenvolvimento e Produção de Testes Rápidos – LDPTR, Centro Multiusuário de Pesquisa de Bioinsumos e Tecnologias em Saúde - CMBiotecs - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – IPTSP - Universidade Federal de Goiás - UFG, laboratório de referência regional. Nessa primeira etapa, diferentes concentrações do protótipo tipo ELISA indireto foram testados com o antígeno do nucleocapsídeo N do SARS-CoV-2 produzidos pelo laboratório de Baculovírus da Universidade de Brasília em diferentes concentrações, utilizamos as concentrações iniciais de: 4, 5 e 6  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 12). As leituras foram realizadas por espectrofotometria de 450 nm em placa de 96 poços de fundo chato (Costar 3597) e lidas

em leitora de ELISA (BIO RAD-MODELOS iMark- Microplate Reader) para definir a melhor concentração e diluição e ser utilizada na testagem das amostras dos pacientes positivos para a COVID-19 (biobanco), assim como os controles negativos (amostras pré pandemia). Após a avaliação dos resultados obtidos nas três concentrações, adotou-se a melhor padronização do ELISA para ser aplicado no formato do ELISA indireto-*in house* (Tabela 6). A figura 12 mostra o esquema utilizado na montagem da placa para escolha da melhor concentração para padronização do teste protótipo in-house. A placa foi dividida em quatro colunas (A, B, N e 0), a coluna **N** identifica as amostras controles positivas com leituras positivas consideradas alta (positivo forte) a coluna **B**, identifica as amostras positivas com leituras mais baixas entre (positivo fraco), a coluna **N** identifica as amostras consideradas negativas e por último a coluna **0**, que representa a ausencia de amostras. As amostras utilizadas nas colunas A e B foram testadas com kit comerciais (Abbott e Roche) e classificadas como controles fortes e fracos. Todas as amostras positivas foram confirmadas por dois métodos (ELISA e RT qPCR). A amostras negativas foram testadas por RT qPCR e também pelos kits comerciais (Abbott e Roche), todas obtidas no período pré-pandemia e confirmadas como negativas por dois métodos e gentilmente cedidas pelo laboratório LDPTR-UFG.

TESTE 1 Anticorpo de detecção	Antígeno de Captura = N											
	4µg/mL				5µg/mL				6µg/mL			
	A	B	N	0	A	B	N	0	A	B	N	0
1:10.000	A	B	N	0	A	B	N	0	A	B	N	0
1:10.000	A	B	N	0	A	B	N	0	A	B	N	0
1:20.000	A	B	N	0	A	B	N	0	A	B	N	0
1:20.000	A	B	N	0	A	B	N	0	A	B	N	0
1:30.000	A	B	N	0	A	B	N	0	A	B	N	0
1:30.000	A	B	N	0	A	B	N	0	A	B	N	0
1:40.000	A	B	N	0	A	B	N	0	A	B	N	0
1:40.000	A	B	N	0	A	B	N	0	A	B	N	0
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

**Figura 12. Concentrações de antígenos N do SARS-CoV-2.** As concentrações de antígenos são mostradas em diferentes diluições do conjugado peroxidase de 1:10.000 a 1:40.000. **A)** Coluna com controle positivo forte, **B)** controle positivo fraco, **N)** Controle Negativo e **0)** Coluna branco.

**Tabela 6. Resultado das análises.**

	6 µg/mL				5 µg/mL				4 µg/mL				Conjugado*
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Diluições 10 <sup>3</sup>
A	0,690	0,342	0,26	0,104	0,809	0,394	0,505	0,229	1,034	0,810	0,987	0,436	1:10
B	0,590	0,426	0,294	0,16	0,893	0,446	0,600	0,216	1,113	0,750	1,253	0,469	
C	0,792	0,391	0,308	0,150	0,741	0,380	0,589	0,22	1,010	0,650	1,009	0,415	1:20
D	0,670	0,318	0,460	0,117	0,753	0,385	0,522	0,185	1,032	0,658	1,150	0,291	
E	0,623	0,299	0,305	0,105	0,680	0,353	0,526	0,174	0,850	0,550	0,893	0,319	1:30
F	0,401	0,271	0,371	0,105	0,634	0,284	0,501	0,173	0,677	0,504	0,801	0,264	
G	0,510	0,300	0,248	0,14	0,608	0,192	0,384	0,176	0,717	0,483	0,731	0,320	1:40
H	0,447	0,242	0,447	0,099	0,494	0,263	0,384	0,183	0,555	0,444	0,532	0,255	
	A	B	N	0	A	B	N	0	A	B	N	0	

\*A leitura foi realizada em leitora de ELISA (BIO-RAD iMark) com a DO de 450 nm dos controles positivos A e B, do controle negativo N e do branco (0) na placa sensibilizada nas concentrações 4, 5 e 6 µg/mL do antígeno N do SARS-CoV-2. A análise de 6 µg/mL apresentou a melhor leitura na diluição de 1:30.10<sup>3</sup> do conjugado.

Foram sensibilizadas as placas para ELISA de fundo chato (Costar 3597) de 96 poços (Figura 13) com 100 µL nas do antígeno N do SARS-CoV-2 nas concentrações de: 4, 5 e 6 µg/mL overnight na geladeira a 4°C. No dia seguinte as placas foram lavadas com PBS TWEEN 0,05 (PBSTWEEN) (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine-sigma-ref 2885) quatro vezes (4x) e bloqueadas com 200 µL de PBSTWEEN 1% BSA (Sigma) por uma hora a 37°C sem agitação. Em seguida as amostras foram diluídas 1/200 em BSA PBSTWEEN 0,05% e adicionadas na placa por mais uma hora. Em seguida as placas foram lavadas quatro vezes novamente com PBSTWEEN 0,05 % em cada poço. Na sequência foram realizadas quatro diluições do anticorpo secundário (Anti IgG- Sigma) conjugado a peroxidase (1:10x10<sup>3</sup>, 1:20 x 10<sup>3</sup>, 1:30 x 10<sup>3</sup> e 1:40 x 10<sup>3</sup>) e adicionados a placa. Em seguida incubados por mais uma (1) hora a 37 °C sem agitação. As placas foram lavadas novamente por quatro vezes com PBSTWEEN 0,05%. Posteriormente foram adicionadas 100 µL com solução TMB Homemade (Sigma) como substrato em cada poço. Após 15 minutos, a reação foi parada com a adição de 100 µL de ácido sulfúrico (H2SO4-Synth) 2,5N e realizada a leitura por espectrofotometria em 450 nm em Leitora de ELISA (BIO-RAD iMarl). Após análise dos resultados das diferentes concentrações (figura 12)(tabela 6), primou-se por utilizar a concentração de 6 µg/mL na diluição de

1:30.000 do conjugado contendo o anticorpo de detecção por apresentarem melhor desempenho nas análises dos cálculos obtidos. Levando-se em consideração as definições de padronização e validação de teste para ELISA desenvolvidos pela MERK, Brasil. Então foram sensibilizadas dezessete placas (17) placas de 96 poços de fundo chato com o antígenos N do SARS-CoV-2 e testadas em 294 amostras positivas para COVID-19 e 54 amostras negativas obtidas obtidas no período pré-pandemia e cedidas pelo Laboratório de Desenvolvimento e Produção de Testes Rápidos – LDPTR do Centro Multiusuário de Pesquisa de Bioinsumos e Tecnologias em Saúde - CMBiotecs do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – IPTSP da Universidade Federal de Goiás. Todas as análises foram realizadas em quadruplicata, tanto as amostras positivas, como negativas conforme figura 13.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
<b>A</b>	Pos. (+)	Neg. (-)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Soro
<b>B</b>	Pos. (+)	Neg. (-)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Soro
<b>C</b>	Pos. (+)	Neg. (-)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Soro
<b>D</b>	Pos. (+)	Neg. (-)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Soro
<b>E</b>	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	Soro
<b>F</b>	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	Soro
<b>G</b>	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	Soro
<b>H</b>	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	Soro

**Figura 13. Esquema de organização das amostras.** Na placa de 96 poços fundo chato (Ref: Costar 3795) as amostras foram sensibilizadas com o antígeno do nucleocapsídeo N do SARS-CoV-2 na concentração de 6 µg/mL. Fonte: Laboratório de Desenvolvimento e Produção de Testes Rápidos – LDPTR – UFG-GO.

#### 4.7 Cálculos do ELISA *in-house*.

Para obtenção do valor da densidade óptica de cada amostra, em 450 nm, foi utilizada a média das leituras em quadruplicata ( $ODA1+ODA1+ODA1+ODA1/4$ ), os cálculos das análises dos controles positivos e negativo também utilizou-se o cálculo da média. Cada amostra teve quatro leituras distintas, somadas e divididas pelo total de análise da amostra.

Cut-off - Negativo  $\leq 0,025$

Cut-off - positivo

#### 4.8 Soros utilizados

Todos os soros (amostras) de pacientes utilizados no presente trabalho foram obtidos de pacientes que deram entrada no Hospital Regional de Santa Maria-DF, localizado na região administrativa de Santa Maria no Distrito Federal. Esse hospital ficou como referência para os atendimentos de pacientes com COVID-19, tantos os casos de média e alta complexidade para COVID-19. Foram coletadas oitocentos e vinte uma amostras de pacientes confirmados para doença em diferentes períodos da infecção, separados em semanas, sendo os períodos de cada grupo definidos entre 1-7, 8-14, 15-21 dias e maior que 21 dias de infecção. Todos os pacientes que tiveram suas amostras submetidas a análises, foram separados após verificação do número de dias dos sintomas. O banco de amostras (Biobanco), foi uma construção conjunta dos laboratório da UFG em parceria com UnB, foram agregadas na formação do biobanco 821 amostras de pacientes do Hospital Regional de Santa Maria, no Distrito Federal, assim como amostras negativas obtidas no período pré pandemia e que estavam em andamento no laboratório de validação de testes da UFG. Para o início da formação do biobanco tivemos previamente que obter aprovação do Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos (CEP:274/05). CAAE: 30794920.7.0000.5317, que englobam outros projetos em andamento. O processo de obtenção de autorização dos CEP/CONEP, ocorreu em um período de seis meses para liberação das coletas e consulta aos prontuários eletrônicos pelo sistema TRAKCARE/SES/DF. As oitocentas e vinte uma amostras (821) obtidas, passaram por uma segunda triagem para identificar e separar os grupos de acordo com a evolução médica, aonde foram separados por início dos sintomas da infecção como descrito acima. Após a segunda triagem obtivemos um total de 294 amostras positivas confirmadas e selecionadas para testagem do protótipo *in-house*. As amostras utilizadas como controle negativo, foram separadas em um total de 54 amostras. Ao todo foram utilizadas 348 amostras para testagem dos protótipo ELISA *in-house* divididos em grupos por início dos sintomas.

#### 4.9 Determinação do *cut-off*

Utilizaram-se três metodologias para determinação do 'cut-off'. A primeira metodologia foi o cálculo do cut-off padronizado com a média das amostras negativas (soronegativo) mais três vezes o desvio-padrão encontrado.

A segunda utilizou-se o cálculo do cut-off padronizado com a média das amostras negativas (soronegativo) mais duas vezes o desvio-padrão encontrado.

Na terceira utilizou-se a curva ROC. Por fim, o terceiro cut-off foi determinado pela condução das análises da Curva Característica de Operação do Receptor (Curva ROC) conforme metodologia de De Long et al., (1988) utilizando 1.000 replicações de Bootstrap. A variável de classificação utilizada foi a positividade para COVID-19 (RT-PCR positivo) e as variáveis de teste foram os valores dos testes NBD e NBF. O índice de Youden (J) foi utilizado como critério para escolha do cut-off pela curva ROC (Youden, 1950).

O índice que determina o limite entre amostras positivas e negativas, foi calculado para cada placa realizada, no total foram 17 placas com todas as amostras positivas e negativas, considerando que cada placa contempla uma reação enzimática diferente, no entanto, um cut-off geral foi determinado para todos os testes calculados e empregados na análise dos resultados.

**Tabela 7. Tabela de contingência para avaliar a validade interna do teste**

Resultado do teste Amostras confirmadas			
	Soropositivo	Soronegativo	
Positivo	VP	FP	Total de testes positivos
Negativo	FN	VN	Total de testes negativos
			Total de amostras

\*Nota: Onde: **VP** = número de verdadeiros positivos **FP** = número de falsos positivo **VN**= número de falso negativo **FN** = número de verdadeiros negativos.

#### 4.10 Análise estatística

O desempenho geral dos testes de ELISA (com e descontando as ligações de fundo) foi realizado pela condução das análises da Curva ROC (De Long et al., 1988) e pelas outras duas metodologias de determinação do cut-off. Estimou-se as sensibilidades, especificidades, valores

preditivos positivos (VPP), valores preditivos negativos (VPN) e acurácia, acompanhadas pelos respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95%) para cada teste de ELISA, conforme as fórmulas apresentadas abaixo.

Cálculo para determinação da sensibilidade, especificidade e eficiência do ensaio de ELISA

**Tabela 8: Os cálculos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) foram realizados da seguinte forma:**

Critério	Fórmula
<i>Sensibilidade:</i>	$(VP / VP + FN) \times 100\%$ ;
<i>Especificidade:</i>	$(VN / VN + FP) \times 100\%$ ;
<i>VPP:</i>	$(VP / VP + FP) \times 100\%$ ;
<i>VPN:</i>	$(VN / VN + FN) \times 100\%$ .
<i>Eficiência:</i>	$(VN + VP) / (VN + FN + VP + FP)$

\*Nota: Onde: **VP** = número de verdadeiros positivos **FP** = número de falsos positivos **VN**= número de falso negativo **FN** = número de verdadeiros negativos.

- Em que: =

**Sensibilidade** é a capacidade de detectar a doença quando de fato está presente.

**Especificidade** é a probabilidade de o teste ser negativo na ausência de doença, ou seja, quantos resultados negativos serão obtidos nos indivíduos saudáveis.

**Valor preditivo positivo** é a probabilidade após o teste ser realizado de um resultado positivo ter realmente detectado a doença, e de um paciente com teste positivo.

**Valor preditivo negativo** é a probabilidade após o teste ser realizado de um resultado negativo ter realmente detectado a doença, e de um paciente com teste negativo.

**Acurácia** é a probabilidade de um teste classificar corretamente indivíduos infectados e não-infectados de uma população com uma dada prevalência.

## 5. RESULTADOS.

Foram utilizadas amostras de 294 pacientes confirmados para COVID-19 (média de idade: 58,1 anos; desvio padrão: 15,9; mediana: 62) e de 54 controles negativos. A média de dias do início dos sintomas da COVID-19 nas 294 amostras foi de 13,8 dias (desvio padrão: 5,3; mínimo: 2 e máximo: 37; mediana: 14 dias).

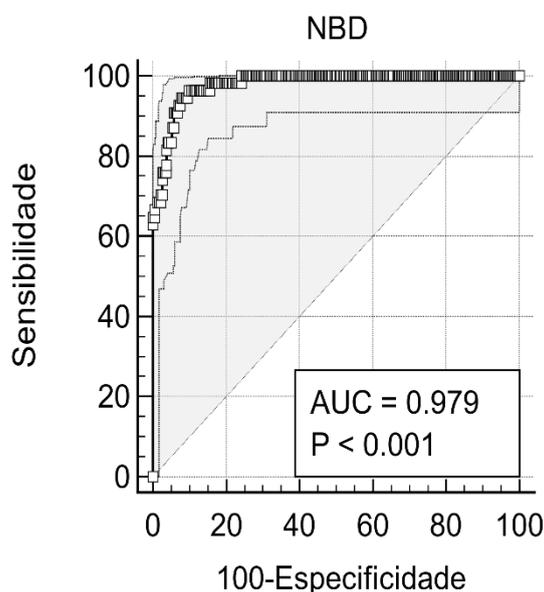
O desempenho geral dos testes de ELISA, descontando as ligações de fundo (Figura 14) ou não (Figura 15), através da análise das curvas ROC foram realizadas considerando todas as 348 amostras para definição do cut-off. O NBD foi o mais preciso

na discriminação das amostras positivas e controles, com área sobre a curva (AUC) de 0,979 ( $P < 0,001$ ). O cut-off escolhido pelo critério Youden foi de 0,025 para discriminar positivos e negativos, com uma sensibilidade de 94,4% e especificidade de 92,1%. O NBF apresentou uma AUC de 0,818 ( $P < 0,001$ ), com um cut-off escolhido de 0,208 (sensibilidade e especificidade de 81,5% e 78,1%) (Tabela 9).

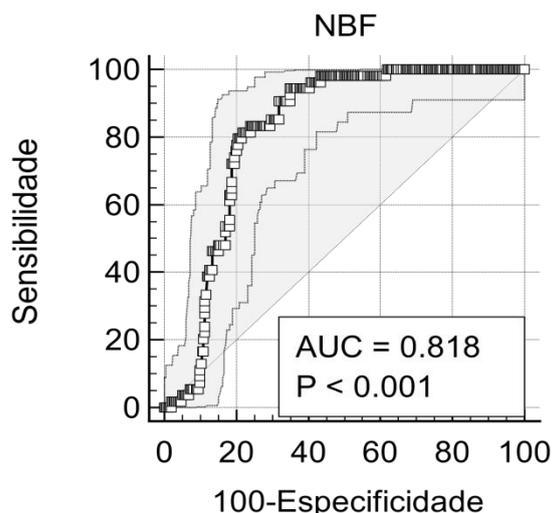
**Tabela 9. Análises das curvas ROC para os dois métodos**

Método	AUC (IC 95%)	Erro padrão	P	Youden en J	Cut-off	Sensibilidade de	Especificidade
NBD	0,979 (0,961-0,990)	0,007	<0,001	0,866	$\leq 0,025$	94,4	92,1
NBF	0,818 (0,773-0,856)	0,023	<0,001	0,596	$\leq 0,208$	81,5	78,1

Nota: análises realizadas para 348 amostras sendo 294 (84,4%) pacientes positivos para COVID-19 e 54 (15,6%) controles; AUC-Área abaixo da curva ROC (*Area under the ROC curve*); IC95%=Intervalo de confiança de 95%. NBD= sem reações de branco / NBF= com reações de branco.



**Figura 14. Curva ROC sem ligações de fundo.** Curva ROC para determinar o ponto de corte de positividade para antígeno nucleocapsídeo N (NB), com intervalo de confiança de 95%, com base em 294 amostras positivas para COVID-19 e 54 controles descontando as ligações de fundo. AUC-Área abaixo da curva ROC (*Area under the ROC curve*).



**Figura 15. Curva ROC com ligações de fundo.** Curva ROC para determinar o ponto de corte de positividade para antígeno nucleocapsídeo N (NB), com intervalo de confiança de 95%, com base em 294 amostras positivas para COVID-19 e 54 controles sem descontar as reações de fundos. AUC-Área abaixo da curva ROC (*Area under the ROC curve*).

A análise estatística dos valores preditivos positivos (VPP) e negativos (VPN) estão todos dentro dos respectivos intervalos de confiança (IC95%) para os diferentes grupos analisados, assim como a acurácia para todas as 348 amostras analisadas com e sem desconto das ligações de fundo. O melhor desempenho da sensibilidade e especificidade é observado no grupo NBD com sintomas inferior a sete dias (<7 dias) com sensibilidade de 100,0 (80,5–100,0) e especificidade de 94,4 (84,6–98,4) com intervalos de confiança (IC 95%). Os dados analisados (Tabela 10), mostram o potencial do protótipo ELISA *in-house* para a detecção de IgG anti N nos pacientes que apresentaram os sintomas iniciais no intervalo de um a sete (1-7) dias no grupo NBD. Os resultados mostram que o grupo NBF, sem o desconto das ligações inespecíficas, apresentam uma menor sensibilidade e maior especificidade para todos os grupos analisados, conforme (Tabela 10), com exceção apenas para o grupo de pacientes com sintomas inferiores a sete dias (<7 dias) que são praticamente iguais.

**Tabela 10. Sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia**

Critério	Sensibilidade (IC95%)	Especificidade (IC95%)	VPP (IC95%)	VPN (IC95%)	Acurácia (IC95%)
<b>Total (n=348)</b>					
<b>NBD</b>					
3x	85,3 (80,7–89,1)	96,3 (87,3–99,6)	99,2 (97,0–99,8)	54,7 (47,7–61,6)	87,0 (83,0–90,4)
2x	90,4 (86,4–93,5)	94,4 (84,6–93,5)	98,9 (80,1–88,1)	64,6 (96,7–99,6)	91,0 (87,5–93,8)
<b>ROC</b>	<b>92,12 (88,4–94,9)</b>	<b>94,4 (84,6–98,4)</b>	<b>98,9 (96,8–99,6)</b>	<b>68,9 (59,8–76,7)</b>	<b>92,5 (89,2–95,0)</b>
<b>NBF</b>					
3x	50,0 (44,1–55,9)	98,2 (90,1–100,0)	99,3 (95,4–99,0)	26,6 (24,4–29,1)	57,5 (52,1–62,8)
2x	60,3 (54,4–65,9)	94,4 (84,6–98,4)	98,3 (95,1–99,4)	30,5 (27,4–33,9)	65,6 (60,3–70,6)
<b>ROC</b>	<b>78,1 (72,9–82,7)</b>	<b>81,5 (68,6–90,8)</b>	<b>95,8 (92,9–97,6)</b>	<b>40,7 (34,9–46,9)</b>	<b>78,6 (73,9–82,2)</b>
<b>&lt;7 dias (n=71)</b>					
<b>NBD</b>					
3x	94,1 (71,3–99,9)	96,3 (87,3–99,6)	88,9 (67,1–99,9)	98,1 (88,6–99,7)	95,8 (88,1–99,1)
2x	100,0 (80,5–100,0)	94,4 (84,6–98,4)	85,0 (65,4–94,5)	100,0	95,8 (88,1–99,9)
<b>ROC</b>	<b>100,0 (80,5–100,0)</b>	<b>94,4 (84,6–98,4)</b>	<b>85,0 (65,4–94,5)</b>	<b>100,0</b>	<b>95,8 (88,1–99,9)</b>
<b>NBF</b>					
3x	35,3 (14,2–61,7)	98,2 (90,1–100,0)	84,7 (43,7–97,9)	82,8 (77,2–87,3)	83,1 (72,3–91,0)
2x	52,9 (27,8–77,0)	94,4 (84,6–98,4)	75,0 (47,8–90,8)	86,4 (79,3–91,4)	84,5 (74,0–92,0)
<b>ROC</b>	<b>82,4 (56,6–96,2)</b>	<b>81,5 (68,6–90,8)</b>	<b>58,3 (43,4–71,9)</b>	<b>93,6 (83,9–97,6)</b>	<b>81,7 (70,7–89,9)</b>
<b>7-14 (n=201)</b>					
<b>NBD</b>					
3x	94,3 (75,2–88,1)	96,3 (87,3–99,6)	98,4 (93,9–99,6)	66,7 (58,4–74,0)	86,1 (80,5–90,5)
2x	88,4 (82,4–93,1)	94,4 (84,6–93,5)	97,7 (93,5–99,2)	75,0 (65,6–82,5)	90,1 (85,1–93,9)
<b>ROC</b>	<b>91,8 (86,2–95,7)</b>	<b>94,4 (84,6–98,4)</b>	<b>97,8 (93,7–99,3)</b>	<b>81,0 (71,1–88,0)</b>	<b>92,5 (88,0–95,8)</b>
<b>NBF</b>					
3x	52,0 (43,7–60,3)	98,2 (90,1–100,0)	98,7 (91,7–99,8)	42,7 (38,6–47,0)	64,4 (57,3–71,0)
2x	59,5 (51,1–67,4)	94,4 (84,6–98,4)	96,7 (90,6–98,9)	46,0 (40,9–51,1)	68,8 (61,9–75,1)
<b>ROC</b>	<b>75,7 (68,0–82,4)</b>	<b>81,5 (68,6–90,8)</b>	<b>91,8 (86,4–95,2)</b>	<b>55,0 (47,2–62,5)</b>	<b>77,8 (70,8–82,8)</b>
<b>&gt;14 (n=182)</b>					
<b>NBD</b>					
3x	87,5 (80,5–92,7)	96,3 (87,3–99,6)	98,3 (93,5–99,5)	76,5 (67,2–83,8)	90,1 (84,8–94,0)
2x	91,4 (85,1–95,6)	94,4 (84,6–98,8)	97,5 (92,8–99,2)	82,3 (72,4–89,1)	92,3 (87,4–95,7)
<b>ROC</b>	<b>91,4 (85,1–95,6)</b>	<b>94,4 (84,6–98,8)</b>	<b>97,5 (92,8–99,2)</b>	<b>82,3 (72,4–89,1)</b>	<b>92,3 (87,4–95,7)</b>
<b>NBF</b>					
3x	54,3 (45,3–63,2)	98,2 (90,1–100,0)	98,6 (90,8–99,8)	47,8 (43,0–52,6)	67,4 (60,1–74,2)
2x	62,2 (53,2–70,7)	94,4 (84,6–98,4)	96,3 (89,7–98,8)	51,5 (45,7–57,3)	71,8 (64,7–78,3)
<b>ROC</b>	<b>80,3 (72,3–86,8)</b>	<b>81,4 (68,6–90,8)</b>	<b>91,1 (85,3–94,7)</b>	<b>63,8 (54,8–71,9)</b>	<b>80,7 (74,2–86,2)</b>

IC95%=Intervalo de Confiança de 95%. NBD com desconto de fundo; NBF com fundo.

A sensibilidade e a especificidade foram calculadas para cada grupo de amostras separadas por diferentes períodos do início dos sintomas, levando em consideração as análises com maior potencial para diagnóstico assertivo, segundo a evolução médica investigada nos prontuários eletrônicos. As análises foram avaliadas comparando dois grupos para aferição dos cálculos, NBF (reações sem desconto do branco) e NBD (reações com desconto do branco), onde são excluídas as reações inespecíficas. Observamos que o cálculos (Tabela 11) para auferir sensibilidade e especificidade, são mais efetivos utilizando-se a Curva ROC (*Area under the ROC curve*) para determinar o ponto de corte de positividade para antígeno nucleocapsídeo N (NB), com intervalo de confiança de 95%, com base em 294 amostras positivas (confirmadas por RT qPCR) para COVID-19 e 54 controles negativas obtidas em período pré-pandemia. Nas amostras analisadas em sua totalidade (348 amostras), nota-se uma diminuição da sensibilidade e especificidade 78,1 (72,9–82,7) e 81,5 (68,6–90,8) quando analisadas sem o desconto das reações de branco, consideradas reações inespecífica (NBF).

**Tabela 11: Comparação entre a sensibilidade e especificidade quando descontadas ou não as reações inespecíficas.**

Critério	Teste*				P*
	NBD		NBF		
	Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade	Especificidade	
Total (n=346)					
3x	85,3 (80,7–89,1)	96,3 (87,3–99,6)	50,0 (44,1–55,9)	98,2 (90,1–100,0)	<0,001
2x	90,4 (86,4–93,5)	94,4 (84,6–93,5)	60,3 (54,4–65,9)	94,4 (84,6–98,4)	<0,001
<b>ROC</b>	<b>92,12 (88,4–94,9)</b>	<b>94,4 (84,6–98,4)</b>	<b>78,1 (72,9–82,7)</b>	<b>81,5 (68,6–90,8)</b>	<b>&lt;0,001</b>
<7 dias (n=71)					
3x	94,1 (71,3–99,9)	96,3 (87,3–99,6)	35,3 (14,2–61,7)	98,2 (90,1–100,0)	0,003
2x	100,0 (80,5–100,0)	94,4 (84,6–98,4)	52,9 (27,8–77,0)	94,4 (84,6–98,4)	0,057
<b>ROC</b>	<b>100,0 (80,5–100,0)</b>	<b>94,4 (84,6–98,4)</b>	<b>82,4 (56,6–96,2)</b>	<b>81,5 (68,6–90,8)</b>	<b>0,424</b>
7-14 (n=201)					
3x	94,3 (75,2–88,1)	96,3 (87,3–99,6)	52,0 (43,7–60,3)	98,2 (90,1–100,0)	<0,001
2x	88,4 (82,4–93,1)	94,4 (84,6–93,5)	59,5 (51,1–67,4)	94,4 (84,6–98,4)	<0,001
<b>ROC</b>	<b>91,8 (86,2–95,7)</b>	<b>94,4 (84,6–98,4)</b>	<b>75,7 (68,0–82,4)</b>	<b>81,5 (68,6–90,8)</b>	<b>0,012</b>
>14d (n=201)					
3x	87,5 (80,5–92,7)	96,3 (87,3–99,6)	54,3 (45,3–63,2)	98,2 (90,1–100,0)	<0,001
2x	91,4 (85,1–95,6)	94,4 (84,6–98,8)	62,2 (53,2–70,7)	94,4 (84,6–98,4)	<0,001
<b>ROC</b>	<b>91,4 (85,1–95,6)</b>	<b>94,4 (84,6–98,8)</b>	<b>80,3 (72,3–86,8)</b>	<b>81,4 (68,6–90,8)</b>	<b>0,281</b>

\*Teste de McNemar

Já nas amostras com sintomas inferior a sete dias (<7 dias), observa-se uma sensibilidade de 100,0 % (IC de 80,5–100,0) e especificidade de 94,4 % (IC 84,6–98,4), descontadas as ligações de fundo, auferidas em um total de 71 amostra positivas no grupo de pacientes com sintomas inferior a sete dias (<7 dias). Esse dado nos permite comparar com outros kits de ELISA comercializados que não apresentam um bom desempenho diagnóstico nos primeiros dias após a infecção (Tabela 12).

## 6.0 DISCUSSÃO

Este estudo investigou a imunogenicidade da proteína N, submetendo-a a um protótipo *in-house* de ELISA indireto, sensibilizado com o antígeno em respostas a imunoglobulina G (IgG) específicas para proteína N de pacientes diagnosticados com a COVID-19 por RT-qPCR. Os intervalos de início dos sintomas foram estabelecidos entre,

1-7, 7 a 14 e 15-21 dias após os primeiros sintomas da infecção nos pacientes internados no HRSM. Um total de 294 amostras de soro de pacientes com COVID-19 e 54 controles negativos foram analisadas. Nosso estudo mostrou que as taxas de soropositividade de respostas de anticorpos N-IgG, nas amostras testadas foram de 97% entre as confirmadas por RT-qPCR, e de 0,03% nas amostras negativas.

A proteína do nucleocapsídeo N é a molécula estrutural mais abundante do vírus, é altamente imunogênica e conservada entre os coronavírus humanos. Devido a essas características, ela tem sido bastante empregada nos testes sorológicos (AHMED et al., 2020). Essa possui 419 aminoácidos (ZENG et al., 2020) e é imunogênica (OLIVEIRA; DE MAGALHÃES; HOMAN, 2020; TILOCCA et al., 2020).

Desta maneira, hipotetizamos que através do desenvolvimento de um ELISA indireto utilizando como ferramenta uma proteína N recombinante do SARS-CoV-2, conseguiremos analisar o perfil sorológico de populações que tiveram contato com o vírus, através da produção de anticorpos do tipo IgG. Permitindo supor que a criação deste teste imunoenzimático, poderá servir de ferramenta de epidemiovigilância e de estudos de imunogenicidade para validação de vacinas.

Em comparação a um estudo utilizando um ELISA para detecção de IgM e IgG, usando a proteína do nucleocapsídeo (N) do SARS-CoV Rp3 como antígeno (92% de similaridade com a N do SARS-CoV-2), foi utilizado para avaliar a dinâmica de anticorpos anti-SARS-CoV-2 (ZHOU et al., 2020). Além de boa sensibilidade, o teste não apresentou reatividade cruzada com outros coronavírus humanos (ZHANG et al., 2020). Outro estudo que usou ELISA indireto para detecção de anticorpos IgM, IgA e IgG anti-SARS-CoV-2, utilizando a proteína N recombinante como antígeno, mostrou que a detecção de anticorpos IgM e IgA ocorreu 5 dias (*Amplitude inter quartis* -IQR 3-6) após o início dos sintomas, enquanto que de IgG, 14 dias (IQR 10-18). Esse teste apresentou sensibilidade de 85,4%, 92,7% e 77,9% para detecção de IgM, IgA e IgG, respectivamente, sendo a taxa positiva de anticorpos IgM de 93,1% em casos prováveis, ou seja, pacientes com RT-qPCR negativo mas com manifestações típicas (GUO et al., 2020).

Outras pesquisas que apoiam o uso da proteína N do SARS-CoV-2 (SUN et al., 2020) em testes sorológicos, salientam a importância da molécula no diagnóstico da COVID-19. Isso corrobora com os dados de outros estudos (BAI et al., 2021), que dentre as quatro proteínas estruturais dos SARS-CoV-2, as proteínas spike (S) e as do nucleocapsídeo (N), são os principais imunógenos com capacidade para diagnosticar e consequentemente ampliar a disponibilidade de testes complementares para diagnóstico

da COVID-19. Outras pesquisas demonstraram que os testes sorológicos com a proteína S e N induziram uma forte resposta de anticorpos nos hospedeiros. Isso fomenta os principais alvos moleculares para imunização mais duradoura.

De acordo com (LI et al., 2020a), existe um nível sérico de proteína N em pacientes infectados com SARS-COV-2 e que após análise, evidenciaram uma correlação com o nível sérico de anticorpos e proteína N com base no valor do CUT-OFF determinado a partir da curva característica de operação do receptor (ROC).

Vários laboratórios têm tentado identificar os epítomos imunodominantes da proteína N para desenvolver anticorpos monoclonais específicos que possam ser usados em ELISA. Segundo alguns pesquisadores (AMRUN et al., 2020), quatro epítomos imunodominantes: S14P5, S20P2, S21P2 e N4P5, nas proteínas virais S e N, evidenciam o potencial imunogênico das moléculas. As respostas de IgG a todos os epítomos identificados exibiram um forte perfil de detecção, com N4P5 alcançando o mais alto nível de especificidade (100%) e sensibilidade (>96%) contra SARS-CoV-2, sugerindo a viabilidade de desenvolver esses epítomos em ELISA para detectar anti-SARS-CoV-2.

A proteína N é altamente imunogênica (TILOCCA et al., 2020), sendo alvo de anticorpos do tipo IgG, IgM e IgA (ZENG et al., 2020). Em SARS-CoV, cujo 85% do material genético é idêntico ao SARS-CoV-2, existe uma forte resposta de célula T induzida através da proteína N, o qual esta resposta pode durar muitos anos (TANG et al., 2011). A proteína N tem a sequência de aminoácidos altamente conservada (OLIVEIRA; DE MAGALHÃES; HOMAN, 2020), hipotetizando que ensaios de detecção molecular e imunológicas cujo alvo seja a N, podem servir para detectar o contato de pessoas com o vírus, mesmo sendo cepas mutantes do coronavírus. A pesquisa evidencia que a análise empregando a proteína N como alvo para o diagnóstico de fato pode ser confirmada também pela pesquisa de imunidade mais duradoura.

Nesse trabalho as análises auferidas mostraram que a proteína N, tem potencial imunogênico, e que o protótipo ELISA – *in-house*, pode vir a ser uma ferramenta utilizada no diagnóstico da COVID-19, tendo em vista os dados alcançados na análise estatística, onde apresentaram uma sensibilidade de 94,4%, especificidade de 92,1% e acurácia de 92,5% nas amostras com desconto das reações de branco (reações inespecíficas), utilizando-se da curva ROC e com intervalo de confiança de 95% (IC95%) nos paciente que apresentaram sintomas inferiores a sete dias da infecção em comparando com os testes sorológicos comerciais, que não apresentam boa sensibilidade e especificidade para os primeiros dias de sintomas ou inferior a sete dias conforme (Tabela 12). O protótipo

apresentou excelente desempenho nas amostras com sintomas descritos entre 1 e 7 dias da infecção em comparação aos kits comerciais da Abbott e Roche.

Já as amostras com intervalo >7 a 14 dias, alcançaram a sensibilidade de 100% e a especificidade de 94,4% utilizando-se da curva ROC. Esse dado corrobora com outros estudos onde apontam que o período de detecção melhora entre o 7-14 (sétimo e décimo quarto) dias após o início da infecção. Outro fator observado, indica que a análises sem o desconto das reações de branco (reações inespecíficas) diminuem a sensibilidade e especificidade em ambas as análises (NBD e NBF). Apontando para o fato das reações inespecíficas serem determinantes na acurácia da sensibilidade e especificidade nas análises do ELISA indireto.

**Tabela 12: Sensibilidade de três ensaios sorológicos comerciais de SARS-CoV-2 em pacientes sintomáticos com COVID-19 confirmado<sup>d</sup>**

Prazo de coleta de amostras (nº de amostras)	Sensibilidade (%) (IC 95%)			valores <i>P</i>
	Abbott	Roche	DiaSorin	
<7 dias após o início dos sintomas (20)	20 (8–42)	20 (8–42)	10 (3–30)	0,68, <sup>a</sup> 0,48, <sup>b</sup> 0,68 <sup>c</sup>
7–14 dias após o início dos sintomas (53)	62 (49–74)	64 (51–78)	42 (29–55)	<b>0,02</b> , <sup>a</sup> 1,0, <sup>b</sup> <b>0,01</b> <sup>c</sup>
>14 dias após o início dos sintomas (55)	96 (88–99)	93 (83–97)	89 (78–95)	0,13, <sup>a</sup> 0,48, <sup>b</sup> 0,62 <sup>c</sup>
Todas as amostras (128)	70 (62–78)	70 (61–77)	57 (48–65)	<b>0,002</b> , <sup>a</sup> 1,0, <sup>b</sup> <b>0,003</b> <sup>c</sup>

\*(Turbett et al., 2021)

a Os valores de *P* refletem a comparação entre os ensaios de Abbott e DiaSorin.

b Os valores de *P* refletem a comparação entre os ensaios de Abbott e Roche.

c Os valores *P* refletem a comparação entre os ensaios DiaSorin e Roche.

<sup>d</sup> IC, intervalo de confiança. Os valores de *P* que indicam diferenças significativas são mostrados em negrito.

**Tabela 13: Especificidade de três ensaios sorológicos SARS-CoV-2 comerciais em indivíduos de controle<sup>e</sup>**

Coorte de controle (nº de amostras)	Especificidade (%) (IC 95%)			valores <i>P</i>
	Abbott	Roche	DiaSorin	
Conjunto de soro de controle da era pré-COVID-19 (1.204)	99,3 (99–100)	99,8 (99–100)	98,0 (97–99)	<b>0,007</b> , <sup>a</sup> 0,11, <sup>b</sup> < <b>0,001</b> <sup>c</sup>
Conjunto de soro de controle sintomático (64)	98,4 ( <sup>91–100</sup> )	96,9 dias ( <sup>89–100</sup> )	93,8 dias ( <sup>85–98</sup> )	0,25, <sup>a</sup> 1,00, <sup>b</sup> 0,63 <sup>c</sup>
Todas as amostras (1.268)	99,3 (99–100)	99,7 (99–100)	97,8 (97–98)	<b>0,002</b> , <sup>a</sup> 0,23, <sup>b</sup> < <b>0,001</b> <sup>c</sup>

\*(Turbett et al., 2021)

a Os valores de *P* refletem a comparação entre os ensaios de Abbott e DiaSorin.

b Os valores de *P* refletem a comparação entre os ensaios de Abbott e Roche.

c Os valores *P* refletem a comparação entre os ensaios DiaSorin e Roche.

<sup>d</sup> Uma amostra do conjunto de soro de controle sintomático foi positiva usando todos os 3 ensaios. A amostra era de um homem saudável na casa dos 30 anos que apresentou em abril de 2020 febre, anosmia, falta de ar, mialgias e cardiomiopatia aguda. Múltiplos testes respiratórios de RNA do SARS-CoV-2 foram negativos. Para os propósitos deste estudo, o sujeito permaneceu classificado como negativo para COVID-19, mas a suspeita clínica permaneceu alta.

<sup>e</sup> IC, intervalo de confiança. Os valores de *P* que indicam diferenças significativas são mostrados em negrito.

De acordo com pesquisa comparativa (PATEL et al., 2020), testes sorológicos precisos são necessários para informar as decisões diagnósticas, terapêuticas e de saúde pública. Em comparação a três ensaios sorológicos comerciais para SARS-CoV-2, avaliando seu desempenho como testes independentes e como componentes de algoritmos de dois testes. Os testes de anticorpos do nucleocapsídeo (N) incluídos o estudo (Abbott IgG e Roche total anticorpo assays) foram significativamente mais sensíveis e específicos do que o teste de anticorpos da proteína spike (ensaio DiaSorin IgG) O protótipo ELISA *in-house* desenvolvido nesse projeto mostrou-se ainda mais sensível em comparação aos kits comerciais referidos na (Tabela 12) nos primeiros dias de sintomas após infecção.

O teste de ELISA é de grande importância no cotidiano da assistência à saúde por oferecer um auxílio no diagnóstico com alta especificidade e sensibilidade aliada a um baixo custo. Apesar de necessitar de um técnico especializado, a simplicidade do método aliado à facilidade de acesso faz do ELISA um grande aliado no momento diagnóstico. Nesse mesmo foco de apresentar soluções para o diagnóstico complementar, seria também necessário fazer a apresentação de novos modelos de expressão das proteínas heterólogas. Uma vez que a metodologia hoje utilizada, remete a processos moleculares de extrema complexidade para disponibilidade de moléculas alvo e o principal gargalo, seria os sistemas de expressão, é a obtenção de proteínas puras e estáveis.

De acordo com GWYN et al., 2022, fazendo uma comparação entre análises para os antígenos S e N do SARS-CoV-2 com kits comerciais. Os dois testes de anticorpos do nucleocapsídeo foram mais sensíveis do que o teste de anticorpos da proteína spike em geral (70% e 70% versus 57%;  $P \leq 0,003$ ), com diferenças observadas usando amostras coletadas 7 a 14 dias após o início dos sintomas. Todos os três ensaios foram comparativamente sensíveis ( $\geq 89\%$ ;  $P \geq 0,13$ ) usando amostras coletadas >14 dias após o início dos sintomas. A especificidade foi maior usando os testes de anticorpos do nucleocapsídeo (99,3% e 99,7%) do que usando o teste de anticorpos da proteína spike (97,8%;  $P \leq 0,002$ ). Quando quaisquer dos ensaios foram pareados em um algoritmo de dois testes, a especificidade foi de 99,9% ( $P < 0,0001$  a 0,25 em comparação com os ensaios individuais), e o valor preditivo positivo (PPV) melhorou substancialmente, com um efeito mínimo sobre o valor preditivo negativo (VPN). Em conclusão, dois testes de anticorpos de nucleocapsídeo superaram um teste de anticorpos de proteína spike. O

emparelhamento de dois testes sorológicos diferentes em um algoritmo de dois testes melhora o VPP, em comparação com os ensaios individuais sozinhos, mantendo o VPN.

As análises moleculares baseadas em RT-PCR são o padrão-ouro para obter um diagnóstico verificado de COVID-19. Ele funciona por transcrição reversa do RNA do SARS-CoV-2 em cDNA, seguida pela medição da carga viral pelo limiar do ciclo ( $C_t$ ). A alta carga viral na amostra é indicada por valores de  $C_t$  mais baixos (KRALIK; RICCHI, 2017). Regiões do genoma SARS-CoV-2 que codificam para o RdRp, spike, nucleocapsídeo e proteínas envelopadas são utilizadas para construir *primers* e sondas especializadas. O RT-qPCR possui falhas e críticas que podem gerar achados falso-positivos ou falso-negativos, comprometendo o manejo adequado da pandemia (KRALIK; RICCHI, 2017). Testes sorológicos com sensibilidade > 90% nos primeiros dias de sintomas seriam mais efetivos no diagnóstico e manejo assertivo.

Um dos grandes desafios na obtenção de uma proteína recombinante do SARS-CoV-2 para serem utilizadas nos testes sorológicos, está relacionado a sua estabilidade, qualidade, quantidade e conservação. Existem diferentes sistemas de expressão heteróloga, onde organismos modelos são utilizados para expressar proteínas de interesse. No entanto, no processo em conjunto com a engenharia genética, nem sempre é possível determinar a estabilidade, atividade e especificidade de determinada proteína. A grande vantagem da expressão proteica em células de mamífero é que a sinalização, o processamento e a secreção de proteínas eucarióticas são corretamente e eficientemente reconhecidas pelas células de mamíferos. No entanto, essa é uma abordagem com elevado custo atribuída aos meios de cultivos e apresenta como dificuldades a manutenção das células relacionadas a oxigenação, acúmulo de dióxido de carbono e estabilidade da linhagem celular.

Segundo alguns pesquisadores, a expressão de proteína em células de inseto mediadas por Baculovírus produz grande quantidade de proteína heteróloga preservando sua atividade funcional. A manutenção das células requer boa qualidade do meio e quantidade suficiente de oxigenação e a desvantagem está relacionada à presença de proteases ou enzimas proteolíticas que podem degradar a proteína de interesse (VERMA; BOLETI; GEORGE, 1998).

Uma das células mais importantes utilizadas é a *Escherichia coli*, que tem sido amplamente utilizada para a clonagem de DNA recombinante e, posteriormente, para a produção de proteínas heterólogas (BANEYX, 1999). O sistema de expressão bacteriana tem várias vantagens, incluindo multiplicação rápida, requisitos nutricionais simples e baratos, expressão de alto nível e processo de transformação rápido e fácil. No entanto,

esta fábrica celular tem algumas limitações, como agregação intracelular e dobramento incorreto de proteínas heterólogas, produção de lipopolissacarídeos, falta de modificação pós-traducional e degradação de proteínas devido a proteases (ROSANO; CECCARELLI, 2014). Outra parte dos sistemas de expressão são as células eucarióticas que incluem células de mamíferos e leveduras. As linhas de células de mamíferos mais comuns são as células de ovário de camundongo chinês (CHO). Atualmente, as células CHO são usadas para produzir compostos biofarmacêuticos, anticorpos monoclonais e proteínas de fusão. Além disso, as linhagens celulares de rim de camundongo, rim embrionário humano e NS0, SP2/0 (mieloma derivado de camundongo) também receberam permissões legais (PICANCO-CASTRO et al., 2014). Vantagens significativas deste sistema incluem dobramento adequado de proteínas, modificações pós-traducionais e glicosilação de proteínas recombinantes nos locais corretos, o que é importante para a estabilidade da proteína (KHAN, 2013). Além disso, os sistemas de expressão de mamíferos crescem lentamente e a necessidade de nutrientes relevantes é cara. Por outro lado, a potencial contaminação do meio de cultura com alguns vírus limitou seu uso na produção em larga escala (YIN et al., 2007). Neste trabalho utilizamos a expressão da proteína heteróloga do nucleocapsídeo N do SARS-CoV-2 baseada no sistema de expressão de baculovírus. A facilidade de aumento de escala adaptando o crescimento celular à suspensão de alta densidade e condições de cultura menos exigentes tornam as células de insetos mais vantajosas do que as células de mamíferos para a expressão de certas proteínas de vírus animais ou infectantes de animais. Portanto, os sistemas de expressão de baculovírus oferecem mais vantagens do que outros sistemas para combinar a expressão robusta de proteínas com modificações pós-traducionais que são mais comparáveis aos mamíferos (TSAI et al., 2020). Os baculovírus têm sido utilizados para a fabricação de vacinas virais baseadas em subunidades ou partículas semelhantes a vírus (imitando virions) contra vírus patogênicos humanos e veterinários. Durante a pandemia de COVID-19, os baculovírus têm sido usados para expressão de versões da proteína SARS-CoV-2 spike (S) como subunidades para o desenvolvimento de suprimentos e partículas semelhantes a vírus e DNA baseado em vetor baculoviral como candidatos a vacina (CHOI et al., 2021; FUJITA et al., 2020, 2020, p. 2; LI et al., 2020b). Nenhum desses estudos incluiu o gene N, e os protocolos públicos para expressão heteróloga e purificação da proteína SARS-CoV-2 N parecem estar restritos a *E. coli* (DJUKIC et al., 2021; GARG et al., 2020; LI et al., 2020a)

Juntos, todos esses dados apoiam a noção de que a proteína N pode ser usada como uma ferramenta de diagnóstico eficiente para a detecção da infecção por SARS-CoV-2

nos primeiros dias de sintomas após a infecção e os métodos específicos de detecção da proteína N, devem ser aprimorados utilizando-se de mais amostras de pacientes, assim como de outros testes de ELISA protótipo que possam utilizar os principais epítomos da proteína N.

Esse trabalho corrobora com outros autores na direção de propostas assertivas para o bom diagnóstico laboratorial da COVID-19, apresentando o antígeno N do SARS-CoV-2 obtido por expressão de proteína em células de inseto mediadas por Baculovírus e que produz grande quantidade de proteína heteróloga com preservação da sua atividade funcional e que pode ser usada para o desenvolvimento de teste do tipo ELISA indireto, tendo em vista o potencial imunogênico para detecção de anticorpos IgG anti proteína N do SARS-CoV-2 em grupos que apresentam sintomas iniciais. No entanto, ainda é necessário ampliar o número de amostras do Biobanco para os diferentes grupos sintomáticos a serem testados em análises futuras.

**Tabela 14. Análise descritiva da idade, segundo dias de sintomas.**

Dias de sintomas*	Média	Desvio padrão	Mediana	Percentil25- Percentil75
<b>Total (n=294)</b>	<b>58,2</b>	<b>15,9</b>	<b>62</b>	<b>49,0-68,0</b>
<b>&lt; 7 (n=17)</b>	<b>47,5</b>	<b>19,3</b>	<b>47</b>	<b>35,5-64,5</b>
<b>7-14 (n=147)</b>	<b>58,8</b>	<b>15,9</b>	<b>63</b>	<b>49,0-69,0</b>
<b>&gt; 14 (n=128)</b>	<b>59,0</b>	<b>15,0</b>	<b>62</b>	<b>49,0-69,9</b>

\*Dias de sintomas apenas para os pacientes positivos.

O teste protótipo apresentou excelente desempenho para o diagnóstico nos primeiros sete dias da infecção. A média de idade dos pacientes contidos no grupo < 7 dias e de 47,5 anos. No entanto, todos os pacientes submetidos nas análises, são adultos, e ainda não vacinados, tendo em vista que estes pacientes não foram alcançados pelos primeiros lotes da vacina contra a COVID 19 até a formação do Biobanco, portanto, todos não vacinados. O protótipo mostrou-se eficiente no diagnóstico de pacientes adultos com menos de sete dias do início dos sintomas e com média de idade entre 35,5 a 69,9 anos.

## 7. PERSPECTIVAS

- Expressão e purificação otimizada utilizando o sistema baculovírus para outros epítomos do SARS-CoV-2;
- Teste de ELISA indireto com antígeno protéico do nucleocapsídeo N do SARS-CoV-2 para fabricação de kit diagnóstico;
- Aumento do número de amostras a serem testadas pelo ELISA protótipo *in-house*, englobando a ampliação do biobanco entre pacientes do Distrito Federal e Goiânia nos período pré e pós pandemia.
- Incluir pacientes vacinados com diferentes doses.
- Incluir outras Imunoglobulinas nas testagens do protótipo
- Validação e patente nacional do kit de diagnóstico desenvolvido.
- Testar reações cruzadas com outros vírus

## 8. REFERÊNCIAS

- AHMED, W. et al. First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. **The Science of the Total Environment**, v. 728, p. 138764, 1 ago. 2020.
- AI, T. et al. Correlation of Chest CT and RT-PCR Testing for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in China: A Report of 1014 Cases. **Radiology**, v. 296, n. 2, p. E32–E40, ago. 2020.
- AMRUN, S. N. et al. Linear B-cell epitopes in the spike and nucleocapsid proteins as markers of SARS-CoV-2 exposure and disease severity. **EBioMedicine**, v. 58, p. 102911, ago. 2020.
- ARONS, M. M. et al. Presymptomatic SARS-CoV-2 Infections and Transmission in a Skilled Nursing Facility. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 22, p. 2081–2090, 28 maio 2020.
- AYDIN, S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. **Peptides**, v. 72, p. 4–15, out. 2015.
- BAI, Z. et al. The SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Its Role in Viral Structure, Biological Functions, and a Potential Target for Drug or Vaccine Mitigation. **Viruses**, v. 13, n. 6, p. 1115, 10 jun. 2021.
- BANEYX, F. Recombinant protein expression in Escherichia coli. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 411–421, out. 1999.
- CASTRO, M. E. B. DE et al. Biologia molecular de baculovírus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, p. 1733–1761, out. 1999.
- CHAN, J. F.-W. et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 221–236, 2020.
- CHOI, H. et al. The Safe Baculovirus-Based PrM/E DNA Vaccine Protected Fetuses against Zika Virus in A129 Mice. **Vaccines**, v. 9, n. 5, p. 438, 30 abr. 2021.
- CORMAN, V. M. et al. Hosts and Sources of Endemic Human Coronaviruses. **Advances in Virus Research**, v. 100, p. 163–188, 2018.
- CORTÉS MARTÍNEZ, J. et al. SARS-Cov-2 incubation period according to vaccination status during the fifth COVID-19 wave in a tertiary-care center in Spain: a cohort study. **BMC Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. 828, 9 nov. 2022.
- DALY, R.; HEARN, M. T. W. Expression of heterologous proteins in Pichia pastoris: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of molecular recognition: JMR**, v. 18, n. 2, p. 119–138, 2005.
- DE CAMARGO, B. R. et al. An easy pipeline for one-step purification of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein from insect cell suspension culture. **Journal of Virological Methods**, v. 299, p. 114341, jan. 2022.
- DING, S.; LIANG, T. J. Is SARS-CoV-2 Also an Enteric Pathogen With Potential Fecal-Oral Transmission? A COVID-19 Virological and Clinical Review. **Gastroenterology**, v. 159, n. 1, p. 53–61, jul. 2020.
- DJUKIC, T. et al. Expression, purification and immunological characterization of recombinant nucleocapsid protein fragment from SARS-CoV-2. **Virology**, v. 557, p. 15–22, maio 2021.

DONG, S. et al. A guideline for homology modeling of the proteins from newly discovered betacoronavirus, 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 9, p. 1542–1548, set. 2020.

FUJITA, R. et al. Efficient production of recombinant SARS-CoV-2 spike protein using the baculovirus-silkworm system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 529, n. 2, p. 257–262, 20 ago. 2020.

GANDHI, M.; YOKOE, D. S.; HAVLIR, D. V. Asymptomatic Transmission, the Achilles' Heel of Current Strategies to Control Covid-19. **The New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 22, p. 2158–2160, 28 maio 2020.

GARG, S. et al. Molecular docking analysis of selected phytochemicals against SARS-CoV-2 Mpro receptor. **Vegetos (Bareilly, India)**, v. 33, n. 4, p. 766–781, 2020.

GONG, F. et al. Evaluation and Comparison of Serological Methods for COVID-19 Diagnosis. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, 2021.

GRASSELLI, G.; PESENTI, A.; CECCONI, M. Critical Care Utilization for the COVID-19 Outbreak in Lombardy, Italy: Early Experience and Forecast During an Emergency Response. **JAMA**, v. 323, n. 16, p. 1545–1546, 28 abr. 2020.

GUO, Y.-R. et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status. **Military Medical Research**, v. 7, n. 1, p. 11, 13 mar. 2020.

GWYN, S. et al. Performance of SARS-CoV-2 Antigens in a Multiplex Bead Assay for Integrated Serological Surveillance of Neglected Tropical and Other Diseases. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 2, p. 260–267, ago. 2022.

Histórico da pandemia de COVID-19 - OPAS/OMS | **Organização Pan-Americana da Saúde**. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/covid19/historico-da-pandemia-covid-19>>. Acesso em: 22 dez. 2022.

HITCHMAN, R. B. et al. Baculovirus as vectors for human cells and applications in organ transplantation. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 107 Suppl, p. S49-58, jul. 2011.

HU, Y. Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 26, n. 4, p. 405–416, abr. 2005.

INCEOGLU, A. B. et al. Recombinant baculoviruses for insect control. **Pest Management Science**, v. 57, n. 10, p. 981–987, out. 2001.

KHAN, K. H. Gene expression in Mammalian cells and its applications. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 3, n. 2, p. 257–263, 2013.

KIM, I. et al. KCDC Risk Assessments on the Initial Phase of the COVID-19 Outbreak in Korea. **Osong Public Health and Research Perspectives**, v. 11, n. 2, p. 67–73, abr. 2020.

KOST, T. A.; CONDREAY, J. P. JARVIS, D. L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 5, p. 567–575, maio de 2005.

KRALIK, P.; RICCHI, M. A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.

KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2–3, p. 95–125, 2006.

- KWON, S.-Y. et al. Post-donation COVID-19 identification in blood donors. **Vox Sanguinis**, v. 115, n. 8, p. 601–602, nov. 2020.
- LAUER, S. A. et al. The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. **Annals of Internal Medicine**, v. 172, n. 9, p. 577–582, 5 maio 2020.
- LI, T. et al. Serum SARS-COV-2 Nucleocapsid Protein : A Sensitivity and Specificity Early Diagnostic Marker for SARS-COV-2 **Infection**. 2020a.
- LI, T. et al. SARS-CoV-2 spike produced in insect cells elicits high neutralization titres in non-human primates. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 2076–2090, 1 jan. 2020b.
- LOEFFELHOLZ, M. J.; TANG, Y.-W. Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections - the state of the art. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 747–756, dez. 2020.
- MAHDI, S. A. et al. Population Immunity and Covid-19 Severity with Omicron Variant in South Africa. **The New England Journal of Medicine**, v. 386, n. 14, p. 1314–1326, 7 abr. 2022.
- MYERS, G. L.; VAN OSS, C. J. Affinity Chromatography. Em: DELVES, P. J. (Ed.). **Encyclopedia of Immunology (Second Edition)**. Oxford: Elsevier, 1998. p. 47–49.
- MINIC, R. et al. **Optimization, Validation and Standardization of ELISA**. [s.l.] IntechOpen, 2020.
- MIZRAHI, B. et al. Long covid outcomes at one year after mild SARS-CoV-2 infection: nationwide cohort study. **BMJ**, v. 380, p. e072529, 11 jan. 2023.
- MOBIN, M. A. et al. An analysis of COVID-19 and WHO global research roadmap: knowledge mapping and future research agenda. **Eurasian Economic Review**, 9 nov. 2021.
- MOURA, E. C. et al. Covid-19: temporal evolution and immunization in the three epidemiological waves, Brazil, 2020–2022. **Revista de Saúde Pública**, v. 56, p. 105, 9 dez. 2022.
- OLIVEIRA, S. C.; DE MAGALHÃES, M. T. Q.; HOMAN, E. J. Immunoinformatics Analysis of SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Identification of COVID-19 Vaccine Targets. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 587615, 2020.
- O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. Baculovirus expression vectors: a laboratory manual. **Baculovirus expression vectors: a laboratory manual**, 1992.
- PANG, J. et al. Potential Rapid Diagnostics, Vaccine and Therapeutics for 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV): A Systematic Review. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 3, p. 623, 26 fev. 2020.
- PATEL, M. M. et al. Change in Antibodies to SARS-CoV-2 Over 60 Days Among Health Care Personnel in Nashville, Tennessee. **JAMA**, v. 324, n. 17, p. 1781–1782, 3 nov. 2020.
- PICANCO, CASTRO, V. et al. Patents in therapeutic recombinant protein production using mammalian cells. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 165–171, 2014.
- REDDY, S. G. K. et al. COVID-2019–2020–2021: Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences**, v. 13, n. Suppl 2, p. S921–S926, nov. 2021.
- ROHRMANN, G. F. **Baculovirus Molecular Biology**. 4th. ed. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), 2019.
- ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 172, 2014.

SARRA, S. R.; MÜLFARTH, R. C. K. O que a epidemia do novo coronavírus revelou sobre a cidade de São Paulo / What the new coronavirus epidemics has shown about the city of São Paulo. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 9, p. 89828–89856, 15 set. 2021.

SHAH, K.; MAGHSOUDLOU, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. **British Journal of Hospital Medicine**, v. 77, n. 7, p. C98–C101, 2 Jul. 2016.

SHARMA, A. et al. COVID-19 Diagnosis: Current and Future Techniques. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 193, p. 1835–1844, 15 dez. 2021.

SHERIDAN, A. et al. Social distancing laws cause only small losses of economic activity during the COVID-19 pandemic in Scandinavia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 34, p. 20468–20473, 25 ago. 2020.

SHINDE, V. et al. Efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 Vaccine against the B.1.351 Variant. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 20, p. 1899–1909, 20 maio de 2021.

SMITH, G. E.; SUMMERS, M. D.; FRASER, M. J. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. **Molecular and Cellular Biology**, v. 3, n. 12, p. 2156–2165, dez. 1983.

SUN, B. et al. Kinetics of SARS-CoV-2 specific IgM and IgG responses in COVID-19 patients. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 940–948, dez. 2020.

TANG, F. et al. Lack of peripheral memory B cell responses in recovered patients with severe acute respiratory syndrome: a six-year follow-up study. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 186, n. 12, p. 7264–7268, 15 jun. 2011.

TILOCCA, B. et al. Molecular basis of COVID-19 relationships in different species: a one health perspective. **Microbes and Infection**, v. 22, n. 4–5, p. 218–220, 2020.

TSAI, C.-H. et al. Baculovirus as Versatile Vectors for Protein Display and Biotechnological Applications. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 34, p. 231–256, 2020.

VAN DOREMALEN, N. et al. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. **The New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 16, p. 1564–1567, 16 abr. 2020.

VASHIST, S. K. In Vitro Diagnostic Assays for COVID-19: Recent Advances and Emerging Trends. **Diagnostics (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 4, p. 202, 5 abr. 2020.

VERMA, R.; BOLETI, E.; GEORGE, A. J. Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. **Journal of Immunological Methods**, v. 216, n. 1–2, p. 165–181, 1 jul. 1998.

V'KOVSKI, P. et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 155–170, mar. 2021.

WANG, Y. et al. Value of anal swabs for SARS-COV-2 detection: a literature review. **International Journal of Medical Sciences**, v. 18, n. 11, p. 2389–2393, 16 abr. 2021.

WÖLFEL, R. et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. **Nature**, v. 581, n. 7809, p. 465–469, maio 2020.

WU, Z.; MCGOOGAN, J. M. 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**, v. 323, n. 13, p. 1239–1242, 7 abr. 2020.

XIAO, S.; WU, Y.; LIU, H. Evolving status of the 2019 novel coronavirus infection: Proposal of conventional serologic assays for disease diagnosis and infection monitoring. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 5, p. 464–467, maio 2020.

YILDIRIM, F. et al. Role of serological rapid antibody test in the management of possible COVID-19 cases. **World Journal of Experimental Medicine**, v. 11, n. 4, p. 44–54, 20 set. 2021.

YIN, J. et al. Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. **Journal of Biotechnology**, v. 127, n. 3, p. 335–347, 10 Jan. 2007.

ZENG, W. et al. Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 527, n. 3, p. 618–623, 30 jun. 2020.

ZHANG, R. et al. Identifying airborne transmission as the dominant route for the spread of COVID-19. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 26, p. 14857–14863, 30 jun. 2020.

ZHENG, J. et al. Highly efficient and economical baculovirus expression system for preparing human papillomavirus type 16 virus-like particle. **Acta Biochimica Et Biophysica Sinica**, v. 36, n. 8, p. 548–552, ago. 2004.

ZHOU, F. et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. **Lancet (London, England)**, v. 395, n. 10229, p. 1054–1062, 28 mar. 2020.

## 9.0 ANEXOS

### Anexo 1: Documentação para submissão de projetos envolvendo seres humanos para CEP/IGESDF



Diretoria de Inovação, Ensino e Pesquisa  
Gerência de Pesquisa

#### Check List

Para projetos em que o IGESDF será PROPONENTE ou PARTICIPANTE	Para projetos em que o IGESDF será COPARTICIPANTE
Fornuário de Cadastro*	Fornuário de Cadastro*
Projeto de Pesquisa*	Projeto de Pesquisa*
Termo de Anuência*	Termo de Coparticipação*
Termo de Compromisso*	Termo de Compromisso*
Folha de Rosto*	Folha de Rosto*
TCLE ou Dispensa de TCLE*	TCLE ou Dispensa de TCLE*
TCLE para Responsáveis	TCLE para Responsáveis
Termo de Assentimento	Termo de Assentimento
Cronograma*	Cronograma*
Orçamento*	Orçamento*
Curriculo Lattes*	Curriculo Lattes*

\*Documentos obrigatórios.

#### Dicas Importantes

<b>Todos os documentos do projeto deverão ser encaminhados conforme o modelo disposto no site <a href="http://WWW.IGESDF.ORG.BR">WWW.IGESDF.ORG.BR</a></b>	
<b>Todos os projetos são encaminhados pelo SEI.</b> Caso o pesquisador não tenha acesso ao SEI, entrar em contato e encaminhar pela secretaria da unidade onde será realizado o projeto à <a href="mailto:IGESDF/CEP/ISA/CE/CEM/CE/IN/IES">IGESDF/CEP/ISA/CE/CEM/CE/IN/IES</a> .	
Fornuário de Cadastro	Utilizar o modelo de fornuaário 23218002 para projetos de pesquisa e o fornuaário 23218917 para relatórios de caso.
Projeto de Pesquisa	Deverá ser encaminhado para avaliação conforme modelo disposto no site do IGESDF.
Termo de Anuência	Encaminhar com a <b>assinatura e carimbo</b> do pesquisador responsável e do responsável pela unidade onde será realizado o projeto. No caso do projeto ser realizado em várias unidades, deverá ser assinado por todos os responsáveis. (Um termo para cada setor). Após parecer do Conselho Científico do IGESDF, será assinada pelo Diretor de Ensino, Pesquisa e Inovação e devolvida (digitalizada) por email ao pesquisador responsável.
Termo de Coparticipação	Encaminhar com a <b>assinatura e carimbo</b> do pesquisador responsável e do responsável pela unidade onde será realizado o projeto. No caso do projeto ser realizado em várias unidades, deverá ser assinado por todos os responsáveis. (Um termo para cada setor).
Termo de Compromisso	Deverá ser assinado pelo pesquisador principal e pesquisador associado, caso o pesquisador principal não tenha vínculo empregatício com o IGESDF.
Folha de Rosto	- A folha de rosto é gerada no Plataforma Brasil ( <a href="http://brasil.conep.gov.br">http://brasil.conep.gov.br</a> ) após o cadastro provisionado do projeto de pesquisa. <ul style="list-style-type: none"> <li>Se o IGESDF for proponente ou participante – encaminhar com a <b>assinatura e carimbo</b> do pesquisador responsável. Após o parecer do Conselho Científico, será assinada pelo Diretor de Ensino e Pesquisa e devolvida (digitalizada) por email ao pesquisador responsável.</li> <li>Se o IGESDF for coparticipante – encaminhar com a <b>assinatura e carimbo</b> do pesquisador responsável e do responsável pela instituição proponente.</li> </ul>
TCLE	Deverá ser encaminhado em linguagem clara e acessível.
Dispensa de TCLE	Deverá ser encaminhado devidamente justificado a necessidade da dispensa.
TCLE para Responsáveis	Deverá ser encaminhado, caso a pesquisa seja realizada com menores de idade, em linguagem clara e acessível ao usuário.
Termo de Assentimento	Deverá ser encaminhado, caso a pesquisa seja realizada com menores de idade com capacidade de leitura, em linguagem clara e acessível por letra ótica.
Cronograma	O Cronograma deverá ser incluído <b>separadamente</b> com todas as etapas discriminadas e a duração total de cada uma. Necessariamente deverá estar previsto <b>30 dias</b> para análise e aprovação pelo CEP/IGESDF e compromisso explícito do pesquisador do qual a pesquisa somente será iniciada a partir da aprovação pelo Sistema CEP-CONEP.
Orçamento	O orçamento deverá ser incluído <b>separadamente</b> . Detalhar os recursos, fontes e destinação; forma e valor da remuneração do pesquisador; apresentar em moeda nacional ou, quando em moeda estrangeira, com o valor do câmbio oficial em Real, obtido no período da proposição da pesquisa; apresentar previsão de ressarcimento de despesas do participante e seus acompanhantes, quando necessário, tais como transporte e alimentação e compensação material nos casos resolvidos no Item II.10 da Resolução do CNS 466/12.
Curriculo Lattes	Deverá incluir o CURRICULO LATTES de <b>todos</b> os pesquisadores e assistentes envolvidos na pesquisa.

## ANEXO 2: Termo de Acordo Institucional.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
 Centro de Desenvolvimento Tecnológico - CD Tec  
 Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - PPGB  
 Caixa Postal 354, 96010-900, Pelotas – RS, Brasil  
 Fone: +55 53 3275 7350  
 email: biotecnologiaufpel@gmail.com

### TERMO DE ACORDO INSTITUCIONAL

**Projeto de Pesquisa:** Desenvolvimento de testes sorológicos nacionais (*point-of-care* e ELISA) para COVID-19

**Pesquisadores Responsáveis:** Dr. Fabricio Rochedo Conceição e PhD. Alan John Alexander McBride - Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

**Pesquisador da instituição participante:** Gildemar José Bezerra Crispim

O presente instrumento tem como objetivo definir o acordo entre as instituições Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e Universidade Federal de Goiás (UFG) sobre a operacionalização, o compartilhamento e a utilização do material biológico humano armazenado, sobre a possibilidade de dissolução futura da parceria, e conseqüente partilha e destinação dos dados e materiais armazenados.

Toda a pesquisa obedecerá às diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos estabelecidas na Resolução Nº 466, de 12 de dezembro de 2012 e às diretrizes para análise ética de projetos de pesquisas que envolvam armazenamento de material biológico humano ou uso de material armazenado em pesquisas anteriores estabelecidas na Resolução Nº 441, de 12 de maio de 2011. As amostras biológicas de soro, swab naso/orofaríngeo e saliva que serão coletadas no presente estudo no Hospital Escola (HE) da UFPel e no Hospital Universitário São Francisco de Paula (HUSFP) da Universidade Católica de Pelotas (UCPel) serão armazenadas na UFPel. Amostras de soro também serão coletadas e armazenadas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). O armazenamento e a utilização de todas as amostras obedecerão aos requisitos estabelecidos na Resolução Nº 441 de 12 de maio de 2011 do Conselho Nacional de Saúde, para o armazenamento de material biológico humano.

A Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado compartilhará com a UFPel aliquotas de soros de indivíduos com COVID-19, coletadas no Projeto "Estudo de fase IIb para avaliar eficácia e segurança do difosfato de cloroquina no tratamento de pacientes com comorbidades, sem síndrome respiratória grave, no âmbito do novo coronavírus (SARS-CoV2): um ensaio clínico, duplo-cego, randomizado, controlado com placebo" (aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, sob parecer nº 3.961.681. A Profa. Fabiola Souza Fiaccadori do Laboratório de Virologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, compartilhará com a UFPel e com o Laboratório de Desenvolvimento e Produção de Testes Rápidos (LDPTR) do Instituto

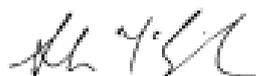
de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG), aliquotas de soros de indivíduos com e sem COVID-19, coletadas no Projeto "Investigação do perfil virológico, imunológico e clínico no contexto da pandemia COVID-19 em Goiânia-Goiás" (aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da UFG, sob parecer nº 4.018.693 de 11/05/2020), cuja cópia do TCLE empregado na coleta do material está anexa) para o desenvolvimento e padronização do ELISA e teste *Point-of-Care* para detecção de IgM e IgG anti-SARS-CoV-2. Será solicitada, ao CONEP, dispensa de novo TCLE devido à urgência do desenvolvimento dos testes sorológicos para COVID-19, visto que teremos muitas dificuldades em contatar cada sujeito dessa pesquisa para consentir sobre a utilização de seu material biológico na presente pesquisa, que o benefício dessa pesquisa é claro e que não há riscos para esses sujeitos. Gildemar José Bezerra Crispim do Instituto de Gestão Estratégica de Saúde do Distrito Federal, compartilhará com a UFPel, com o Instituto de Biologia/Virologia da Universidade de Brasília e com o Laboratório de Desenvolvimento e Produção de Testes Rápidos (LDPTR) do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG), aliquotas de soros de indivíduos com e sem COVID-19, coletadas conforme TCLE específico para o Hospital Regional de Santa Maria do Distrito Federal.

No caso de dissolução futura da parceria, os dados pertencerão a todas as instituições participantes e os materiais armazenados ficarão sob a guarda das instituições que os coletaram e armazenaram.




---

Fabricio Rochedo Conceição  
Pesquisador responsável/UFPel




---

Alan John Alexander McBride  
Pesquisador responsável/UFPel

Pelotas, 18 de outubro de 2020.




---

Gildemar José Bezerra Crispim  
Pesquisador parceiro da Instituição participante – IGESDF




---

Samira Bühner  
Pesquisadora da Instituição participante – LDPTR/IPTSP/UFG

Goiânia, 18 de outubro de 2020.

## Anexo 3: Termo de Consentimento Livre e Esclarecidos



### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa "Desenvolvimento de testes sorológicos nacionais (point-of-care e ELISA) para COVID-19" sob responsabilidade dos pesquisadores Dr. Fabricio Rochedo Conceição e Dr. Alan John Alexander McBride da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Gildemar José Bezerra Crispim do Instituto de Gestão Estratégica de Saúde do Distrito Federal (IGESDF) e Dr. Bergmann Ribeiro Moraes da Universidade de Brasília (UNB) e Dra. Samira Bühner da Universidade Federal de Goiás (UFG). Esse estudo tem como objetivo desenvolver testes sorológicos nacionais, mais adequados e acessíveis para o diagnóstico da COVID-19 no Brasil. Alguns exames são normalmente realizados nos casos de suspeita de COVID-19, que podem dizer se a pessoa está ou esteve com esta doença, contribuindo para o seu entendimento e controle. Entretanto, os testes disponíveis atualmente são importados, portanto muito caros. Para desenvolver testes sorológicos nacionais precisamos montar um banco de soros e precisamos obter informações relevantes sobre as pessoas com COVID-19 ou com suspeita. Sendo assim, você está sendo convidado a participar da pesquisa, autorizando a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização do seu material biológico humano (amostras de sangue)

A sua participação ocorrerá da seguinte forma: através da coleta de uma amostra de sangue. Isso levará poucos minutos. Todas as amostras de soro serão inativadas a 56° C por 30 min e armazenadas em ultrafreezer no IGESDF. É possível que você sinta um desconforto com a "picada" da agulha no momento da coleta de sangue, sendo, assim, o risco na sua participação neste estudo mínimo, no entanto a coleta será realizada com todos os cuidados necessários para evitar esse leve desconforto e se você sofrer algum dano decorrente da pesquisa, nós lhe daremos toda assistência integral e gratuita e que for necessária para garantir seu bem-estar. A sua participação no estudo contribuirá para o desenvolvimento de um teste nacional de diagnóstico da COVID-19, portanto mais barato e adequado para uso no Brasil.

Durante sua participação nesse estudo você terá direito ao acesso gratuito às informações associadas ao seu material biológico humano armazenado e utilizado (resultados obtidos), às orientações quanto às suas implicações e às informações sobre as finalidades do armazenamento, incluindo seu responsável, os riscos e benefícios potenciais, as garantias de qualidade da conservação e integridade de seu material biológico, bem como as medidas para garantir a privacidade e a confidencialidade.

Sua participação é voluntária, ou seja, você tem direito a se recusar a participar ou se retirar da pesquisa em qualquer momento, sem nenhum prejuízo.

Página 1 de 3

Instituto de Gestão Estratégica de Saúde do Distrito Federal  
SMS O. 101, Área Especial - 70.335-000 - Brasília - DF  
Fone: (61) 3350-8837 e-mail: [dir.geres@igesdf.org.br](mailto:dir.geres@igesdf.org.br)



Não haverá pagamento ou recompensa financeira pela sua participação nesse estudo. Você não terá nenhuma despesa adicional com sua participação nesse estudo. Haverá garantia de indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Garantimos que seu nome e dados coletados em formulário eletrônico não serão divulgados, sendo mantidos em sigilo pela equipe de pesquisadores. Os resultados desse estudo poderão ser divulgados nessa instituição, em revistas e/ou encontros científicos, sempre garantindo a sua privacidade.

As amostras biológicas de sangue serão encaminhadas para o IGESDF e armazenadas em freezer/ultrafreezer para uso neste projeto para o desenvolvimento de novos testes de diagnóstico e para uso futuro em outros projetos de pesquisa. Ou seja, os dados obtidos e as amostras biológicas armazenadas neste estudo poderão ser utilizados em pesquisas futuras, desde que previamente aprovadas pelo Sistema CEP/CONEP.

Você tem direito ao acesso gratuito às informações associadas ao seu material biológico humano armazenado e utilizado (resultados obtidos) e às orientações quanto às suas implicações; ao anonimato em quaisquer formas de divulgação das informações ou resultados associados ao material biológico humano utilizado; a retirada do consentimento para a participação no estudo e para a guarda e utilização do material biológico, a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos; a designação das pessoas que poderão ter acesso à sua informação genética, em caso de óbito ou condição incapacitante, e ao acesso às informações sobre as finalidades do armazenamento, incluindo seu responsável, os riscos e benefícios potenciais, as garantias de qualidade da conservação e integridade de seu material biológico, bem como as medidas para garantir a privacidade e a confidencialidade.

Caso tenha dúvidas ou considerações relacionadas a esta pesquisa, entre em contato com os pesquisadores responsáveis: Gildemar José Bezerra Crispim (61) 98188 0877, [gildemarcrispin@gmail.com](mailto:gildemarcrispin@gmail.com) e/ou [QNA 25, casa 14, Taguatinga Norte, CEP 72110-250]; ou Bergmann Moraes Ribeiro (61) 99614 6650, [bergmann@unb.br](mailto:bergmann@unb.br) e/ou [Laboratório de Biologia Celular/Virologia, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Bloco IB, CEP-70910-900]; ou Samira Bühner por meio do telefone (62) 06138 8883, [samira@buhner.net](mailto:samira@buhner.net) e/ou [Alameda das Acácias, QD37,LT1, Aldeia do Vale, Goiânia, CEP:-74680-120]; ou Fabricio Rochedo Conceição e Alan John Alexander McBride por meio do telefone (53) 3275 7350, e-mail [fabricio.rochedo@ufpel.edu.br](mailto:fabricio.rochedo@ufpel.edu.br) e [alanmcb@gmail.com](mailto:alanmcb@gmail.com) e/ou endereço Núcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico da UFPEL, Pelotas – RS.

Página 2 de 3

Instituto de Gestão Estratégica de Saúde do Distrito Federal  
SMS O. 101, Área Especial - 70.335-000 - Brasília - DF  
Fone: (61) 3350-8837 e-mail: [dir.geres@igesdf.org.br](mailto:dir.geres@igesdf.org.br)