



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

Flávia Fonseca Bagno

**GERAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES E APLICAÇÃO EM TESTES
SOROLÓGICOS PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-
CHIKUNGUNYA, ZIKA E SARS-CoV-2.**

Belo Horizonte
Junho de 2021.

Flávia Fonseca Bagno

**GERAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES E APLICAÇÃO EM TESTES
SOROLÓGICOS PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-
CHIKUNGUNYA, ZIKA E SARS-CoV-2.**

Tesede doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito necessário à formação como Doutor em Microbiologia.

Orientação: Prof. Flávio Guimarães da Fonseca

Coorientação: Prof. Lara Carvalho Godoi

Belo Horizonte

Junho de 2021.

- 043 Bagno, Flávia Fonseca.
Geração de proteínas recombinantes e aplicação em testes sorológicos para detecção de anticorpos antiChikungunya, Zika e SARS-CoV-2 [manuscrito] / Flávia Fonseca Bagno. – 2021.
261 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientação: Prof. Flávio Guimarães da Fonseca. Coorientação: Prof. Lara Carvalho Godoi.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.
1. Microbiologia. 2. Infecções por Arbovirus. 3. Zika virus. 4. Vírus Chikungunya. 5. Proteínas Recombinantes. 6. Ensaio de Imunoadsorção Enzimática. 7. Diagnóstico. 8. Vírus da SARS. I. Fonseca, Flávio Guimarães da. II. Godoi, Lara Carvalho. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE TESE DE **FLÁVIA FONSECA BAGNO**
Nº REGISTRO: **2018709334**

Às 13:00 horas do dia 10 de maio de 2021, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli, Luiz Felipe Leomil Coelho, Patrícia Donado Vaz de Melo, Leonides Rezende Júnior, Danielle Soares de Oliveira Daian e Silva, o Prof. Flávio Guimarães da Fonseca – Orientador e a Prof. Lara Carvalho Gogoi - Coorientadora, para julgar o trabalho final "Geração de proteínas recombinantes e aplicação em testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-Chikungunya, Zika e Sars-Cov-2.", da aluna **Flávia Fonseca Bagno**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 10 de maio de 2021. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Dra. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli

Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho (UNIFAL)

Dra. Patrícia Donado Vaz de Melo

Dr. Leonides Rezende Júnior

Dra. Danielle Soares de Oliveira Daian e Silva

DANIELLE SOARES DE O
DAIANE
SILVA-05880019633

Assinado de forma digital por
DANIELLE SOARES DE O DAIANE
SILVA-05880019633
Data: 2021.05.17 16:42:18 -0200

(Orientador) Flávio Guimarães da Fonseca

(Coorientadora) Lara Carvalho Godoi

Profa. Danielle da Glória de Souza
Coordenadora do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia

PRÓLOGO

Definitivamente, não foi um doutorado convencional. Embora, desde o início, eu imaginava que teria muitos desafios a enfrentar, eu não fazia ideia do que estava por vir.

Algumas pessoas me perguntaram se não seria melhor eu defender a tese focando em um projeto (escolhendo apenas um vírus), mas eu não conseguiria delimitar dessa forma. Muito do que está registrado nessa tese não será publicado em formato de artigo, mas todas essas etapas foram importantes para a minha formação, e os resultados, satisfatórios ou não, fizeram parte do meu processo de doutoramento.

Diante disso, mesmo com receio da tese parecer uma colcha de retalhos, com diversos fragmentos e sem muita conexão, eu decidi contar sobre tudo o que eu fiz durante esse período e, para isso, eu senti a necessidade de estruturar a escrita em capítulos. Além disso, essa tese é muito mais sobre a experiência com o desenvolvimento de produtos voltados para o diagnóstico sorológico do que com os agentes patológicos em si. Claramente, um estudo prévio das particularidades de cada um foi necessário. Com isso também, eu pude entender que o melhor ponto de partida para a geração desses produtos é aliar um bom antígeno (que começa com uma boa pesquisa) com uma plataforma bem estabelecida. O problema, é que nem sempre é fácil obter um bom antígeno.

Para situar toda a história, eu preciso voltar um pouco no tempo. Tudo começou no ano de 2016, no Laboratório de Virologia Básica e Aplicada (LVBA, ICB/UFMG), quando teve início o meu projeto de mestrado. Eu sempre fui motivada por projetos que me dessem a chance de contribuir para a geração de produtos de impacto social. Quando o professor Flávio me apresentou as possibilidades para aquele ano, eu fui levada pelo meu coração e não me vi fazendo outra coisa senão trabalhar com os pesadelos do momento: os vírus *Zika* e *Chikungunya*.

No final do meu mestrado, nós conseguimos obter os antígenos purificados dessas duas arboviroses. Os primeiros ensaios para a proteína do *Chikungunya* já demonstraram que a mesma apresentava um bom rendimento e potencial de diagnóstico sorológico. Mas, para superar o chamado “vale da morte” ainda havia muito chão (ou pontes) pela frente. Foi então que eu tive a oportunidade de levar o

meu projeto (agora de doutorado) para o CT-Vacinas, um laboratório de pesquisa e desenvolvimento da UFMG localizado no Parque Tecnológico de Belo Horizonte.

Os pesquisadores do CT-Vacinas já tinham a expertise de produção de proteínas recombinantes em procariotos e aplicação das mesmas em plataformas de diagnóstico sorológico para doenças negligenciadas como Chagas, Leishmaniose e Malária. No meu primeiro ano de doutorado, em 2018, foram produzidas novamente as proteínas do *Chikungunya* e *Zika* em sistema procarioto. No primeiro caso, nós tivemos um bom resultado permitindo assim o desenvolvimento e a validação de um kit de ELISA, que constituem o Capítulo I e II desta Tese.

Diante do potencial desse antígeno, nós ampliamos o projeto para a geração de um protótipo de teste rápido, que foi o tema do Capítulo III. Algumas das dificuldades de obtenção de antígenos em suas conformações nativas e solúveis nos motivou a tentar uma abordagem diferente: a expressão de proteínas recombinantes em sistema eucarioto. Nesta época, uma outra tecnologia chegava ao CT-Vacinas. Em 2019, surgiu a possibilidade de produzir as proteínas do meu projeto em Baculovírus. Este sistema de expressão nos apresentou uma série de desafios, como descrito no capítulo IV, e nos pareceu uma alternativa em potencial para a geração de proteínas glicosiladas.

No início de 2020, ainda com algumas questões em aberto, surge a ameaça do novo Coronavírus. Em janeiro, o CT-Vacinas já começou a se preparar para atender as demandas que poderiam surgir. Em março, todos os outros projetos do CT-Vacinas pararam pela urgência da pandemia, e eu comecei a trabalhar com a expressão das proteínas para geração de testes sorológicos contra o SARS-CoV-2, que contribuíram para adição de um novo capítulo nessa história.

O Capítulo V, encerra a minha tese de doutorado, mas o projeto ainda perdura. A COVID-19 mudou o mundo, e comigo não poderia ser diferente. Muitas vezes durante o ano de 2020, eu me senti, como se diz, no “olho do furacão”. Mas eu também sinto que fui uma pessoa de sorte, por estar no “olho do furacão”, e mesmo assim, me parecer o momento certo e o lugar certo. A oportunidade de trabalhar na linha de frente me transformou. Foi uma mistura de pressão, responsabilidade e entrega. E por mais imprevisível que possa parecer, eu aprendi a ver a beleza no caos. Fazer parte

disso me trouxe um retorno inesperado e, apesar de já saber da importância do nosso trabalho, como cientistas, pela primeira vez eu senti isso na pele.

Minha mãe uma vez me ensinou que ninguém é uma ilha e que nada neste mundo se faz sozinho. Muitas pessoas fazem parte desta história e contribuíram para que eu pudesse construir esta “colcha de retalhos”. Por conta disso, deixo meu agradecimento especial a cada um, nas páginas seguintes.

Foi um desafio costurar a colcha. Mas, no final, ela me proporcionou um orgulho inestimável das suas histórias, sendo tão cheia de significados que eu jamais teria imaginado quando comecei.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Prof. Flávio Guimarães da Fonseca, pela orientação e pela confiança. Obrigada por me ensinar que a academia vai muito além do que eu imaginava. Você é e sempre será um exemplo para mim, como pessoa e profissional. Sua humildade, garra e dedicação me guiam a cada dia!

À banca examinadora, Dra. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli, Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho, Dr. Leonides Rezende Júnior, Dra. Patrícia Donado Vaz de Melo, Dra. Danielle Soares de Oliveira Daian e Silva e Dr. Breno de Mello, pela disponibilidade e por contribuírem para este trabalho.

Aos integrantes do CT-Vacinas, pelo acolhimento e excelente convivência, que tornaram a rotina mais harmônica e gratificante. Aos pesquisadores associados, Professores Ana Paula Fernandes, Santuza Teixeira e Ricardo Gazzinelli, obrigada pela oportunidade. É uma honra fazer parte dessa equipe tão renomada e poder atuar num centro de pesquisa responsável pelo desenvolvimento de produtos de grande impacto para a saúde do nosso país.

Agradeço a minha coorientadora, Dra. Lara Godoi, pela prestatividade, pela experiência compartilhada e por acalmar meu coração nos momentos de insegurança. Você foi essencial para a minha formação e eu agradeço todos os dias por ter topado fazer parte dela.

À Dra. Maria Marta Figueiredo, por tudo o que me ensinou, na bancada e na vida. Obrigada por sempre ser tão solícita, tão bondosa e por fazer tudo sem pedir nada em troca. Caso contrário, minha dívida com você seria eterna. Obrigada de coração, você é uma pessoa iluminada e uma inspiração para mim!

À Sarah Rodrigues, pela sua preciosidade e delicadeza. Sua contribuição para este trabalho é inestimável. Obrigada por me ajudar em tudo que precisei e por dividir tantos desafios.

Ao Dr. Luís Adan, por essa parceria tão importante na reta final, e por contribuir significativamente para o nosso trabalho. Você é a personificação da linha de frente do laboratório, sempre firme e forte!

À Dra. Natalia Salazar, por toda expertise compartilhada na arte da geração das proteínas recombinantes. Obrigada por promover este diferencial no CT-Vacinas, por nos permitir ser mais independente e por contribuir para a tecnologia nacional desses

insumos. As recombinantes são a chave de tudo e o que permitem nossos kits serem mais acessíveis.

Aos membros do LVBA (Laboratório de Virologia Básica e Aplicada), Profa. Edel Stancioli e Profa. Jordana Reis e alunos. Agradeço a todos pelo apoio, pela torcida nas apresentações e por vibrarem a cada vitória do grupo.

Às instituições financiadoras, CNPq e CAPES, por fornecerem as bases para a realização deste trabalho.

Aos pesquisadores de instituições parceiras, que nos deram credibilidade e que realizaram as validações externas dos nossos produtos. Dr. Antônio Ferreira e Dr. Edimilson D. da Silva do Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (Fiocruz RJ), Dr. Edson Durigon do Laboratório de Virologia (USP) e Dra. Marilda Siqueira do Laboratório de Vírus respiratórios e Sarampo (Fiocruz RJ).

Sempre serei grata aos que estiveram comigo, de alguma forma, nesta jornada...

Aos meus pais, *in memoriam*, Márcia e Eduardo. A falta que vocês me fazem é imensa, mas é por tudo o que fizeram por mim que eu sigo em frente.

À minha avó Maria e a minha Tia Mary por todo carinho e educação. Vocês são guerreiras, me dão força e me orgulham demais!

Ao Cauê, pelo amor e pela paciência. Diante da vastidão do espaço e da imensidão do tempo, é uma alegria poder compartilhar um planeta e uma época com você (a frase não é minha, claro, mas traduz bem o quero dizer). Você me aguenta até quando eu mesma não me suporto. Obrigada por me fazer sorrir todos os dias e por compartilhar sua família linda comigo. Danilo, Rejane, Sr. Antônio, Dona Cida, Dona Wanda e membros Emilio/Moraes e Ltda. Vocês são minha segunda casa!

Victor e Silvinha, "Olar", vocês... Obrigada pelo apoio, pelas risadas e por estarem ao meu lado mesmo que virtualmente em momentos tão importantes. Vocês são incríveis!

À Jô e Carla, por dividirem a casa e a pós graduação comigo. A leveza da nossa convivência foi essencial para a nossa rotina pesada. Obrigada por tudo!

Carlinha e Leo Pedone, obrigada pelos anos de amizade que vão além do que cabe em minhas mãos. Obrigada por serem compreensíveis e por não deixarem minha ausência afetar nossa relação. Não vejo a hora dessa tempestade passar para poder estarmos juntos novamente.

Por fim, a todos que ficaram em casa e respeitaram o isolamento social. Essa é a maior prova de respeito com o próximo que vocês poderiam dar. Obrigada por me fazerem perceber que meu esforço não era em vão. Obrigada também aqueles que nos doaram máscaras e toucas. Esse gesto foi tão significativo e nos ajudou de uma forma imensurável, físico e emocionalmente.

“Não tinha sido corajoso porque da primeira vez ele não tivera medo: era a única coisa que ele poderia fazer. Mas, voltar e, desta vez sentindo medo, aquilo era coragem.”

Neil Gaiman -Coraline (2003).

RESUMO

Os testes sorológicos, como o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e os testes rápidos disponíveis no Brasil são dependentes de tecnologia estrangeira. Uma das principais matérias-primas importadas é o antígeno, o que torna o diagnóstico mais caro, menos acessível e sujeito a oscilações de disponibilidade devido às demandas internacionais. Este estudo visa a produção de antígenos capazes de detectar a presença de anticorpos específicos contra CHIKV, ZIKV e SARS-CoV-2, utilizando ferramentas diagnósticas. Para isso, proteínas destes vírus foram analisadas *in silico* e expressas em diferentes sistemas de expressão (procarioto e eucarioto). A proteína ZIKV-E produzida em *E.coli* não foi capaz de diferenciar soros de pacientes infectados daqueles de indivíduos saudáveis, no entanto, a mesma proteína produzida em sistema baculovírus, apresentou potencial de aplicabilidade em ELISA (acurácia de 100% para um experimento preliminar, avaliado com oito amostras soropositivas e sete negativas). Para o desenvolvimento do ELISA de CHIKV foi possível comparar o desempenho da proteína E2 produzida em sistema procarioto com versão similar, produzida em células de mamífero (HEK-293T). A acurácia do ELISA IgG foi acima de 90% para ambas as versões de E2, sendo que, neste caso, o antígeno do sistema procarioto foi considerado preferencial por ser uma opção de maior rendimento e melhor custo benefício. Em contrapartida, para IgM, a acurácia da proteína E2 produzida em *E.coli* foi menor comparando com a mesma proteína produzida em HEK-293T (75% e 90%, respectivamente). Por fim, as proteínas do nucleocapsídeo (N) e uma porção da Spike (S1) do SARS-CoV-2 foram produzidas em *E. coli*. A proteína S1 apresentou menor rendimento, insolubilidade e desempenho inferior para reconhecer soros positivos para SARS-CoV-2, quando comparada à proteína N. Os padrões de soroconversão contra as proteínas N produzidas por nós e proteínas S adquiridas externamente foram avaliados em pacientes com COVID-19. Um imunoensaio com a proteína N (EIE COVID19 IgG) foi capaz de detectar anticorpos IgG contra SARS-CoV-2 com alta sensibilidade (93%) e especificidade (100%) quando comparado a um kit de referência comercial. Durante o desenvolvimento deste trabalho, um protótipo de teste rápido e dois kits de ELISA utilizando antígenos produzidos no CT-Vacinas foram desenvolvidos. A tecnologia EIE COVID19 IgG foi validada e transferida para o Instituto Bio-Manguinhos e assim como o kit para CHIKV, encontra-se em processo de registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Palavras-chave: ELISA, teste rápido, diagnóstico *in vitro*, proteínas recombinantes, arboviroses, *Chikungunya virus*, *Zika virus*, SARS-CoV-2, COVID-19.

ABSTRACT

Serological tests, such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and rapid tests available in Brazil are dependent on foreign technology. The main imported raw material is the antigen, which makes the diagnosis more expensive, less accessible and subject to availability fluctuation due to international demands. This study aims to generate antigens to detect the presence of specific antibodies against CHIKV, ZIKV and SARS-CoV-2 using diagnostic tools. The nucleotide coding sequences of proteins from these viruses were analyzed *in silico* and expressed in different expression systems (prokaryotic and eukaryotic). The ZIKV-E protein produced in *E.coli* was not able to differentiate sera from infected patients and healthy individuals. However, the same protein produced in a baculovirus system showed potential for ELISA applicability (100% accuracy for a preliminary experiment, using eight positive and seven negative samples). An ELISA to detect antibodies against CHIKV allowed the comparison between the E2 protein produced in two different expression systems: *E.coli* (prokaryotic) versus HEK-293T (eukaryotic). The IgG ELISA accuracy was higher than 90% for both versions of E2 and the antigen of the prokaryotic system was considered preferable because it had a higher yield option. In contrast, for IgM, the accuracy of the E2 protein produced in *E.coli* was lower when compared to the same protein produced in HEK-293T (75% and 90%, respectively). Also, SARS-CoV-2 nucleocapsid (N) and a truncated Spike (S1) was produced in *E.coli*. The S1 protein presented lower yields, insolubility, and poorer performances to recognize SARS-CoV-2-positive sera when compared to the N protein. Seroconversion patterns against the in-house N and commercial S proteins were evaluated in COVID-19 patients. An immunoassay using N protein (EIE COVID19 IgG) was able to detect IgG antibodies against SARS-CoV-2 with high sensitivity (93%) and specificity (100%) when compared to a commercial reference kit. During the development of this work, a prototype of a rapid test and two ELISA kits using antigens produced at CT-Vacinas have been developed. The EIE COVID19 IgG technology was validated and transferred to the Bio-Manguinhos Institute and is currently under the registration process at the Brazilian Health Regulatory Agency (ANVISA) as well as the CHIKV ELISA kit.

Keywords: ELISA, rapid test, *in vitro* diagnostics, recombinant proteins, arboviruses, Chikungunya virus, Zika virus, SARS-CoV-2, COVID-19.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Genoma de um Alphavirus	37
Figura 2 - Estrutura do CHIKV	38
Figura 3 - Diagrama do complexo formado pelas proteínas do envelope do CHIKV	39
Figura 4 - Organização genômica dos flavivirus e função das proteínas virais	43
Figura 5 - Esquema estrutural de um flavivírus	44
Figura 6 - Dímero da proteína E do ZIKV em forma de fita	44
Figura 7- Padronização da expressão da proteína CHIKV-E2 em sistema procarioto	74
Figura 8- Purificação das proteínas CHIKV-E2 e ZIKV-E expressas em sistema procarioto	75
Figura 9 – Avaliação do potencial diagnóstico do antígeno ZIKV-E em ELISA	79
Figura 10 - Padronização do ELISA IgG indireto para detectar anticorpos contra CHIKV	80
Figura 11- Padronização do ELISA IgM indireto para detectar anticorpos contra CHIKV	81
Figura 12- Comparação de desempenho dos antígenos CHIKV-E2 produzidos em <i>E. coli</i>	82
Figura 13: Produção de anticorpo policlonal α -CHIKV-E2	90
Figura 14- Componentes principais de um teste imunocromatográfico de fluxo lateral	117
Figura 15- Modelos de teste rápido por IFL propostos	120
Figura 16- Etapa de produção do conjugado para composição do teste rápido	125
Figura 17- Teste preliminar de IFL do tipo indireto para o diagnóstico de infecções por CHIKV	126
Figura 18- Estrutura e ciclo multiplicativo dos baculovírus AcMNPV	133
Figura 19- Panorama da expressão de proteínas recombinantes em baculovírus	138
Figura 20- Representação do vetor pFastBac™ TOPO™	139
Figura 21- Representação da etapa da transposição	142
Figura 22- Análise de códons da sequência CHIKV-E2 e ZIKV-E	146
Figura 23- Gel de agarose mostrando a amplificação dos fragmentos de CHIKV-E2 e ZIKV-E	147
Figura 24- Confirmação da construção dos vetores recombinantes	148
Figura 25- Análise eletroforética por gel de agarose da PCR de confirmação da transposição	149
Figura 26- Efeitos citopáticos observados em células SF9 após transfecção	149
Figura 27- Análise da produção da proteína ZIKV-E em BVE	150
Figura 28- Análise de desempenho da proteína ZIKV-E produzida em sistema baculovírus	151
Figura 29 - Análise da produção da proteína CHIKV-E2 em BVE	152
Figura 30 Análise de desempenho da proteína CHIKV-E2 produzida em sistema baculovírus	153
Figura 31- Avaliação da precisão entre lotes do ELISA CHIKV-E2	108
Figura 32- Estudo de reatividade cruzada / interferentes do kit ELISA CHIKV-E2	108
Figura 33- Teste de estabilidade para definição dos controles.	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Dados das fichas clínicas dos pacientes infectados com CHIKV e DENV.....	76
Tabela 2- Avaliação dos parâmetros de desempenho dos testes ELISA avaliados para detectar anticorpos anti-CHIKV.....	83
Tabela 3- Análise da concordância entre os testes para CHIKV pelo coeficiente Kappa (K).	86
Tabela 4- Desempenho do ELISA para CHIKV utilizando a proteína E2 e proteína A-HRP como conjugado.....	106
Tabela 5-Avaliação da precisão (repetibilidade e precisão intermediária) do ELISA para detecção de anticorpos anti-CHIKV-E2.....	107
Tabela 6- Ensaio de degradação acelerada para o kit ELISA CHIKV-E2.	110
Tabela 7- Ensaio de estabilidade em tempo real para o ELISA CHIKV-E2	110
Tabela 8: Revisão de algumas publicações envolvendo kits comerciais para detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2.....	164
Tabela 9. Homologia entre as sequências das proteínas selecionadas neste estudo <i>versus</i> outros coronavírus humanos circulantes no país.....	175
Tabela 10: Avaliação das proteínas N, S1(F) e S individuais e associadas em plataforma ELISA para detecção de IgG.....	188
Tabela 11: Avaliação das proteínas N, S1(F) e S individuais e associadas em plataforma ELISA para detecção de IgM.....	189
Tabela 14: Análise de precisão do kit de ELISA COVID-19 IgG.....	196
Tabela 15: Análise da precisão entre lotes do kit de ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-COVID19.	196
Tabela 16: Variação do índice durante o ensaio de estabilidade acelerada.	197
Tabela 17: Variação do índice durante o ensaio de estabilidade em tempo real após aberto.	198
Tabela 18: Concordância Positiva do ELISA COVID-19 IgG em relação a qPCR.....	199

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Diagnóstico clínico para Dengue, Zika e Chikungunya segundo recomendações do Ministério da Saúde. _____	28
Quadro 2- Testes sorológicos disponíveis para a detecção de infecções por CHIKV. _____	53
Quadro 3-Testes sorológicos disponíveis para a detecção de infecções por ZIKV. _____	57
Quadro 4 Referência para a classificação dos resultados pelos testes de ELISA _____	69
Quadro 5- Relação dos tampões de corrida utilizados durante o desenvolvimento do teste rápido _	123
Quadro 6- Linhagens celulares utilizadas para produção heteróloga de proteínas em baculovírus _	135
Quadro 7-Efeitos citopáticos observados em células de inseto após a transfecção com bacmídeo recombinante. _____	144
Quadro 8: Etapa de padronização dos controles do teste. Resultados obtidos com o Bioestab, que foi o estabilizante selecionado. _____	194

SUMÁRIO

PRÓLOGO	II
AGRADECIMENTOS	IX
RESUMO	XIII
INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO	23
1. ARBOVÍRUS	24
1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CHIKV	25
1.2 EPIDEMIOLOGIA DO ZIKV	26
1.3 DIAGNÓSTICO DAS ARBOVIROSES E SUA PROBLEMÁTICA	28
2. SARS-CoV-2	30
2.1 EPIDEMIOLOGIA DO SARS-CoV-2	30
2.2 DIAGNÓSTICO DA COVID-19	31
JUSTIFICATIVA	34
CAPÍTULO I	36
PRODUÇÃO, EM SISTEMA PROCARIOTO, DE PROTEÍNAS DOS VÍRUS CHIKV E ZIKV COM POTENCIAL PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO	36
1 REVISÃO DE LITERATURA	37
1.1 BIOLOGIA E PATOGENIA DO CHIKUNGUNYA VIRUS (CHIKV)	37
1.1.2 Genoma e estrutura do CHIKV	37
1.1.3 Febre Chikungunya	40
1.2 BIOLOGIA E PATOGENIA DO ZIKA VIRUS (ZIKV)	42
1.2.2 Genoma e estrutura do ZIKV	42
1.2.3 Febre Zika	45
1.3 RESPOSTA IMUNE CONTRA OS ARBOVÍRUS	46
1.3.1 RESPOSTA ADAPTATIVA AO CHIKV	46
1.3.2 RESPOSTA ADAPTATIVA AO ZIKV	48
1.4 DIAGNÓSTICO DAS INFECÇÕES POR CHIKV	49
1.5 DIAGNÓSTICO DAS INFECÇÕES POR ZIKV	51
1.6 PRODUTOS COMERCIAIS DISPONÍVEIS PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES POR ZIKV E CHIKV	53

1.7	PRODUÇÃO HETERÓLOGA EM SISTEMA PROCARIOTO E ANTÍGENOS DE CHIKV E ZIKV COM POTENCIAL PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO	58
2	OBJETIVOS	60
2.1	OBJETIVO GERAL	60
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	60
3	METODOLOGIA	61
3.1	CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS RECOMBINANTES CONTENDO OS GENES DE INTERESSE	61
3.2	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES EM <i>E. COLI</i>	61
3.3	SDS-PAGE	63
3.4	WESTERN BLOT	63
3.5	OBTENÇÃO DE SORO HIPERIMUNE DE CAMUNDONGO PARA CHIKV E ZIKV	64
3.6	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SOROTECA HUMANA	65
3.6	PROCEDIMENTO PADRÃO PARA O ELISA INDIRETO.....	67
3.6.1	ANÁLISES DOS RESULTADOS DE ELISA E VERIFICAÇÃO DO POTENCIAL ANTIGÊNICO DAS PROTEÍNAS PRODUZIDAS.....	68
3.7	PRODUÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL EM COELHO PARA O DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMAS DE DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO	71
4	RESULTADOS.....	73
4.1	PRODUÇÃO DE CHIKV-E2 E ZIKV-E EM BL21 (DE3)	73
4.2	CARACTERIZAÇÃO DA SOROTECA	75
4.3	ELISA COM A PROTEÍNA ZIKV-E	78
4.4	ELISA DAS PROTEÍNAS DE CHIKV	79
4.4.1	PADRONIZAÇÃO DO ELISA PARA DETECÇÃO DE INFECÇÕES PELO CHIKV	79
4.4.2	COMPARAÇÃO DE DESEMPENHO DAS PROTEÍNAS CHIKV-E2 EM ELISA	81
4.5	PRODUÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL A-CHIKV-E2 EM COELHO	89
5	DISCUSSÃO	91
6	CONCLUSÃO	96
	CAPÍTULO II	97
	PROTOTIPAGEM DO KIT DE ELISA PARA DETECÇÃO DE INFECÇÕES PELO VÍRUS CHIKUNGUNYA ..	97
1	INTRODUÇÃO	98
1.1	VALIDAÇÃO E PROTOTIPAGEM	98

2	OBJETIVOS	99
3	METODOLOGIA	100
3.1.	VALIDAÇÃO E ANÁLISE DE PROTÓTIPO	100
3.1.1	Análise de desempenho	100
3.1.2	Precisão.....	100
3.1.3	Especificidade analítica / Interferentes	102
3.1.4	Padronização dos controles	103
3.1.5	Estabilidade	103
3.1.6	Validação externa do produto ELISA CHIKV-E2	105
4	RESULTADOS	106
4.1	ANÁLISE DE DESEMPENHO	106
4.2	PRECISÃO	107
	ESPECIFICIDADE ANALÍTICA/INTERFERENTES.....	108
4.3	PADRONIZAÇÃO DOS CONTROLES.....	109
4.4	ESTABILIDADE DO PRODUTO ELISA CHIKV-E2	110
4.5	VALIDAÇÃO EXTERNA	111
5	DISCUSSÃO	112
6	CONCLUSÃO	115
	CAPÍTULO III	116
	DESENVOLVIMENTO DE UM PROTÓTIPO DE TESTE RÁPIDO PARA CHIKUNGUNYA	116
1	REVISÃO DE LITERATURA	117
1.1	IMUNOCROMATOGRAFIA DE FLUXO LATERAL (IFL).....	117
2	OBJETIVOS	119
3	METODOLOGIA	120
3.1	PROPOSTA DE MODELO PARA O TESTE RÁPIDO.....	120
3.2	SÍNTESE DO OURO COLOIDAL	120
3.3	PREPARAÇÃO DO CONJUGADO	121
3.4	PREPARO IMPREGNAÇÃO DAS LINHAS TESTE E CONTROLE	122
3.5	MONTAGEM E EXECUÇÃO DOS TESTES	123
4	RESULTADOS	125
4.1	TESTE RÁPIDO PARA CHIKV UTILIZANDO A PROTEÍNA CHIKV-E2 PRODUZIDA EM <i>E.COLI</i>	125

4.1.1	PADRONIZAÇÃO DO CONJUGADO	125
4.1.2	DESENVOLVIMENTO DE UM PROTÓTIPO DE TESTE RÁPIDO PARA CHIKV	126
5	DISCUSSÃO	127
6	CONCLUSÃO	128
CAPÍTULO IV		129
PRODUÇÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DOS VÍRUS CHIKUNGUNYA E ZIKA EM BACULOVÍRUS		129
1	REVISÃO DE LITERATURA	131
1.1	BACULOVÍRUS	131
1.1.1	Estrutura e Ciclo de multiplicação dos Baculovírus	131
1.1.2	Produção heteróloga de proteínas em Baculovírus	133
1.1.3	Linhagens celulares utilizadas para produção heteróloga de proteínas em baculovírus	134
1.2	ANTÍGENOS DE CHIKV E ZIKV PRODUZIDOS EM BACULOVÍRUS DESCRITOS NA LITERATURA E UTILIZADOS EM ELISA	135
2	OBJETIVOS	136
3	METODOLOGIA	137
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO CAPÍTULO	137
3.2	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES EM SISTEMA BACULOVÍRUS - BAC-TO-BAC	137
3.2.1	Geração dos vetores pFastBac™ TOPO™ recombinantes	138
3.2.2.	Geração dos bacmídeos recombinantes	142
3.2.3.	Produção dos baculovírus recombinantes	143
3.2.4.	Expressão e purificação das proteínas recombinantes ZIKV-E e CHIKV-E2	145
4	RESULTADOS	146
4.1	ANÁLISE DE CÓDONS DAS SEQUÊNCIAS EXISTENTES PARA EXPRESSÃO EM SISTEMA BACULOVÍRUS	146
4.1	GERAÇÃO DOS VETORES PFASTBAC RECOMBINANTES	146
4.2	CONSTRUÇÃO DOS BACMÍDEOS RECOMBINANTES CONTENDO OS GENES ZIKV-E E CHIKV-E2	148
4.3	PRODUÇÃO DE ZIKV-E EM SF9	149
4.3.1	ELISA DA PROTEÍNA ZIKV-E PRODUZIDA EM SISTEMA BACULOVÍRUS	150
4.4	PRODUÇÃO DE CHIKV-E2 EM SF9 E HIGH-FIVE	151
4.4.1	ELISA DA PROTEÍNA CHIKV-E2 PRODUZIDA EM SISTEMA BACULOVÍRUS	152

5	DISCUSSÃO	154
6	CONCLUSÃO	156
	CAPÍTULO V	157
1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	158
1.1	COVID-19	158
1.2	ESTRUTURA E GENOMA DO SARS-CoV-2.....	158
1.3	RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA AO SARS-CoV-2.....	160
1.4	ANTÍGENOS DE SARS-CoV-2 COM POTENCIAL PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO	161
1.4.1	ELISA COMERCIAIS PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-SARS-CoV-2	162
2	OBJETIVOS	165
2.1	OBJETIVO GERAL	165
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	165
3	METODOLOGIA	166
3.1	CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS CONTENDO OS GENES DE INTERESSE	166
3.2	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES EM <i>E. COLI</i>	166
3.3	DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-SARS-CoV-2 UTILIZANDO PROTEÍNAS DERIVADAS DA <i>SPIKE</i>	167
3.4	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SOROTECA HUMANA	168
3.5	ELISA	169
3.5.1	Validação para obtenção de protótipo adequado à comercialização	171
3.5.1.1	Validação interna inicial do ELISA COVID-19 IgG	171
3.5.1.2	Padronização dos controles do ELISA COVID-19 IgG	171
3.5.1.3	Precisão.....	172
3.5.1.4	Especificidade analítica / Interferentes.....	172
3.5.1.5	Estabilidade	173
3.5.1.6	Validação externa e análises de interferentes	173
4	RESULTADOS	175
4.1	ANÁLISE DE SIMILARIDADE ENTRE AS PROTEÍNAS SELECIONADAS PARA O DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 E AS PROTEÍNAS DE OUTROS CORONAVÍRUS.....	175
4.2	PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS DE SARS-CoV-2 EM BL21(DE3).....	175
4.3	AVALIAÇÃO INICIAL DO POTENCIAL ANTIGÊNICO DAS PROTEÍNAS PRODUZIDAS .	177
4.4	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIGÊNICO DE PROTEÍNAS PRODUZIDAS EM SISTEMA EUCARIOTO DERIVADAS DA <i>SPIKE</i> DO SARS-CoV-2	178
4.5	COMPARATIVO ENTRE AS PROTEÍNAS N E S.....	181

4.5.1	EXPERIMENTOS COMPARANDO N E S1(F)	181
4.5.1.1	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ANTI-N E ANTI-S1 EM AMOSTRAS INDIVIDUAIS	181
4.5.1.2	ACOMPANHAMENTO DA SOROCONVERSÃO E DA LONGEVIDADE DE ANTICORPOS DO TIPO IgG UTILIZANDO AS PROTEÍNAS N E S1(F)	182
4.5.2	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL CONTRA AS PROTEÍNAS N, S E S1(F) EM AMOSTRAS DE PACIENTES INDIVIDUAIS CONFIRMADOS PARA COVID-19	184
4.5.2.1	ANÁLISE DE DESEMPENHO DAS PROTEÍNAS, N, S, S1(F) ISOLADAS E ASSOCIADAS EM PLATAFORMA ELISA	186
4.6	ESTUDO LONGITUDINAL DA COVID-19.....	189
4.7	VALIDAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE PROTÓTIPO ADEQUADO À COMERCIALIZAÇÃO	191
4.7.1	Determinação dos controles	193
4.7.1	Precisão	195
4.7.2	Estabilidade	197
4.7.2.1	Estabilidade por agressão acelerada	197
4.7.2.2	Estabilidade após aberto	198
4.7.1	Concordância Positiva em relação a PCR	198
4.7.2	Comparação com método sorológico de referência (DPP)	199
4.7.3	Validação externa e análise de interferentes	200
5	DISCUSSÃO	204
6	CONCLUSÃO	208
	REFERÊNCIAS	210
	RELAÇÃO DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA	224
	APÊNDICE A-SEQUÊNCIAS DOS GENES CHIKV-E2 E ZIKV-E E MAPA DOS PLASMÍDEOS PARA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS EM <i>E.COLI</i>	229
	APÊNDICE B- SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA O PREPARO E ANÁLISE DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	230
	APÊNDICE C- SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA ELISA	233
	APÊNDICE D- COMPARAÇÃO DE DESEMPENHO DOS TESTES DE ELISA PARA CHIKV-CONT.	236
	APÊNDICE E- DADOS DA ANÁLISE DE DESEMPENHO DO KIT DE ELISA PARA CHIKV (UTILIZANDO PROTEÍNA A-HRP COMO CONJUGADO)	237
	APÊNDICE F - PLASMÍDEOS CONSTRUÍDOS PARA EXPRESSÃO DOS GENES EM SISTEMA BACULOVÍRUS E LISTA DE INICIADORES UTILIZADOS	239
	APÊNDICE G- DADOS DO TESTE DE ESPECIFICIDADE ANALÍTICA/INTERFERENTES DO ELISA PARA CHIKV	240

APÊNDICE H - ANÁLISE DE DESEMPENHO DAS PROTEÍNAS N, S1(F) E S EM ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-SARS-COV-2	241
APÊNDICE I- AMOSTRAS UTILIZADAS NA PADRONIZAÇÃO DO KIT EIE COVID-19 IGG CONT.	247
APÊNDICE J- AMOSTRAS UTILIZADAS PARA O CÁLCULO DO <i>CUT-OFF</i> DURANTE A AVALIAÇÃO INICIAL DO KIT EIE COVID-19 IGG.....	250
APÊNDICE K- AMOSTRAS UTILIZADAS NA VALIDAÇÃO INTERNA DO KIT EIE COVID-19 IGG-CONT.	251
ANEXO A- LICENÇA PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS UTILIZANDO COELHOS, SOB RESPONSABILIDADE DO DR. RICARDO GAZINELLI (COORDENADOR DO CT-VACINAS).	255
ANEXO B- CARTA EMITIDA PELA FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS-FUNED A RESPEITO DO USO DE AMOSTRAS HUMANAS NO PROJETO.....	256
ANEXO C- PARTE DO RELATÓRIO GERADO PELA VALIDAÇÃO EXTERNA DE PRODUTOS DO CT-VACINAS PELO LABORATÓRIO EM TECNOLOGIA DIAGNÓSTICA (FIOCRUZ, RJ) INCLUINDO O ELISA PARA CHIKV.	257
ANEXO D- PARTE DO PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP PARA OBTENÇÃO DE AMOSTRAS HUMANAS PARA A VALIDAÇÃO DE PLATAFORMAS DE DIAGNÓSTICO DA COVID-19 EM NOME DA PROFESSORA ANA PAULA SALLES (CT-VACINAS).....	258
ANEXO E- RESULTADOS DA VALIDAÇÃO EXTERNA DO ELISA COVID-19 IGG CT-VACINAS REALIZADONO LATED/VDTEC/BIO-MANGUINHOS LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA DIAGNÓSTICA – LATED/VDTEC/BIO-MANGUINHOS	259

INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO

“Agora entendo que um dos motivos importantes para ir à universidade e obter uma educação é aprender que as coisas em que você acreditou a vida toda não são verdade, e nada é o que parece ser.”

Daniel Keyes - Flores Para Algernon(1966).

1. ARBOVÍRUS

Arbovírus (uma contração de *arthropod-borne virus*) é o termo que define ecologicamente os vírus que são transmitidos entre hospedeiros vertebrados por meio da picada de artrópodes hematófagos (WHO, 1967).

Os arbovírus que causam doenças em humanos e outros animais de sangue quente são membros de cinco famílias virais: *Bunyaviridae*, *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae*. A maioria causa zoonoses que normalmente são dependentes de espécies animais não-humanas para a propagação de seus agentes etiológicos. Entretanto, alguns arbovírus adaptaram-se completamente aos seres humanos, sendo capazes de manter um ciclo de replicação mosquito-homem-mosquito que independe de reservatórios não-humanos (GUBLER *et al.* 2017).

A introdução de arbovírus no Brasil foi relatada desde o século XIX, quando o vírus da Febre amarela (*Yellow fever virus*, YFV), de origem africana, foi identificado na cidade do Rio de Janeiro (FRANCO, 1969). Desde 1986, epidemias quase ininterruptas de Febre do vírus da Dengue (DENV) ocorreram no Brasil (TEIXEIRA; BARRETO, 2008). Atualmente, quatro sorotipos do DENV circulam no país. Em maio de 2015, foi detectado o Zika (*Zika virus*, ZIKV), embora se tenha indícios de que ele foi introduzido no país em 2013 (FARIA *et al.*, 2016). Quanto ao Chikungunya (*Chikungunya virus*, CHIKV), amostras pertencentes às linhagens Asiática e Leste-Centro-Sul Africana (ECSA) circulam no país desde setembro de 2014 (NUNES *et al.*, 2015).

A transmissão do CHIKV e do ZIKV ocorre principalmente pela picada de fêmeas dos mosquitos *Aedes aegypti* ou *Aedes albopictus* infectados, espécies amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo e também responsáveis pela transmissão do DENV (PAIXÃO; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2018).

Estudos já demonstraram o impacto econômico das arboviroses no Brasil e em outros países. Dentre eles estão os custos associados ao combate ao vetor, custos médicos diretos (hospitalização e medicamentos) e custos indiretos (relacionados ao absenteísmo, tanto na esfera pública quanto na privada) (CARDONA-OSPINA *et al.*, 2015; SOUMAHORO *et al.*, 2009). O Brasil é um país amplamente acometido pelas arboviroses. Particularmente, a Febre Chikungunya apresenta o risco de cronificação, podendo levar a artralgias persistentes e com isso comprometer a capacidade

produtiva e redução da qualidade de vida dos indivíduos infectados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

De acordo com o estudo publicado por Teich e colaboradores, em 2016, a Febre Chikungunya foi a arbovirose que apresentou o maior número de anos de vida perdidos por incapacidade, denominados “anos de vida ajustados por incapacidade”, ou AVAI. Segundo a pesquisa, o custo anual total com o manejo das arboviroses no Brasil foi de aproximadamente R\$ 2,3 bilhões (2% do orçamento total previsto para a saúde no mesmo ano), sendo que Minas Gerais foi um dos quatro estados que apresentou os maiores gastos. De forma independente e similar, o manejo de outras arboviroses como DENV e ZIKV trazem impactos igualmente intensos ao país (TEICH; ARINELLI; FAHHAM, 2017).

1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CHIKV

Isolado primeiramente de um paciente durante um surto febril numa área de fronteira entre Moçambique e Tanzânia em 1952 o nome Chikungunya é derivado de uma palavra de origem local que significa "contorcer-se", ou "que se curva para cima", em referência à postura inclinada desenvolvida como resultado da intensa artralgia causada pela doença(SUN *et al.*, 2013).

Antes de 2000, grandes surtos de CHIKV foram raros, mas a partir da epidemia de 2005 na Ilha *Réunion*, território francês localizado no Oceano Índico, surtos tornaram-se mais frequentes e evidências genéticas sugerem possíveis mecanismos de adaptação evolutiva do vírus ao mosquito vetor(BURT *et al.*, 2012).

Análises filogenéticas indicam que o CHIKV se originou na África há mais de 500 anos(STAPLES; BREIMAN; POWERS, 2009), e uma linhagem comum divergiu em dois ramos distintos, denominados Oeste Africano (WA - *West African*) e Leste-Centro-Sul Africano (ECSA - *East Central South African*) (POWERS; LOGUE, 2007). A linhagem WA foi associada principalmente a pequenos focos em países localizados no oeste da África. Em contraste, a linhagem ECSA espalhou-se para novas regiões causando epidemias urbanas significativas. O vírus então evoluiu independentemente da linhagem ECSA em um genótipo distinto denominado Asiático (*Asian*), o que causou numerosos surtos. A linhagem do Oceano Índico (IOL - *Ocean Indian Lineage*) surgiu no Quênia em 2004 como uma linhagem descendente da ECSA, iniciando uma

das maiores epidemias de CHIKV registradas, com expansão para áreas muito além da faixa histórica do vírus. Durante esta epidemia, o vírus espalhou-se para várias ilhas do Oceano Índico, Índia e partes do Sudeste Asiático, levando a mais de 6 milhões de casos estimados(SILVA; DERMODY, 2017).

Ao longo dos anos, surtos de CHIKV foram relatados em países da África, Ásia, Europa e ilhas dos oceanos Índico e Pacífico. O vírus espalhou-se para quase 40 países em todo o mundo(WAHID *et al.*, 2017). No final de 2013, a primeira transmissão local do vírus nas Américas foi identificada em países e territórios do Caribe e até 2020, 47 países ou territórios em todas as Américas relataram mais de 1,7 milhões de casos suspeitos à Organização Pan-Americana da Saúde (PAHO/WHO, 2020).

O primeiro caso de transmissão autóctone do CHIKV no Brasil foi relatado em setembro de 2014, no Oiapoque (Amapá), e identificado como pertencente a linhagem Asiática. No mesmo mês, um surto causado por uma linhagem diferente, a ECSA, foi relatado na cidade de Feira de Santana, na Bahia (NUNES *et al.*, 2015).Desde então, o genótipo ECSA foi detectado em vários outros estados brasileiros e permanece como a linhagem predominante atualmente (RODRIGUES *et al.*, 2020),representando uma séria ameaça à saúde pública, por estar associada a maior proporção de sintomáticos para assintomáticos em comparação com a linhagem Asiática (NAVECA *et al.*, 2018).

1.2 EPIDEMIOLOGIA DO ZIKV

O ZIKV foi isolado pela primeira vez em 1947 na floresta de Zika, em Uganda, a partir de uma amostra de soro de um macaco *Rhesus* durante um estudo de vigilância da febre-amarela. Subsequentemente, em 1948, o ZIKV foi isolado de mosquitos (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952) e quatro anos mais tarde, também na região da Tanzânia, foi identificado em humanos (MACNAMARA, 1954). A partir de então, evidências da doença causada pelo ZIKV em humanos foram relatadas em outros países africanos, como Egito, República Centro-Africana, Serra Leoa e Gabão e em partes da Ásia, incluindo Índia, Malásia, Filipinas, Tailândia, Vietnã e Indonésia (HAYES, 2009).

O primeiro surto sistemático relatado de febre Zika ocorreu em 2007, na ilha Yap, nos Estados Federados da Micronésia (DUFFY *et al.*, 2009), seguido por uma

epidemia maior na Polinésia Francesa, em 2013, com uma estimativa de 30.000 infecções sintomáticas (BESNARD *et al.*, 2014). Um estudo epidemiológico declarou que, provavelmente, o ZIKV foi endêmico por décadas em partes da África subsaariana e da Ásia, chegando a mais de 50% de soroprevalência em países desses continentes (POSEN *et al.*, 2016).

Surtos de Zika já foram registrados na África, Américas, Ásia e Oceania. De acordo com Musso e colaboradores, o ZIKV seguiu claramente o mesmo caminho de DENV e CHIKV, espalhando-se para países infestados pelos vetores *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (GUBLER; VASILAKIS; MUSSO, 2017).

O Brasil foi o primeiro país das Américas a relatar um surto de ZIKV, em maio de 2015. Inicialmente, acreditava-se que o vírus tivesse sido introduzido durante a Copa do Mundo de 2014 (junho a julho) (ZANLUCA *et al.*, 2015) ou durante um festival de canoagem realizado no Rio de Janeiro, em agosto do mesmo ano (MUSSO; GUBLER, 2016). Entretanto, Faria e colaboradores mostraram que o ZIKV provavelmente circulou no país por mais de um ano antes de ser detectado. Verificou-se que o surto brasileiro provavelmente teve origem a partir de uma única introdução do vírus nas Américas, em meados de 2013, durante a Copa das Confederações. A data estimada de origem coincide com um aumento de viajantes de áreas endêmicas para o Brasil, bem como com surtos relatados nas ilhas do Pacífico. Além disso, esse estudo constatou que as amostras coletadas nas Américas estão intimamente relacionadas entre si e compartilham um ancestral com a linhagem que circulou na Polinésia Francesa em novembro de 2013 (FARIA *et al.*, 2016).

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) revelaram que um total de 87 países e territórios tiveram evidências de transmissão autóctone do ZIKV, distribuída em quatro das seis regiões da OMS (África, Américas, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental). Em 2018, um total de 31.587 casos suspeitos, prováveis e confirmados foram relatados nas Américas. Destes, 3.473 (11%) tiveram confirmação laboratorial (WHO, 2019).

1.3 DIAGNÓSTICO DAS ARBOVIROSES E SUA PROBLEMÁTICA

Casos de febre pelos vírus Chikungunya, Dengue e Zika são de notificação compulsória e estão presentes na Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública.

No Brasil, o Ministério da Saúde registrou quase 700 mil casos prováveis de infecções por ZIKV e CHIKV entre os anos de 2016 e 2017, entretanto, cerca de metade não foi confirmada. Dentre as principais causas da diferença entre casos prováveis e confirmados reside o fato de que o diagnóstico diferencial é muitas vezes inacessível. Além disso, tais viroses são indistinguíveis entre si do ponto de vista clínico e apresentam sintomas muito semelhantes aos da Febre do Dengue, doença já estabelecida previamente no Brasil (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2016).

O Ministério da Saúde publicou um guia recomendando que o diagnóstico clínico das arboviroses circulantes no país seja feito em comparação com outras doenças febris agudas associadas à artralgia (Quadro 1).

Quadro 1- Diagnóstico clínico para Dengue, Zika e Chikungunya segundo recomendações do Ministério da Saúde.¹

Sinais/Sintomas	Dengue	Zika	Chikungunya
Febre	> 38°C	Sem febre ou subfebril ($\leq 38^\circ\text{C}$)	Febre alta > 38°C
Duração	4 a 7 dias	1-2 dias subfebril	2-3 dias
<i>Rash</i> Frequência	Surge a partir do quarto dia 30% a 50%	Surge no primeiro ou segundo dia 90% a 100%	Surge 2-5 dias 50% dos casos
Mialgia (Frequência)	+++	++	+
Artralgia (frequência)	+	++	+++
Intensidade da dor articular	Leve	Leve/Moderada	Moderada/Intensa
Edema da articulação	Raro	Frequente e leve intensidade	Frequente e de moderada a intenso
Conjuntivite	Raro	50% a 90%	30%
Cefaleia	+++	++	++
Hipertrofia ganglionar	+	+++	++
Discrasia hemorrágica	++	ausente	+
Risco de morte	+++	+*	++
Acometimento Neurológico	+	+++	++
Leucopenia	+++	+++	+++
Linfopenia	Incomum	Incomum	Frequente
Trombocitopenia	+++	Ausente (raro)	++

Testes laboratoriais para detecção dos arbovírus podem ser realizados a partir de métodos moleculares e/ou sorológicos. Os primeiros, incluem a detecção do genoma viral pelas técnicas de PCR convencional e qRT-PCR, sendo considerados como o padrão ouro na identificação viral, uma vez que são capazes de fornecer um diagnóstico precoce da infecção. Embora este tipo de teste seja útil para a identificação rápida do vírus infeccioso, a técnica é limitada pela estreita janela de detecção e pela disponibilidade de acesso a infraestrutura necessária para sua realização (MORELI; DA COSTA, 2013).

Os métodos sorológicos, baseados na detecção indireta do vírus a partir da pesquisa de anticorpos de fase aguda (IgM) e de convalescência (IgG), como o ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), são considerados procedimentos de

¹Fonte: Brito & Cordeiro (2016); revisto por Ministério da Saúde (2017). A quantidade de "+" está relacionada a intensidade dos sintomas apresentados.

* Pode haver risco de morte nos casos neurológicos como a Síndrome de Guillain-Barré (GBS) decorrente da Febre Zika ou para crianças com malformações congênicas graves. O documento ressalta que o médico deve ficar atento para causas potencialmente fatais e que exijam uma conduta medicamentosa específica imediata.

aplicabilidade clínica imediata, podendo ser utilizados mesmo após a eliminação completa do vírus pelo sistema imune do hospedeiro, podendo também ser empregados em estudos epidemiológicos. Imunoglobulinas do tipo M são detectáveis de 5-7 dias após o início da infecção, sendo mais elevadas no período de 3 a 4 semanas podendo persistir por cerca de 2 meses. A detecção de IgG pode ocorrer de 7-10 dias após o início da infecção (normalmente após o fim da viremia) e permanecendo por meses ou anos (CAGLIOTI *et al.*, 2013; KERKHOF *et al.*, 2020).

2. SARS-CoV-2

Como se o problema das arboviroses não fosse grave o suficiente, durante a execução deste trabalho surgiu o coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2, em Inglês: *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*). Desde o início de 2020, diante da ameaça da pandemia, o CT-Vacinas se organizou e teve seus projetos dedicados à auxiliar no controle da doença associada ao novo coronavírus (COVID-19, do inglês: *Coronavirus Disease 2019*). Este estudo também contribuiu com esses projetos com a produção de proteínas de SARS-CoV-2 e ensaios de ELISA para detecção de anticorpos contra o vírus.

2.1 EPIDEMIOLOGIA DO SARS-CoV-2

Em dezembro de 2019, a ocorrência de uma doença respiratória aguda foi registrada em Wuhan, Província de Hubei, China. Em 9 de janeiro de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) confirmou a circulação de um novo coronavírus, sendo sua primeira sequência publicada por pesquisadores chineses no dia seguinte. Até o final de janeiro, vários países confirmaram casos importados, incluindo Estados Unidos, Canadá e Austrália (LANA *et al.*, 2020). No dia 30 do mesmo mês, a OMS declarou a epidemia do até então denominado novo coronavírus 2019 (2019-nCoV), como Emergência de Saúde Pública de Interesse Internacional (PHEIC) (WHO,2020).

Em fevereiro de 2020, o Grupo de Estudos Coronaviridae (CSG) do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), avaliou com base na filogenia, taxonomia e prática estabelecida, e reconheceu este vírus como um clado associado

ao protótipo do coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV), da espécie homônima, e o designou como SARS-CoV-2 (GORBALENYA *et al.*, 2020). No dia 11 de março de 2020, a OMS publicou que a situação se tratava de uma pandemia (WHO, 2020a).

O SARS-CoV-2, vírus responsável pela COVID-19, pertence a ordem Nidovirales, família *Coronaviridae* e gênero *Betacoronavirus*. Este é o sétimo coronavírus conhecido por infectar humanos, sendo os demais: coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) e da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), que também podem causar doenças graves, além de outros coronavírus humanos associados a sintomas leves (HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43 e HCoV-HKU1) (CORMAN *et al.*, 2018).

O Brasil declarou a COVID-19 uma emergência nacional de saúde pública em 3 de fevereiro de 2020 (CRODA *et al.*, 2020) sendo o primeiro caso confirmado no dia 25 do mesmo mês, de um passageiro vindo do norte da Itália para São Paulo (JESUS *et al.*, 2020).

Mundialmente, já são mais de 135 milhões de casos confirmados e 2,9 milhões de óbitos. O Brasil é o segundo país em número de casos (mais de 14 milhões) e de mortos pela COVID-19 (353 mil) (em 11 de abril de 2021) (WHO, 2021).

Pesquisadores fizeram um apanhado epidemiológico para casos de COVID-19 e constataram um viés socioeconômico no acesso a testes diagnósticos, sugerindo que o número de casos confirmados pode subestimar substancialmente o número de casos na população em geral, particularmente em regiões de menor nível socioeconômico (DE SOUZA *et al.*, 2020). De fato, o maior estudo de sorovigilância realizado até o momento sugere que o número de casos não detectados pode chegar a sete vezes mais que o número de casos relatados (DE CARVALHO *et al.*, 2020). Esses estudos destacam o alto potencial de transmissão do SARS-CoV-2 no país e o acesso desigual ao diagnóstico como fatores potencialmente contribuintes para a rápida disseminação da epidemia no Brasil.

2.2 DIAGNÓSTICO DA COVID-19

O isolamento do vírus SARS-CoV-2 requer instalações de nível de biossegurança 3 (BSL-3) e o vírus leva de 3 a 5 dias para causar alterações citopáticas características *in vitro*, não sendo uma opção viável para diagnóstico rápido da COVID-19.

A OMS recomenda a detecção do RNA viral do SARS-CoV-2 em amostras respiratórias, sendo este o diagnóstico considerado padrão ouro (WHO, 2020b). Após o isolamento do RNA da amostra e amplificação por meio da reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (RT-PCR), os iniciadores específicos para SARS-CoV-2 servem para pesquisar as sequências de RNA virais que são conservadas. Os genes estruturais, Ne E (responsáveis pelas proteínas do nucleocapsídeo e envelope, respectivamente), da polimerase de RNA dependente de RNA não-estrutural (RdRp), bem como os genes ORF 1a / b, são os alvos preferidos para os ensaios do tipo RT-PCR. Tradicionalmente, dois alvos moleculares devem ser incluídos no ensaio para evitar potencial reação cruzada com outros coronavírus (TOUMA, 2020).

Diante da pandemia, uma maior demanda por testes de diagnóstico levou a uma escassez crítica de material operacional para o diagnóstico molecular (ECDC, 2020), dificultando a detecção rápida em larga escala. Dessa forma, há uma necessidade urgente de identificar métodos diagnósticos alternativos. Os testes de detecção de anticorpos, seja por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) ou por imunoenaios de fluxo lateral no local de atendimento (chamados de *point-of-care*, POC), podem ajudar a superar alguns desses desafios. Os anticorpos específicos para SARS-CoV-2 podem ser detectados no soro de aproximadamente 40% dos pacientes com COVID-19 sete dias após o início dos sintomas, com taxas de soroconversão aumentando para >90% a partir do 14º dia (ZHAO *et al.*, 2020). Em estudos recentes, o teste de anticorpos mostrou ser mais sensível do que a detecção de ácido nucleico viral após aproximadamente oito dias de duração da doença (GUO *et al.*, 2020).

Embora a combinação de PCR e testes sorológicos seja ideal para um diagnóstico confiável, a detecção de anticorpos é particularmente relevante para os estágios posteriores da infecção, em que o vírus já foi eliminado (TO *et al.*, 2020). Além disso, testes sorológicos podem indicar os indivíduos que desenvolveram imunidade após a infecção, bem como definir e monitorar a extensão da disseminação

do vírus e a imunidade coletiva da população, contribuindo para estudos sorológicos epidemiológicos (BAO, 2020).

Devido à urgência e demanda, muitos testes sorológicos estão sendo rapidamente desenvolvidos e disponibilizados no mercado, com validação muitas vezes limitadas a poucas amostras e, em sua maioria, de pacientes hospitalizados(LASSAUNIÈRE *et al.*, 2020).

JUSTIFICATIVA

Ao longo da história e do processo de desenvolvimento científico, apesar de muitas perdas, as grandes catástrofes trouxeram também a oportunidade da melhoria tecnológica. Este trabalho justifica-se pela necessidade da autonomia nacional diante das epidemias, e agora pandemia, que afetaram e continuam afetando o país.

Algumas complicações associadas as arboviroses são de grande preocupação para o sistema de saúde. Para este trabalho, é importante mencionar a capacidade de neuroinvasão e neurovirulência do vírus Zika e sua Síndrome Congênita associada. Particularmente, a Febre Chikungunya apresenta um risco de cronificação, podendo levar a artralgias persistentes, que chegam a durar anos, e com isso comprometem a capacidade produtiva e reduzem a qualidade de vida dos indivíduos infectados, gerando grandes prejuízos sociais e econômicos para o país. O custo anual com o manejo das arboviroses no Brasil representa uma porcentagem significativa do orçamento total previsto para a saúde, sendo Minas Gerais um dos estados que apresenta os maiores gastos. Isso porque, muitas vezes o diagnóstico laboratorial nem sempre é acessível. As semelhanças clínicas, a cocirculação desses arbovírus, bem como ausência de vacinas de eficácia significativa e comprovada e de fármacos antivirais específicos contra tais arboviroses colocam uma enorme pressão em nosso fragilizado sistema público de saúde.

Em casos de epidemias arbovirais, o Ministério da Saúde preconiza que seja investigado inicialmente para Dengue, por sua maior gravidade e Zika, em casos de gravidez. Na época da obtenção das amostras de arbovírus para composição do banco de soros deste estudo, o paciente só era testado para Chikungunya se fosse negativo para Zika e Dengue e se apresentasse sinais específicos, que nem sempre são evidentes, podendo levar a um diagnóstico incorreto ou incompleto. Isso gera um grande impacto epidemiológico e, conseqüentemente, afeta as políticas de prevenção e controle e o gerenciamento adequado dos pacientes. A gestão adequada dos esforços para o combate das arboviroses requer, portanto, o diagnóstico diferencial como uma das principais medidas de controle.

O Brasil enfrenta inúmeros problemas relacionados ao diagnóstico rápido, acurado e/ou de baixo custo para uma variedade de infecções. Testes imunocromatográficos, disponíveis no mercado para detecção de arbovírus, têm sido associados a problemas de reatividade cruzada e baixas taxas de sensibilidade e especificidade. Quanto a testes do tipo ELISA, apesar de a literatura citar alguns

produtos com boa acurácia, se analisarmos os produtos registrados na ANVISA e efetivamente disponibilizados para venda, concluímos que nenhum deles foi completamente desenvolvido e/ou produzido no país. E, na maior parte dos casos, a principal matéria prima adquirida internacionalmente é o antígeno. O Brasil, nesse caso, é um importador de tecnologia, o que torna o diagnóstico mais caro e menos acessível. Dessa forma, a construção de sistemas diagnósticos nacionais e com boa acurácia é uma necessidade. Na maior parte dos casos, a principal matéria prima importada para desenvolvimento do sistema diagnóstico é o antígeno, sendo em sua maioria produzido em sistema eucarioto. Nosso desafio é justamente este: dominar uma tecnologia capaz de produzir antígenos de desempenho igual ou superior a encontrada em outros países e com custo acessível à realidade brasileira.

Como se o problema das arboviroses não fosse grave o suficiente, no final de 2019 surge a ameaça da COVID-19 e no primeiro trimestre de 2020 é declarada a pandemia. Apesar de muito ignorado inicialmente devido à baixa taxa de letalidade descrita nos primeiros dois meses após sua identificação, o SARS-CoV-2, em pouco tempo, desconstruiu o mundo da forma como o conhecíamos. Por ser um vírus de transmissão direta, muitas vezes assintomática, em pleno mundo globalizado e cada vez mais populoso, SARS-CoV-2 se propagou de maneira indiscriminada e já se tornou a maior crise sanitária dos últimos 100 anos.

Dessa forma, o nosso grupo se viu no papel de contribuir para o controle da pandemia. Atuando no desenvolvimento de kits de diagnóstico para outras doenças, visando sempre a autonomia e a geração de produtos nacionais, o CT-Vacinas entende o papel dos estudos epidemiológicos para avaliar e mensurar a extensão da COVID-19 e conseqüentemente seu impacto no país. A subnotificação dos números de casos é um problema real e somada a dificuldade de se importar insumos necessários para a realização desses testes, agrava a propagação da doença.

É inegável que existe um abismo de investimento no Brasil quando comparado a países desenvolvidos. A maioria do que é consumido em ciência no país diretamente dependente de importação e em uma situação de pandemia os entraves são ainda mais agravados. Dessa forma, é uma estratégia benéfica nacionalizar essas tecnologias e pensar em ciência como investimento e não como gasto, pois, o retorno a longo prazo será sempre muito maior.

CAPÍTULO I

Produção, em sistema procarioto, de proteínas dos vírus CHIKV e ZIKV com potencial para o diagnóstico sorológico

“Bons ventos começaram a soprar em nossa direção. Após exaustivos anos de procura, parece que achamos uma direção correta a seguir. Várias lacunas necessitam ser preenchidas. Nosso serviço de espionagem necessita continuar trabalhando a todo vapor, pois ainda não esclarecemos os passos do microrganismo que se encontra nas matas a nos espreitar até a próxima epidemia”.

Stefan Cunha Ujvari- A História da Humanidade Contada pelos Vírus (2012).

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 BIOLOGIA E PATOGENIA DO CHIKUNGUNYA VIRUS (CHIKV)

O CHIKV é um membro da família *Togaviridae*, pertencente ao gênero *Alphavirus*, o qual é composto de vários sorocomplexos agrupados de acordo com propriedades antigênicas. O CHIKV pertence ao complexo antigênico *Semliki Forest*, juntamente com outros *Alphavirus* transmitidos por mosquitos (BURT *et al.*, 2012).

1.1.2 Genoma e estrutura do CHIKV

O CHIKV, como um representante do gênero *Alphavirus*, possui RNA linear, de cadeia simples, orientação positiva e com aproximadamente 12 Kb. Seu genoma possui duas fases abertas de leitura (ORFs), sendo que a primeira codifica para proteínas não-estruturais (do inglês, *non structural proteins*- nsP) e a segunda para proteínas estruturais. Duas versões de poliproteínas não-estruturais podem ser traduzidas: nsP123 (mais abundante) e nsP1234 (em menor quantidade). A outra ORF, separada da primeira por uma região de junção (J), codifica uma segunda poliproteína que, por processamento proteolítico, origina as proteínas estruturais. No total, o genoma do CHIKV codifica para quatro proteínas não estruturais (nsP1, a helicase nsP2, nsP3 e a polimerase nsP4;) -extremidade 5', e cinco proteínas estruturais (C, E3, E2, 6K e E1) - extremidade 3'. As nsPs são traduzidas do RNA genômico e as proteínas estruturais do RNA subgenômico 26S (Figura 1)(KHAN *et al.*, 2002).

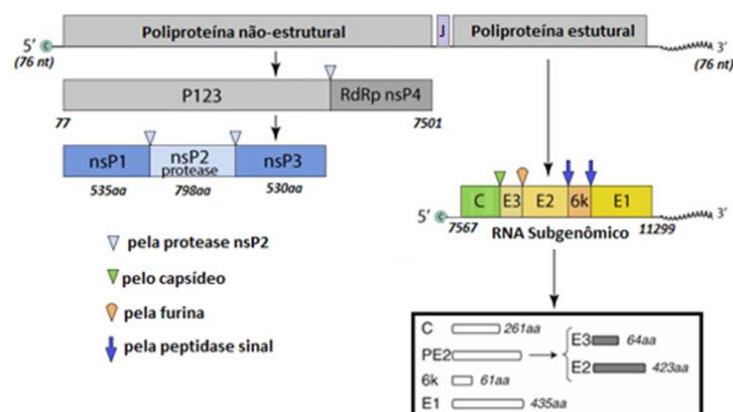


Figura 1 - Genoma de um *Alphavirus*, gênero que inclui o CHIKV mostrando as poliproteínas iniciais e seus produtos após o processamento. Adaptado de Viralzone (2016) e Solignat e colaboradores (2009).

Como mostrado na Figura 1 o genoma possui um *cap(C)* na extremidade 5' e é poliadenilado na região 3'. A região codificante é flanqueada nas extremidades 5' e 3' por sequências não traduzidas, sendo 5'UTR e 3'UTR, respectivamente. A primeira, age como um promotor para a síntese de RNA genômico e subgenômico. Já a região 3'-UTR é descrita por conter vários motivos conservados de atuação em *cis*, nomeados elementos de sequências repetidas (do inglês, *repeated sequence elements* - RSEs), que regulam a síntese de RNA viral). O genoma de CHIKV possui ainda, uma sequência de 19 nucleotídeos, precedendo a cauda poli-A, que é altamente conservada entre os *Alphavirus* e que aparenta ser uma sequência de reconhecimento da replicase viral (SOLIGNAT *et al.*, 2009).

Quanto a sua estrutura, o CHIKV é um vírus esférico, possui cerca de 60-70nm de diâmetro e revestido por um envelope lipídico onde estão inseridas as proteínas virais E1 e E2. Estas, por sua vez, estão associadas em heterodímeros que formam 80 trímeros, arranjados em simetria icosaédrica e que se projetam da superfície do vírion como “espículas”. O capsídeo é rodeado por uma bicamada lipídica, derivada da membrana plasmática de células hospedeiras, e seus aminoácidos N-terminais contêm resíduos carregados positivamente que se associam ao RNA genômico reconhecendo-o para o empacotamento durante a montagem da proteína do nucleocapsídeo (NCP) (HONG; PERERA; KUHN, 2006) (Figura 2).

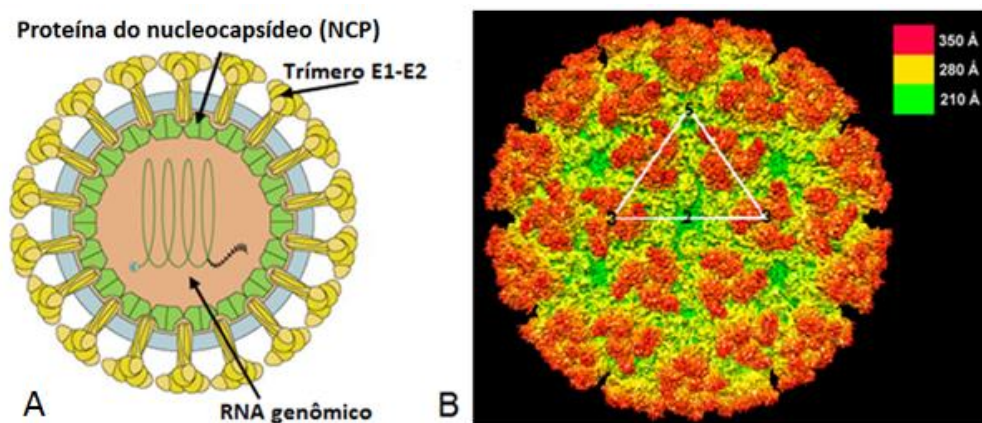


Figura 2 - Estrutura do CHIKV. A: Esquema geral de um *Alphavirus*, adaptado de Viralzone (2016). B: Crio microscopia eletrônica (crio- ME) de partículas semelhantes a vírus - *Chikungunya* (*virus-like particles* - VLPs), ectodomínio colorido de acordo com a distância radial a partir do centro do vírus (SUN *et al.*, 2013).

Há uma região hidrofóbica no domínio C-terminal da NCP que se liga a 33 aminoácidos da cauda citoplasmática de E2. Esta, por sua vez, interage de forma eficaz com as proteínas do núcleo interno com aqueles na superfície do vírion. Esta associação de E2 com o nucleocapsídeo é essencial para a montagem da partícula viral (SOLIGNAT *et al.*, 2009).

As proteínas do envelope ajudam na adsorção do vírus à célula hospedeira durante a infecção, sendo altamente conservadas entre os *Alphavirus* e, conseqüentemente, consideradas alvos antigênicos (VAN DUIJL-RICHTER *et al.*, 2015). Enquanto a primeira impulsiona a fusão de membranas, a segunda interage com receptores da célula hospedeira, ambas fazendo parte, portanto, do primeiro contato vírus-célula, sendo responsáveis pelo reconhecimento e geração de anticorpos. Além disso, segundo Jine colaboradores(2015), as proteínas do envelope, mais especificamente E1 e E2, parecem ser imunodominantes durante a montagem da resposta(JIN *et al.*, 2015; VAN DEN DOEL *et al.*, 2014; YATHI *et al.*, 2011).

A proteína E1 de CHIKV é constituída de 435 aminoácidos (45 kDa) que são, em grande parte cobertos por E2 no envelope viral (MURUGAN; SATHISHKUMAR, 2016). Por sua vez, a proteína E2 possui 423 aminoácidos (aa) e consiste em três domínios do tipo imunoglobulina de conformações distintas: A, B e C(LI *et al.*, 2010)(Figura 3).

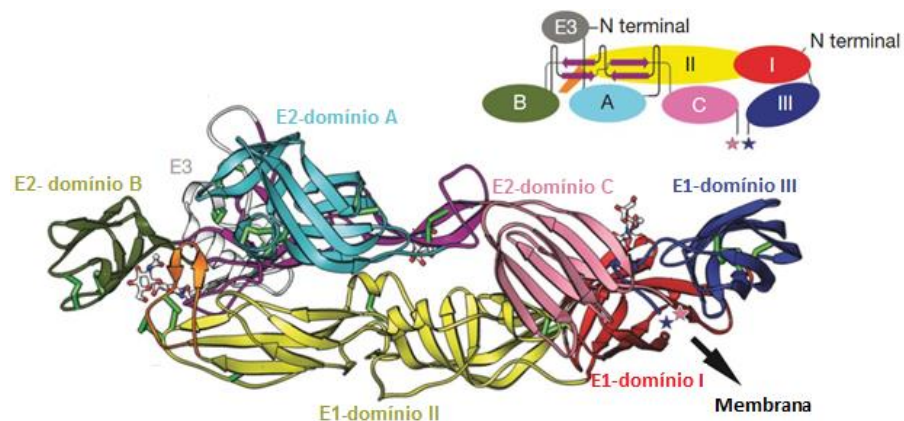


Figura 3 - Diagrama do complexo formado pelas proteínas do envelope do CHIKV. Domínios I, II e III de E1 são mostrados em vermelho, amarelo e azul-escuro, respectivamente. Domínio A, B e C de E2 são mostrados em turquesa, verde e cor-de-rosa e E3 em cinza(VOSS *et al.*, 2010).

De acordo com Sun e colaboradores (2013), uma mutação adaptativa na proteína E1 (E1-A226V) permitiu que o CHIKV se multiplicasse de forma mais eficiente em *Aedes albopictus*, sendo considerado a principal razão para a sua recente disseminação extensiva, infectando milhões de pessoas na África e Ásia (TSETSARKIN *et al.*, 2014).

1.1.3 Febre Chikungunya

Após a picada do mosquito, a disseminação viral ocorre por vasos linfáticos e sanguíneos. Devido a sua ampla distribuição entre os órgãos e tecidos, e sua capacidade de migração pelos sistemas linfático e sanguíneo, acredita-se que os monócitos (considerados sítios primários) são os maiores responsáveis pela disseminação do vírus e pela infecção sistêmica. Os principais sítios de infecção secundária são os músculos e as articulações, assim como as células endoteliais do fígado e o cérebro, podendo levar à hepatite e encefalopatia (ROUGERON *et al.*, 2015).

A transmissão do vírus é seguida por um período de incubação médio de 3 a 7 dias (variação de 1-12 dias), apresentando então, em cerca de 80% dos casos, febre alta, calafrios, artrite e mialgia graves, comumente acompanhadas de dores de cabeça e fotofobia (QUEYRIAUX, 2008). Outros sintomas da febre Chikungunya que podem ocorrer são: conjuntivite, náuseas, vômitos e erupções máculo-papulares. Complicações mais raras podem incluir uveíte, retinite, miocardite, hepatite, nefrite, lesões de pele, hemorragia, meningoencefalite, mielite, síndrome de Guillain-Barré e paralisia do nervo craniano. Os exames clínico-laboratoriais podem indicar linfopenia, trombocitopenia, além de elevadas taxas de creatinina e transaminases hepáticas (SCHWARTZ; ALBERT, 2010).

Os sintomas em geral desaparecem após 7-10 dias, mas existe a possibilidade de um estágio crônico. Neste caso, há relatos de pacientes que apresentaram sintomas que persistiram por três meses a até 15 anos após a fase aguda da infecção (MARTI-CARVAJAL *et al.*, 2017). Em alguns casos foram descritas complicações neurológicas, cardiovasculares, hepáticas, renais e oculares (ECONOMOPOULOU *et al.*, 2009). Estudos relataram manifestações reumáticas em até 50% dos pacientes adultos (durando de 6 meses a 1 ano) que

consistiram, geralmente, em artrites afetando extremidades como tornozelos, pulsos e falanges) (NG, 2017). No Brasil, um estudo acompanhou 22 pacientes diagnosticados com febre Chikungunya com sinais de envolvimento neurológico. Foram destacados níveis de consciência alterados em quase metade dos pacientes, além de convulsões epiléticas e delírios persecutórios (LIMA MARTINS; BERNARDINO, 2016).

A epidemia de CHIKV na Ilha *Réunion* forneceu a primeira evidência de morte em adultos, no contexto de condições médicas do paciente (doenças cardiovasculares, neurológicas e respiratórias) (NG, 2017). A taxa de letalidade da febre Chikungunya foi estimada em 1:1000, sendo que a maioria das mortes ocorreu em casos de recém-nascidos, idosos e adultos apresentando comorbidades, tais como hipertensão, diabetes ou doença cardiovascular (SCHWARTZ; ALBERT, 2010). Ainda durante este surto na Ilha *Réunion*, foi registrado um aumento de 22% de casos da síndrome de Guillain-Barré (GBS) (Lebrun *et al.*, 2009). Este fenômeno também foi observado na epidemia que ocorreu na Polinésia Francesa durante os anos 2014-2015²(OEHLER *et al.*, 2015). Durante esta mesma epidemia, constatou-se a transmissão vertical do CHIKV, causando encefalopatias em recém-nascidos, sendo atribuída a nove casos(GERARDIN *et al.*, 2008).

Consequências neurocognitivas também foram identificadas em neonatos expostos ao CHIKV, causando atrasos no desenvolvimento neurológico, paralisias cerebrais e microcefalia (GÉRARDIN *et al.*, 2014). Torres e colaboradores acompanharam 169 recém-nascidos sintomáticos com febre Chikungunya em três diferentes países da América Latina. As complicações graves incluíram meningoencefalia, miocardite, convulsões e insuficiência respiratória(TORRES *et al.*, 2016). Infecções por CHIKV podem apresentar impactos clínicos e econômicos substanciais, associados, principalmente, a complicações a longo prazo. A Febre Chikungunya foi a arbovirose que apresentou o maior número de anos de vida perdidos por incapacidade, denominados “anos de vida ajustados por incapacidade”, ou AVAI. O custo anual total com o manejo das arboviroses no Brasil foi da ordem de

²Ressalta-se que este foi o segundo surto de GBS desencadeado por um arbovírus na Polinésia Francesa dentro de dois anos, sendo que o primeiro ocorreu durante o surto da febre Zika, de 2013 a 2014 (OEHLER *et al.*, 2015).

R\$ 2,3 bilhões (2% do orçamento total previsto para a saúde no mesmo ano), sendo que Minas Gerais foi um dos quatro estados que apresentou os maiores gastos (TEICH; ARINELLI; FAHHAM, 2017).

Não existe tratamento específico nem vacinas disponíveis para infecções por CHIKV. Recomenda-se, em casos sintomáticos, o uso de paracetamol ou dipirona para o controle da febre e manejo da dor. O uso de ácido acetil salicílico (AAS) é contraindicado devido ao risco de hemorragia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

1.2 BIOLOGIA E PATOGENIA DO ZIKA VIRUS (ZIKV)

O ZIKV pertence à família *Flaviviridae*, que possui três gêneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus*. O gênero *Flavivirus*, ao qual pertence o ZIKV, contém mais de 70 vírus, incluindo: *Dengue virus* (DENV), *Japanese encephalitis virus* (JEV), *Tick-borne encephalitis virus* (TBEV), *West Nile virus* (WNV) e *Yellow fever virus* (YFV). Dentro do gênero, estes vírus podem ainda ser subdivididos em complexos antigênicos de acordo com critérios sorológicos, ou em grupos, clados ou espécies com base na filogenética molecular (KUNO *et al.*, 1998).

1.2.2 Genoma e estrutura do ZIKV

Os flavivírus são vírus de genoma composto por RNA de fita simples e orientação positiva, envelopados por uma bicamada lipídica derivada do hospedeiro e rodeados por 180 cópias de duas glicoproteínas (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005). O genoma possui uma fase aberta de leitura (ORF) que codifica uma única poliproteína. A porção 5' inicial do genoma codifica três proteínas estruturais – nucleocapsídeo (c), membrana (M, expressa como prM, precursora de M) e envelope (E). Sete proteínas não estruturais (NS) são codificadas pela porção remanescente (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) participando na replicação viral, montagem do vírus e modulação da resposta imunológica do hospedeiro. O ZIKV possui um genoma de aproximadamente 11kb, com um *cap* na extremidade 5' e não possui cauda poli-A (LINDENBACH, 2007) (Figura 4).

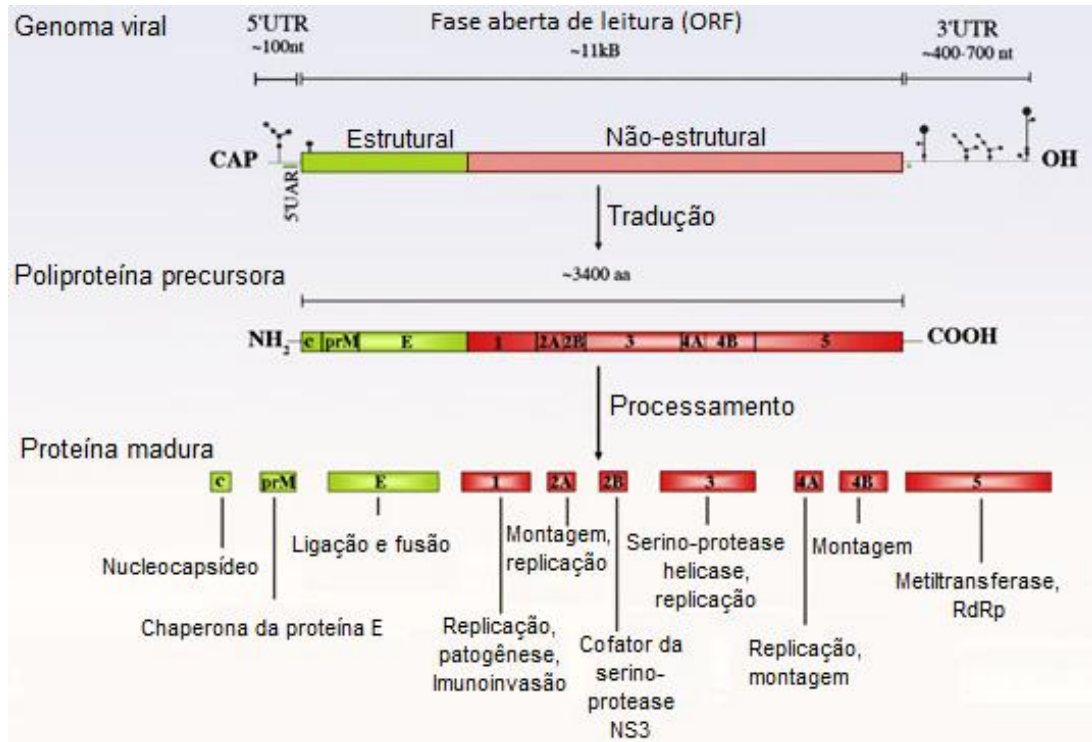


Figura 4 - Organização genômica dos flavivírus e função das proteínas virais. A única fase aberta de leitura codifica uma poliproteína precursora que é co- e pós-traducionalmente clivada em três proteínas estruturais (verde) e sete proteínas não-estruturais (vermelho). Na figura são indicadas estruturas secundárias e terciárias do RNA entre as regiões 5'UTR e 3'UTR, não traduzidas. aa, aminoácidos; C, proteína do nucleocapsídeo; C, Sequência de Cristalização; E, envelope; M, membrana; RdRp, RNA-dependente de RNA-polimerase; VR, região variável. Adaptado (FERNANDEZ-GARCIA *et al.*, 2009).

Em relação à estrutura, os flavivírus são envelopados, possuem morfologia esférica e aproximadamente 50nm de diâmetro (Figura 5). Suas proteínas de superfície (M e E) são arranjadas de maneira que conferem uma simetria icosaédrica à partícula viral, consistindo de 60 unidades de repetição (KOSTYUCHENKO *et al.*, 2016).

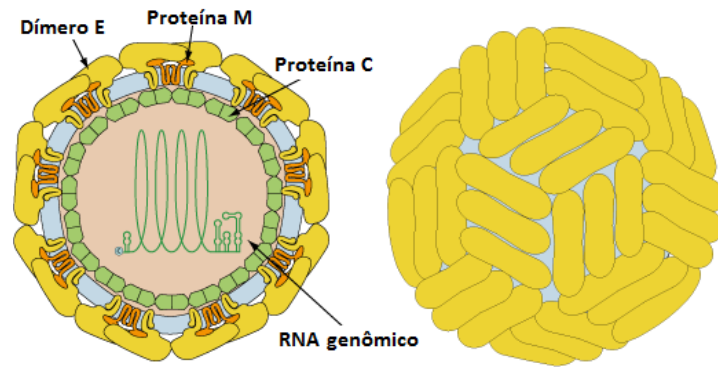


Figura 5 - Esquema estrutural de um flavivírus. Os flavivírus são envelopados, possuem morfologia esférica e aproximadamente 50nm de diâmetro. As proteínas de superfície (M e E) são dispostas em simetria icosaédrica. Fonte: Viralzone (2016).

A proteína E do ZIKV é a principal proteína envolvida na interação da partícula viral com os receptores celulares e na fusão das membranas. A porção externa da proteína E contém três domínios: DI, responsável pelas alterações conformacionais necessárias para a entrada viral e que atua como uma ponte entre DII e DIII; DII, que contém um laço de fusão (*fusion loop*) que interage com a membrana endossomal; e DIII, que aparentemente, está envolvido na ligação a receptores celulares. A extremidade carboxi-terminal do ectodomínio de E é a região da haste α -helicoidal que se encontra inserido na membrana viral (KOSTYUCHENKO *et al.*, 2016)(Figura 6).

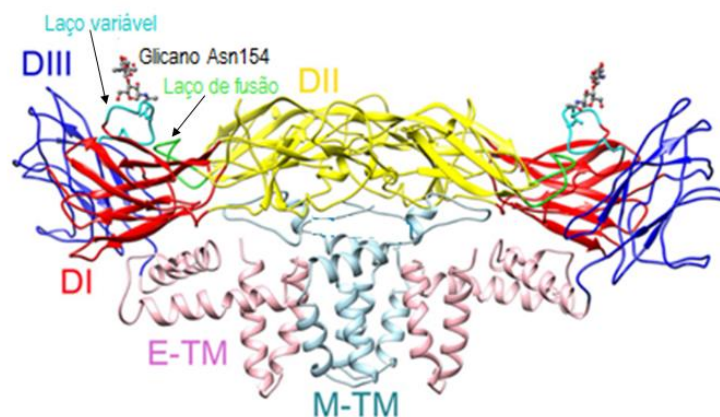


Figura 6 - Dímero da proteína E do ZIKV em forma de fita. As cores são de acordo com os domínios: domínio I (vermelho), domínio II (amarelo) e de domínio III (azul). Os laços de fusão, glicanos Asn154 e os laços variáveis são destacados. Domínios E e M transmembranares são mostrados em rosa e azul claro, respectivamente. Adaptado (SIROHI *et al.*, 2016).

1.2.3 Febre Zika

Aproximadamente 80% das infecções causadas pelo ZIKV são assintomáticas. Quando presentes, os sintomas mais comuns são manchas na pele (ou *rash*) maculopapulares (pruriginosas ou não) (90%), febre baixa (65%), artralgias - dores nas articulações(65%), conjuntivite não purulenta (55%), mialgias - dores musculares (48%), cefaleia e dor retro-orbital (39%) (CHANG *et al.*, 2016; VOROU, 2016). Existem ainda sintomas adicionais e raramente observados como náuseas, diarreia, ulceração da mucosa, dor abdominal, prurido e trombocitopenia (ZAMMARCHI *et al.*, 2015). Com exceção de fetos e recém-nascidos, manifestações severas e letalidade em decorrência do ZIKV são geralmente baixas. Os sintomas da febre Zika passam geralmente de 2 a 7 dias (SHANKAR *et al.*, 2017).

A capacidade de vários membros da família *Flaviviridae* de causar sérios danos neurológicos devido às habilidades de neuroinvasão e neurovirulência já foram registrados (SIPSE *et al.*, 2012). Em se tratando de recém-nascidos cujas mães foram infectadas pelo ZIKV, o conjunto de sintomas decorrentes é denominado Síndrome Congênita do Vírus Zika (SCVZ)(MELO *et al.*, 2016). De acordo com Calvet e colaboradores, a microcefalia é a característica clínica mais relatada em suspeitas da SCVZ, e está entre os mais graves e irreversíveis danos neurológicos causados por infecção pelo ZIKV(CALVET *et al.*, 2016). A microcefalia é caracterizada por uma redução do perímetro cefálico, sendo que esta condição ocorre devido a um desenvolvimento inadequado e/ou destruição das células neurais. Em contrapartida, embora a microcefalia tenha sido amplamente evidenciada em relação à infecção por ZIKV, no estudo de Brasil e colaboradores envolvendo 117 recém-nascidos expostos ao ZIKV, foi ressaltado que outras ocorrências como calcificações cerebrais e restrição do crescimento fetal foram mais frequentemente detectadas(BRASIL *et al.*, 2016).

Melo e colaboradores concluíram que a microcefalia é apenas um dos sinais clínicos da SCVZ. E, tal como acontece com outras infecções intrauterinas, é possível que os casos notificados de microcefalia representem apenas as crianças mais gravemente afetadas e, que os recém-nascidos com consequências menos aparente

- que podem afetar não apenas o perímetro cerebral, mas também outros órgãos -, ainda não foram diagnosticados (MELO *et al.*, 2016; OLIVEIRA MELO *et al.*, 2016).

Em adultos, a infecção por ZIKV tem sido relacionada à GBS (CAO-LORMEAU *et al.*, 2016; DIRLIKOV *et al.*, 2017; DO ROSÁRIO *et al.*, 2016; DOS SANTOS *et al.*, 2016), embora uma associação linear ainda não tenha sido observada (ATIF *et al.*, 2016). A GBS é uma polirradiculoneuropatia que pode ser causada por infecções, muitas das quais envolvem flavivírus (LEIS; STOKIC, 2016) e outros arbovírus tais como CHIKV (LEBRUN *et al.*, 2009). A GBS é caracterizada por parestesia na extremidade de membros superiores e inferiores, fraqueza muscular ascendente e paralisia, que pode evoluir para distúrbios respiratórios e de deglutição e eventualmente, morte (OEHLER *et al.*, 2015). Clinicamente, a GBS predominou entre as regiões afetadas pela epidemia do ZIKV, mas o espectro de doenças neurológicas nos adultos aparece mais amplo, pois casos de encefalopatia, encefalite, meningite, mielite e convulsões também foram relatados (MUNOZ-JORDAN, 2017).

1.3 RESPOSTA IMUNE CONTRA OS ARBOVÍRUS

A resposta imune inata contra os vírus é caracterizada pela ação dos macrófagos, células dendríticas (DCs) e células exterminadoras naturais, também conhecidas como “*natural killers*”(NKs). A mesma é seguida pela ativação dos linfócitos B e T que são mediadores da resposta imune adaptativa. A geração subsequente de células de memória leva a uma resposta específica à infecção viral e protege contra reinfecção. No contexto deste trabalho é importante abordar a resposta adaptativa humoral, uma vez que a realização do diagnóstico sorológico é dependente da geração de anticorpos específicos contra essas infecções.

1.3.1 Resposta adaptativa ao CHIKV

Camundongos *knockout* de células B apresentaram doença mais grave e viremia persistente (por mais de um ano) destacando a importância dessas células produtoras de anticorpos para eliminação do CHIKV (Lum *et al.*, 2013). Um experimento com camundongos Rag1 - / - (sem células B e T), demonstrou que a administração profilática de anticorpos monoclonais anti-CHIKV foi suficiente para prevenir a persistência do vírus (Hawman *et al.*, 2013). Além disso, a administração

terapêutica de um anticorpo monoclonal neutralizante humano em macacos *rhesus* nos dias 1 e 3 após a infecção por CHIKV bloqueou a disseminação do vírus e a inflamação em vários tecidos, incluindo articulações e músculos (Broeckel *et al.*, 2017). Em humanos, anticorpos do tipo IgG anti-CHIKV são detectados pela primeira vez no estágio de convalescença inicial, e o aparecimento desses anticorpos se correlaciona com a proteção contra complicações da doença crônica (Kam *et al.*, 2012b).

Pacientes infectados pelo CHIKV desenvolvem anticorpos neutralizantes e não neutralizantes (IgM e IgG) contra diversas proteínas virais, mas as proteínas do envelope, e mais especificamente E1 e E2, parecem ser imunodominantes durante a montagem da resposta (JIN *et al.*, 2015), sendo, portanto, estrategicamente importantes para o diagnóstico sorológico dessas infecções (DAI *et al.*, 2016; LINDENBACH, 2007; SILVA; DERMODY, 2017).

Tanto em humanos quanto em camundongos, a resposta imunológica mediada por anticorpos parece ter como alvo principal a glicoproteína do envelope E2 de CHIKV (Kam *et al.*, 2012a; Smith *et al.*, 2015; Weber *et al.*, 2015; Weger-Lucarelli *et al.*, 2015). Além disso, a maioria (70-80%) dos anticorpos são dirigidos contra o epítipo linear (E2EP3) na porção N-terminal da E2. Conseqüentemente, a infecção por CHIKV em camundongos imunizados com peptídeos E2EP3 apresentou redução na taxa de infectividade e melhores resultados clínicos com diminuição da viremia e da inflamação das articulações (TANABE *et al.*, 2018). Em amostras de plasma de pacientes em estágios de convalescença e recuperação, anticorpos anti-E2 também demonstraram ser os mais persistentes –sendo detectados 21 meses após a infecção, ao contrário dos anticorpos anti-E3, anti-capsídeo e anti-nsP3 que foram detectados apenas durante o curso da doença (Kam *et al.*, 2012a). De acordo com o mapeamento de epítipos feito por Fong e colaboradores, anticorpos monoclonais produzidos apenas contra os epítipos nas superfícies externas (e não voltados para o interior da estrutura do trímero E2 / E1) foram neutralizantes (Fong *et al.*, 2014).

O papel dos anticorpos anti-CHIKV específicos também foi estudado na imunopatologia da doença. Peptídeos da glicoproteína E1 de CHIKV foram identificados por análise de bioinformática *in silico* e apresentaram semelhanças com proteínas humanas. Esses peptídeos foram reconhecidos por soros de pacientes

infectados com CHIKV e foram capazes de induzir a inflamação muscular em camundongos, demonstrando que o mimetismo molecular entre o vírus e as proteínas do hospedeiro contribui para a patologia do CHIKV (Reddy *et al.*, 2017).

Muitos estudos têm analisado a interação de anticorpos com Alphavirus e indicaram que a maioria dos anticorpos neutralizantes se ligam a E2, uma vez que esta proteína é mais exposta na superfície viral do que E1 (revisto por LI *et al.*, 2010). Verma e colaboradores avaliaram o potencial antigênico de peptídeos derivados de E1, E2 e E3 e concluiu que a proteína E2 é a mais promissora para propósitos de diagnóstico, uma vez que peptídeos derivados da mesma apresentaram maior sororeatividade em ELISA quando comparados a peptídeos derivados de E1 e E3 (VERMA *et al.*, 2014). Estudos também demonstraram que a proteína E2 é o único antígeno que apresenta reatividade contra anticorpos do tipo IgG no início da fase de convalescença, enquanto outros antígenos, incluindo E1 e proteína do capsídeo foram detectados em vários níveis e em estágios posteriores da doença (KOWALZIK *et al.*, 2008; NAYAK *et al.*, 2020).

Essa diferença sororeatividade contra os antígenos do envelope do CHIKV pode ser explicada pelo fato de que E2 é a proteína mais externa, enquanto as outras tem menos chance de exposição ao sistema imunológico do hospedeiro (CHO *et al.*, 2008; SHARP *et al.*, 2006).

A proteína E1 já havia sido obtida pelo nosso grupo anteriormente (BAGNO *et al.*, 2018). Porém, a mesma apresentou baixos níveis de expressão (em sistema procarioto) e um menor potencial antigênico em ELISA quando comparada a E2. Por essas razões, a proteína E2 foi o antígeno selecionado para este estudo.

1.3.2 Resposta adaptativa ao ZIKV

Após a infecção pelo ZIKV, anticorpos específicos contra o vírus podem aparecer no sangue de dois a três dias após o início dos sintomas (LAI *et al.*, 2018; LANCIOTTI *et al.*, 2008). O aumento nos títulos de anticorpos séricos específicos contra o ZIKV após a infecção é causado pela indução de plasmablastos (PRIYAMVADA *et al.*, 2017; YU *et al.*, 2017), um subconjunto de células B secretoras de anticorpos que aparece no sangue periférico após a exposição ao

antígeno. Lai e colaboradores demonstraram que estas células secretam imunoglobulina específica de ZIKV do tipo IgM, IgG e IgA e tornam-se virtualmente indetectáveis na circulação 20 dias após o início da infecção(LAI *et al.*, 2018).

A proteína E engloba os epítomos dominantes da resposta humoral, além de ser o antígeno mais abundante na superfície da partícula viral (ROTHMAN *et al.*, 2004) e o principal alvo de anticorpos neutralizantes(ANDRADE; HARRIS, 2018). Anticorpos neutralizantes humanos contra diferentes epítomos de proteína E já foram descritos, sendo que anticorpos contra o domínio III (EDIII) estão entre os neutralizadores mais potentes dos flavivírus (ROBBIANI *et al.*, 2017; SCREATON *et al.*, 2015).

Outras proteínas, como a proteína M e as não-estruturais, também induzem a produção de anticorpos. Alguns trabalhos já demonstraram que a infecção por flavivírus pode ser bloqueada por anticorpos que inibem as interações entre as partículas virais e os receptores celulares durante o processo de adsorção (PIERSON *et al.*, 2007), ou impedindo mudanças conformacionais durante a fusão (STIASNY *et al.*, 2007).

Enquanto a proteína E dos flavivírus interage com os receptores celulares e é o principal alvo de neutralização de anticorpos, a proteína não estrutural 1 (NS1) é secretada por células infectadas e está envolvido com o processo de evasão e patogênese. Ao ser secretada por células infectadas, a NS1 pode ser encontrada na circulação sanguínea durante a fase aguda da doença, sendo considerada um bom biomarcador para o diagnóstico precoce da infecção(MULLER; YOUNG, 2013). ELISA de captura e testes do tipo *point of care* foram desenvolvidos para DENV baseados na detecção do antígeno NS1(ALCON *et al.*, 2002; CHAIYARATANA *et al.*, 2009; LIBRATY *et al.*, 2002; ZAINAH *et al.*, 2009).Estudos mais recentes mostraram que a detecção de NS1 também pode ser aplicável ao diagnóstico de infecções por outros flavivírus, incluindo o ZIKV(ANDREATA-SANTOS *et al.*, 2020; LEE; ZENG, 2017; STETTLER *et al.*, 2016a).

1.4 DIAGNÓSTICO DAS INFECÇÕES POR CHIKV

Uma variedade de ferramentas laboratoriais, incluindo métodos virológicos, genéticos e sorológicos podem ser utilizados no diagnóstico de infecções por CHIKV.

A escolha do método depende principalmente do momento da coleta da amostra (An *et al.*, 2017).

O diagnóstico laboratorial de infecções por CHIKV geralmente é realizado a partir de amostras de soro ou plasma para detectar o vírus, ácido nucleico viral, imunoglobulinas e anticorpos neutralizantes. Técnicas de cultivo podem detectar o CHIKV nos primeiros 3 dias após o surgimento dos sintomas (Schwartz & Albert, 2010). O diagnóstico pelo isolamento do vírus é altamente específico (100%), mas não sensível o suficiente. Também é limitado pela exigência de laboratórios de biossegurança de nível 3, equipe altamente treinada e tempo necessário de 1-2 semanas. Assim sendo, não é rotineiramente utilizado (Panning *et al.*, 2008; revisto por An *et al.*, 2017; Ministério da Saúde, 2017).

Durante os primeiros 8 dias de infecção, o RNA viral pode ser identificado no soro, sendo que o período de maior viremia vai do 1º ao 5º dia (Ministério da Saúde, 2017). Vários métodos de RT-PCR estão disponíveis e foram descritos na literatura, mas são de sensibilidade variável (Laurent *et al.*, 2007; Santhosh *et al.*, 2007; Joseph *et al.*, 2008; Panning *et al.*, 2009; Cecilia *et al.*, 2015; Johnson *et al.*, 2016) podendo chegar a 100%.

Os testes de RT-PCR de amostras clínicas também podem ser utilizados para genotipagem, permitindo comparações com amostras de vírus de várias fontes geográficas. Embora a detecção de RNA viral seja útil para a identificação rápida do vírus infeccioso, essa técnica é limitada pela estreita janela de detecção. Assim, amostras coletadas durante a primeira semana após o início dos sintomas devem ser testadas por métodos sorológicos e virológicos (WHO, 2017).

Uma semana após o aparecimento dos primeiros sintomas, a viremia é controlada pelo sistema imunológico do hospedeiro. Normalmente, os anticorpos contra o vírus são detectados a partir do final da primeira semana (CDC, 2017). Neste estágio, o diagnóstico do CHIKV é possível pela detecção específica de IgM e IgG, a partir de testes sorológicos, tais como o ELISA. Imunoglobulinas do tipo IgM são detectáveis de 5-7 dias após o início da infecção, sendo mais elevadas no período de 3 a 5 semanas e persistem por cerca de 2 meses. A detecção de IgG pode ocorrer de 7-10 dias após o início da infecção (normalmente após o fim da viremia) e permanecendo por meses ou anos (Johnson *et al.*, 2016; Silva e Dermody, 2017).

O Ministério da Saúde recomenda a investigação por sorologia a partir do quinto dia para IgM e sexto dia para IgG. Uma outra estratégia de confirmação é a sorologia pareada. Neste caso, duas amostras devem ser coletadas, uma na fase aguda e outra, 15 dias após a primeira coleta. A reatividade específica é constatada por um aumento de 4 vezes no título dos anticorpos (Ministério da Saúde, 2017).

Um teste ideal para infecções de CHIKV em fase aguda é uma combinação de métodos genéticos com outros métodos de diagnóstico que funcionam após o período de viremia. No algoritmo de teste desenvolvido pelo CDC (EUA), amostras coletadas dentro de 6 dias após o início dos sintomas são testadas com RT-PCR inicialmente. As amostras que foram coletadas mais tarde e aquelas que apresentaram resultados negativos para o RT-PCR são testadas com ELISA de captura de IgM (MAC-ELISA) (Johnson *et al.*, 2016).

1.5 DIAGNÓSTICO DAS INFECÇÕES POR ZIKV

Ainda que os testes de indivíduos sintomáticos forneçam informações úteis para identificar casos positivos, assim como alertar comunidades e fortalecer sistemas de vigilância, a necessidade de detecção do ZIKV não se limita a infecções sintomáticas. Grande parte dos indivíduos infectados com o ZIKV são assintomáticos e, devido ao risco de anormalidades congênitas associadas à infecção por ZIKV (Rather *et al.*, 2017) e a viremia prolongada em mulheres grávidas (Meaney-Delman *et al.*, 2016) destaca-se a relevância dos algoritmos de teste para grupos de indivíduos assintomáticos.

Para as pessoas com suspeita de Zika um resultado positivo de uma qRT-PCR confirma a presença do ZIKV, mas um resultado negativo não exclui a possibilidade de infecção (Rabe *et al.*, 2016). Nesses casos, ELISA e o Teste de neutralização por redução de placa (PRNT, do inglês *Plaque Reduction Neutralization Test*) podem identificar infecções recentes por ZIKV (CDC, 2016b). Entretanto, testes sorológicos envolvendo o ZIKV podem ser difíceis de interpretar devido a reatividade cruzada com outros flavivírus, o que pode impedir a identificação específica do vírus causador da infecção (Lanciotti *et al.*, 2008). Isso ocorre principalmente quando a pessoa foi infectada anteriormente por um flavivírus ou mesmo foi vacinada contra

vírus da mesma família para os quais há vacinas disponíveis, como é o caso da febre amarela, gerando um problema em relação ao manejo clínico (Keasey *et al.*, 2017; Munoz-Jordan, 2017).

Orientações do CDC recomendam o teste de mulheres grávidas com possível exposição ao ZIKV (sendo necessário o monitoramento durante 12 semanas após viagens a regiões epidêmicas), e de todas as pessoas sintomáticas e com suspeita de exposição. Para pessoas sintomáticas infectadas pelo ZIKV, o RNA viral pode ser detectado precocemente por técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (NAT, do inglês *Nucleic Acid Test*) que inclui métodos baseados na técnica de PCR. Neste caso, amostras de soro e urina podem ser utilizadas.

Como o período virêmico do ZIKV é limitado, o CDC recomenda que os testes de ácido nucleico sejam realizados até 14 dias após o aparecimento dos sintomas, tanto para amostras de urina quanto de soro (revisto por Tran & Theel, 2018).

O Ministério da Saúde (2016b) recomenda os seguintes critérios para a vigilância laboratorial do ZIKV:

- Testar amostras de todas as gestantes com suspeita de infecção por ZIKV, óbitos com suspeita de serem decorrentes da infecção, e pacientes internados com manifestação neurológica, com suspeita de infecção viral prévia (ZIKV, DENV e CHIKV);
- A coleta de amostra para realização de isolamento viral ou RT-PCR deverá ser realizada de acordo com os seguintes critérios:
 - Soro: até 5 dias do início dos primeiros sintomas (fase aguda).
 - Urina: até 8 dias do início dos primeiros sintomas.
- Para sorologia IgM devem ser colhidas duas amostras de soro, uma na fase aguda (3 a 5 dias após o início dos sintomas) e outra na fase convalescente da doença (3 a 4 semanas após a 1ª coleta).

O Sistema Único de Saúde (SUS) oferece o diagnóstico laboratorial para a febre Zika somente para gestantes, crianças de até três anos de idade ou pacientes com manifestação neurológica, sendo que, para os demais casos o diagnóstico é baseado apenas nos sintomas (critério clínico-epidemiológico), que como descrito anteriormente são, em sua maioria, ausentes.

1.6 PRODUTOS COMERCIAIS DISPONÍVEIS PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES POR ZIKV E CHIKV

Além dos testes que o CDC oferece, existem algumas empresas privadas que comercializam produtos para diagnóstico de CHIKV (Quadro 2) e ZIKV (Quadro 3), incluindo ELISA, testes rápidos imunocromatográficos (TR) e imunofluorescência (IF).

Quadro 2- Testes sorológicos disponíveis para a detecção de infecções por CHIKV.

Tipo	Empresa	Nome	Sensibilidade	Especificidade
ELISA	Abcam (Alemanha)	^a Anti-CHIKV IgM human ELISA kit (captura)	96%-100%	97-100%
	IBL International (Alemanha)	IBL CHIK IgM micro-capture ELISA ^b	-	-
		IBL Chikungunya IgG capture ELISA ^b	-	-
	CTK Biotech (EUA/China)	RecombiLISA CHIK IgM test	12,5% (2/16)	-
	Genway (EUA)	CHIKV IgM μ -capture ELISA	0% (0/27)	-
		Chikungunya Virus IgG capture ELISA	-	-
	SD Diagnostics (Coreia do Sul)	CHIK IgM ELISA	39% (12/31)	85% (11/13)
	Euroimmun (Alemanha)	^a Anti-CHIKV ELISA (IgM)	Aguda: 4% Convalescente: 96,9% ^c	Aguda: 97,7% Convalescente: 90,5% ^c
		Anti-CHIKV ELISA (IgG)	96% ^e -100% ^d	82% ^d - 98% ^e
	Inbios (EUA)	^{a,b} CHIKjj Detect MAC-ELISA (captura)	Aguda: 10,3% Convalescente: 92,4% ^c	Aguda: 88,5% ^e Convalescente: 83,9% ^c
		CHIKjj Detect IgG ELISA	93% ^d	91% ^d
	Novatec (Alemanha)	NovaLisa® Chikungunya IgM μ -capture	-	-
		NovaLisa® Chikungunya IgG capture	-	-
	Diasorin (Itália)	Novagnost Chikungunya IgG	-	-
Mobius (Brasil)	X -Gen Chikungunya IgG	-	-	
Goyases (Brasil)	Chikungunya IgG	-	-	
TR	CTK Biotech (EUA/China)	On-site CHIK IgM Combo Rapid test	13% (3/23)	-
	SD Diagnostics (Coreia do Sul)	SD BIOLINE Chikungunya IgM	0% (0/24)	-
IF	Euroimmun (Alemanha)	^a Anti-CHIKV IIFT (IgM)	92-100%	92-100%

Abreviaturas: ELISA: Ensaio de Imunoabsorção Enzimática; TR: teste rápido imunocromatográfico, IF: imunofluorescência

^a Testes considerados recomendáveis pelo CDC (JOHNSON *et al.*, 2016) para CHIKV-IgM.

^b Uso recomendado apenas para pesquisa. O fabricante não recomenda o uso como procedimento de diagnóstico.

^c(KIKUTI *et al.*, 2020), ^d(DE SALAZAR *et al.*,2017), ^e(MENDOZA *et al.*,2019).

Johnson e colaboradores (2016) relataram ensaios de desempenho envolvendo nove dos 10 ensaios de detecção de IgM CHIKV disponíveis comercialmente. Estes testes foram avaliados em laboratórios de referência pelo CDC, sendo que apenas o *CHIKjj Detect MAC-ELISA*, da *Inbios*, o *MAC-ELISA* e o *Anti-CHIKV IIFT*, da *Euroimmun*, e o *MAC-ELISA*, da *Abcam*, apresentaram desempenho aceitável. Os demais, dois do tipo IFL e três do tipo MAC-ELISA, apresentaram baixa sensibilidade (<50%) e não foram considerados recomendáveis.

Kikuti e colaboradores avaliaram o desempenho dos produtos comercializados pelas empresas *Inbios* e *Euroimmun* para determinação de CHIKV-IgM, em soros de 372 pacientes que deram entrada num pronto-socorro público de Salvador (São Marcos Centro de Emergência, SMEC). As sensibilidades (em relação a PCR) do teste *Inbios* e *Euroimmun* para amostras agudas (no momento da internação) foram 4,0% e 10,3%, enquanto para amostras convalescentes (após 15 dias ou mais de internação) foram 92,4% e 96,9%, respectivamente. No geral, as especificidades (em relação a PCR) do *Inbios* IgM ELISA para as amostras agudas e de convalescença foram 97,7% e 90,5%, respectivamente, e as especificidades *Euroimmun* foram 88,5% e 83,9%, respectivamente.

A empresa coreana *SD Diagnostics* desenvolveu testes rápidos para serem utilizadas no diagnóstico da febre Chikungunya e estes são comercializados no Brasil em parceria com a empresa *Eco Diagnóstica* (Nova Lima-MG). No entanto, os testes da *SD Diagnostics* para CHIKV IgG/IgM e CHIKV IgM não foram aprovados pelo estudo de Johnson e colaboradores (2016).

Existem cinco produtos para detecção de IgG contra CHIKV por ELISA, registrados na ANVISA: *Chikungunya IgG* (*Euroimmun*), *NovaLisa Chikungunya Virus IgG captura ELISA* (*Argoslab*), *Novagnost Chikungunya IgG* (*Diasorin*), *Chikungunya IgG* (*Goyases*) e *X -Gen Chikungunya IgG* (*Mobius*) (ANVISA, 2020).

Poucos estudos foram publicados avaliando os produtos comerciais para detecção de anticorpos do tipo IgG anti-CHIKV. De Salazar avaliou os produtos dos fabricantes *Inbios* e *Euroimmun*, e relatou uma sensibilidade de 93% e 100% e especificidade de 91% e 82%, respectivamente (DE SALAZAR *et al.*, 2017).

Mendonza e colaboradores avaliaram os produtos da Euroimmun e Abcam, e encontraram especificidade de 98% de para o primeiro, 100% para o segundo e sensibilidade de 96% para ambos. O estudo ainda revelou uma reatividade cruzada de 5,9% do kit Euroimmun com amostras soropositivas para ZIKV e indicou variações de desempenho entre lotes do kit da Abcam (MENDOZA *et al.*, 2019).

Dentre os testes sorológicos comerciais disponíveis para ZIKV, os testes desenvolvido pela Euroimmun e InBios são os mais citados na literatura. Os produtos da Euroimmun, que utilizam a proteína NS1 do vírus para a detecção de IgM, IgG e IgA em amostras de soro, foram os primeiros testes sorológicos disponíveis comercialmente para detecção de ZIKV e têm sido amplamente avaliados (GRANGER *et al.*, 2017; KADKHODA; GRETCHEN; RACANO, 2017; L'HUILLIER *et al.*, 2017; THEEL *et al.*, 2020). Huzly e colaboradores relataram alta especificidade destes testes usando diferentes amostras de soro de pacientes com infecções anteriores por outros flavivírus (HUZLY *et al.*, 2016). Além disso, L'Huillier e colaboradores fizeram um estudo comparativo entre Euroimmun IgM e IgG e MAC-ELISA e subsequente PRNT para a confirmação de resultados positivos ou inconclusivos. Foi demonstrado que o teste combinado IgG / IgM da Euroimmun apresenta especificidade (95%), melhor que o MAC-ELISA, mas a sensibilidade foi significativamente inferior (39,5%) (L'HUILLIER *et al.*, 2017).

O produto da InBios (*ZIKV Detect 2.0 IgM Capture ELISA*) é um ensaio para detecção qualitativa de anticorpos IgM contra o ZIKV e utiliza a proteína E como antígeno. Este ensaio foi o primeiro teste sorológico a receber autorização da FDA para ser comercializado nos EUA. Estudos demonstraram que o mesmo fornece resultados de diagnóstico equivalentes aos do MAC-ELISA (CDC), exibindo alta sensibilidade (100%) (GRANGER; THEEL, 2019; SAFRONETZ *et al.*, 2017).

O teste *ADVIA Centaur Zika* foi o segundo produto que a FDA permitiu a comercialização nos EUA para detecção de anticorpos IgM anti- ZIKV. O terceiro e último teste autorizado foi o *LIAISON XL Zika Capture IgM II*. Anteriormente, esses testes só eram permitidos para uso de emergência. Um teste sorológico que ainda se encontra nesta situação é o *DPP Zika IgM Assay System* da Chembio (teste rápido) (FDA, 2018a).

No Brasil, a ANVISA também aprovou o registro de alguns desses testes comerciais para ampliar o acesso ao diagnóstico e permitir maior monitoramento da infecção por ZIKV. Atualmente, são 48 testes aprovados pela ANVISA, sendo 36 sorológicos, alguns dos quais são descritos no Quadro 3 (conforme citado na literatura). A maioria deles apresenta sensibilidade e especificidade elevadas. No entanto, esses testes geralmente não são validados usando amostras de mais de dois países ou regiões diferentes, limitando seu uso de forma universal devido às diferentes linhagens do ZIKV. No geral, esses ensaios têm boas perspectivas de uso em laboratórios de diagnóstico de rotina, desde que passem por uma sistemática avaliação clínica (SILVA *et al.*, 2020).

Testes rápidos para diagnóstico de arboviroses produzidos pela Bahia Farma foram registrados na Anvisa em 2016 e vinham sendo distribuídos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) por todo o País desde aquele ano (Mendes & Maciel, 2016). Mais tarde, em 2019, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) reprovou os testes rápidos para ZIKV, DENV e CHIKV produzidos pela Bahia Farma, que tinham sido comprados pelo Ministério da Saúde. Os lotes foram enviados para a análise que apontou baixa acurácia dos testes e o produto foi recolhido do mercado como medida cautelar adotada pela ANVISA (ANVISA, 2019).

Quadro 3-Testes sorológicos disponíveis para a detecção de infecções por ZIKV.

Tipo	Empresa	Nome	Antígeno	Sensibilidade	Especificidade
ELISA	CTK Biotech (EUA)	RecombILISA Zika IgM ELISA Kit	NS1	94,7%	98,5%
	DIA.PRO Diagnostic Bioprobes Srl (Itália)	ZIKV IgM ELISA kit	-	IgM: 69% IgG: 80%	IgM: 96% IgM: 94%
	Vircell S. L. (Espanha)	Zika ELISA IgM/IgG	-	IgM and IgG: 91%	IgM and IgG: 99%
	Euroimmun (Alemanha)	Anti-Zika virus ELISA IgM/IgG	-	IgM: 87% IgG: 100%	IgM and IgG: 97%
	NovaTec Immunodiagnostica GmbH (Alemanha)	NovaLisa Zika Virus IgM μ -capture	NS1	98,5%	100%
	Roche Diagnostics (Suíça)	Elecsys® Zika IgG	NS1	93%	100%
	SD Biosensor (Coreia do Sul)	STANDARD E Zika IgM	-	100%	-
	Mbiolog Diagnostic (Brasil)	Allserum Zika IgM	NS1	100%	94,4%
	Mobius Life Science (Brasil)	Kit Xgen Zika Virus IgG/IgM	NS1	IgG: 100% IgM: 98%	IgG: 98% IgM: 98%
TR	Chembio Diagnostic Systems (EUA)	DPP Zika IgM/IgG Assay System	-	IgM: 89,5% IgG: 97,5%	IgM: 97,7% IgG: 98,3%
	SD Biosensor (Coreia do Sul)	STANDARD Q Zika IgM/IgG	-	IgM: 98% IgG: 75,9%	IgM: 100% IgG: 70%
	Ebram Laboratory Products (Brasil)	Zika IgG/IgM	-	99,9%	98,9%
	Wama Laboratory Products (Brasil)	Imuno-Rapid Zika IgG/IgM	ZIKV inativado	96,2%	IgG: 99,1% IgM: 98,2%
	Orangelife Commerce and Industry (Brasil)	OL Zika Ag NS1	NS1	90,2%	99,5%
		OL Zika IgM/IgG	E	IgM: 93% IgG: 94%	IgM: 97% IgG: 98%
	Diagnostic Industry and Commerce (Brasil)	Zika IgG/IgM Rapid Test			
Eco Diagnostic Ltda (China/Brasil)	ECO F Zika IgG/IgM	E	98%	99%	
IF	Eco Diagnostic Ltda (China/Brasil)	ECO F Zika IgG/IgM	NS1	98%	99%
		ECO F Zika IgG/IgM	E	97%	97%
	Euroimmun (Alemanha)	IIFT Arboviral Fever Mosaic 2 IgM/IgG	Células infectadas	IgM: 96,9% IgG: 96,8%	IgM: 98,1% IgG: 93,4%
MCLIA	DiaSorin (Itália)	LIAISON XL Zika Capture IgM Assay	NS1	100%	91%

MCLIA: Quimioluminescência magnética
Adaptado de Silva *et al.* (2020).

1.7 PRODUÇÃO HETERÓLOGA EM SISTEMA PROCARIOTO E ANTÍGENOS DE CHIKV E ZIKV COM POTENCIAL PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

A expressão de genes heterólogos em bactérias é comumente usada tanto para fins comerciais como para pesquisa. A bactéria *Escherichia coli* é o hospedeiro mais comum para a produção de proteínas recombinantes. O principal desafio para a produção de proteínas em larga escala utilizando sistema procarioto é alcançar uma alta produtividade da proteína alvo com uma atividade biológica (GILEADI, 2017).

Os sistemas procariotos têm a vantagem de serem simples, rápidos e de baixo custo (GUO *et al.*, 2013). No entanto, tais sistemas, em sua maioria, não são capazes de produzir proteínas de forma solúvel, podendo resultar na formação de agregados conhecidos como corpúsculos de inclusão (ROSANO; CECCARELLI, 2014). Apenas pouco mais de 20% dos genes heterólogos expressos em *E. coli* originam proteínas solúveis ou corretamente dobradas (WALDO *et al.*, 1999), além de não possuir maquinaria para modificações pós-traducionais (como glicosilação, por exemplo), importantes para a dobragem correta da proteína (NIGI; FAIRALL; SCHWABE, 2017).

As melhorias das técnicas de cultivo e da manipulação da fisiologia de células bacterianas são cruciais para a obtenção de uma proteína de alto rendimento. O nível de expressão da proteína recombinante produzida em *E. coli* depende de vários parâmetros, tais como temperatura, tempo de indução e concentração do indutor. Estes parâmetros podem ser otimizados em pequena escala e, em seguida, aplicado a grande escala a produção de proteína (HUANG; LIN; YANG, 2012).

Tripathi e colaboradores relataram a utilização da linhagem BL21 (DE3) de *E. coli* para expressar a proteína E2 recombinante do CHIKV. Neste estudo, a proteína foi obtida a partir de corpúsculos de inclusão, solubilizada em ureia e purificada por cromatografia de afinidade. Esta proteína foi posteriormente empregada em ensaios de ELISA de captura de (IgM) apresentando sensibilidade de 92% e especificidade de 100% (TRIPATHI *et al.*, 2014).

Fumegalli e colaboradores também expressaram uma proteína similar (44 kDa), baseada na sequência de E2 em *E. coli*. Este antígeno foi utilizado em ensaios de ELISA para detecção de IgG e apresentou 89,7% de sensibilidade e 100% de especificidade e para IgM, a sensibilidade foi 92,5% e especificidade 79,0% (FUMAGALLI *et al.*, 2018).

A sequência que codifica os resíduos do ectodomínio da proteína E (1-409) de ZIKV foi otimizada e clonada no vetor pET21a com uma cauda c-terminal de histidina (His6 -Tag)(DAI *et al.*, 2016). A proteína foi expressa em *E. coli* BL21 (DE3), sendo inicialmente insolúvel, como corpúsculos de inclusão, e então solubilizada com ureia. De maneira semelhante, o ectodominio III da proteína E (EDIII) foi expresso em *E. coli* Rosetta pLysS por meio do vetor pET21 (STETTLER *et al.*, 2016b).

Informações a respeito da expressão dessas proteínas em sistema eucarioto serão apresentadas no *Capítulo II*.

2OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Produzir, em sistema procarioto, proteínas recombinantes com potencial antigênico dos vírus *Chikungunya* (CHIKV) e *Zika* (ZIKV).

2.2 Objetivos específicos

- i. Obter vetores de expressão com os genes codificadores das proteínas E2 de CHIKV (CHIKV-E2) e da proteína E de ZIKV (ZIKV-E).
- ii. Expressar as proteínas CHIKV-E2, ZIKV-E em *Escherichia coli*.
- iii. Purificar as proteínas de interesse.
- iv. Testar o potencial antigênico das proteínas produzidas em ELISA.
- v. Produzir anticorpos policlonais em coelho das proteínas que apresentaram potencial antigênico em ELISA.

3 METODOLOGIA

3.1 CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS RECOMBINANTES CONTENDO OS GENES DE INTERESSE

As etapas de obtenção dos vetores contendo os genes para as proteínas CHIKV-E2 e ZIKV-E se encontram detalhadas em BAGNO (2018). Genomas virais depositados no banco de dados *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) foram alinhados no software MEGA7. Os critérios de seleção das sequências foram: anotação completa do gene de interesse e ausência de nucleotídeos indefinidos. A partir do alinhamento foi gerado uma sequência consenso para cada gene (CHIKV-E2 e ZIKV-E) sendo que ambos, após análise pelo BlastN, apresentaram 100% de identidade com amostras brasileiras. Foram feitas análises de porção transmembrana e hidrofobicidade pelos softwares *TMHMM* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) e *ProtScale -Expasy* (<http://web.expasy.org/ProtScale/>), por meio das ferramentas *Transmembrane tendency* e *Hphob. -Kyte & Doolittle*. A partir dessas previsões, foram determinados pontos de corte para a geração das proteínas sem seus domínios transmembrana. As sequências nucleotídicas foram códon otimizadas para expressão em *E.coli* e inseridas no vetor pET-21a(+). Os vetores finais recombinantes, contendo os genes de interesse, foram denominados pET-21_CHIKV-E2, pET-21_ZIKV-E obtidos comercialmente por meio da empresa FastBio (Ribeirão Preto, SP). Esses plasmídeos foram utilizados para transformar bactérias da linhagem XL10, para propagação e estoque, seguida de extração do DNA plasmidial e confirmação por meio de restrição enzimática (dados não mostrados nesta tese, detalhados na dissertação de Mestrado - BAGNO 2018).

3.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES EM *E. coli*

Bactérias da linhagem BL21(DE3) foram transformadas, isoladamente, com os plasmídeos contendo os genes das proteínas de interesse (pET-21_CHIKV-E2, pET-21_ZIKV-E). Esta linhagem codifica a enzima RNA Polimerase T7 e pode ser transformada com plasmídeos cujo gene de interesse se encontra clonado sob controle de um promotor da mesma. Por sua vez, vetores pET-21 carregam uma

sequência N-terminal T7-Tag e uma porção C-terminal His-Tag. As sequências finais dos genes e seus respectivos plasmídeos pode ser encontrado no APÊNDICE A.

As soluções para o preparo de proteínas recombinantes são detalhadas no APÊNDICE B. Para transformação, 10ng de cada plasmídeo foi adicionado a bactérias quimicamente competentes da linhagem BL21(DE3), sendo os tubos incubados no gelo por 30 minutos, seguido de choque térmico a 42°C por 40 segundos e incubados novamente no gelo por 2 minutos. Adicionou-se aos tubos, 900µL de meio Luria Bertani (LB) líquido, sendo o volume transferido para tubos de 50mL e incubados por 1h, em agitador orbital (Thermo Scientific, EUA), 200 rpm, 37°C. Em seguida, as culturas foram semeadas em placas de Petri contendo meio LB sólido com ampicilina (100µg/mL) e incubadas (*overnight*, 37°C) em estufa (Thermo Scientific, EUA).

Clones bacterianos que cresceram após o plaqueamento em meio seletivo foram testados quanto a indução. Um pré-inóculo foi preparado com colônias isoladas em meio LB líquido suplementado com antibiótico (ampicilina 100µg/mL, volume total 5 mL) e incubado em agitador orbital (37°C, 200 rpm, *overnight*). No próximo dia, as culturas foram utilizadas para inocular 1 mL de LB suplementado com antibiótico (ampicilina 100µg/mL) (37°C, 200 rpm) até atingir uma densidade ótica $(DO)_{600} = 0,6$. De cada cultura foi separada uma fração não induzida e às demais foi adicionado Isopropyl β- d-1-thiogalactopyranoside(IPTG) (0,5mM) seguindo-se uma incubação por 4 horas (37°C, 200 rpm). Após a indução de cada cultura, as mesmas foram centrifugadas (20min, 8.000 g, 4°C) e juntamente com as frações induzidas foram analisadas por eletroforese em gel SDS-Page (descrito no item 3.3).

Após a confirmação e seleção de clones expressando as proteínas de interesse, foi feito um volume de cultura de 250mL para um teste de solubilidade. De forma semelhante ao descrito no parágrafo anterior, diferentes condições de indução foram testadas, sendo para ZIKV: 4h, 37°C e *overnight*, 20°C e para CHIKV-E2: 4h, 37°C, e *overnight* (18 e 25°C)³. Após centrifugação (20min, 8.000 g, 4°C), cada sedimento foi homogeneizado em 25mL de tampão de lise gelado e as amostras foram submetidas ao homogeneizador de alta pressão (Emulsiflex, Avestin, Canadá), nas

³Os experimentos de CHIKV-E2 e ZIKV-E não foram feitos simultaneamente. A diferença entre os protocolos de padronização (três condições para CHIKV-E2 e duas para ZIKV-E) deve-se unicamente à disponibilidade de agitadores orbitais naquele momento.

condições de 7.000 a 10.000psi, repetindo-se o processo por três vezes. As frações solúveis e insolúveis foram separadas por centrifugação (40.000g, 30 min, 4°C) e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE), conforme descrito no item 3.3.

Após as padronizações das condições ideais de indução e solubilidade, foram produzidas culturas em maior quantidade. Os lisados bacterianos foram purificados por cromatografia de afinidade, aplicando-se o produto HisTrap HP System (GE Healthcare Life Sciences) no aparelho ÄKTAprime plus (GE Healthcare Life Sciences), sendo a eluição feita com gradiente crescente de imidazol (soluções descritas no APÊNDICE B). As proteínas purificadas foram quantificadas utilizando-se produto comercial (Randox, Ref.: UP1570) e de acordo com as recomendações do fabricante.

3.3 SDS-PAGE

A eficiência da indução, os testes de solubilidade e purificação das proteínas recombinantes foram avaliados por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE). O gel é composto por duas fases, sendo a superior composta pelo gel de empilhamento, com a função de alinhar as proteínas em um mesmo nível; e a inferior denominada gel de separação, na qual as proteínas se separam de acordo com o seu peso molecular. As formulações dos géis e demais soluções para análise de proteínas são detalhadas no APÊNDICE B. As amostras foram aquecidas a 95°C por 10 minutos e aplicadas no gel juntamente com o tampão de amostra. Os géis foram colocados na cuba do kit Mini-Protean® em tampão de corrida a 150V.

O gel foi corado com solução de *Comassie Blue* (BioRad, EUA) sob agitação e depois descorado com a solução descorante. A visualização das bandas foi realizada por comparação com o padrão de peso molecular para proteínas (*Broad-Range* 1610317- BioRad ou MWSDS 70L - SIGMA).

3.4 WESTERNBLOT

Para a realização dos *western blots*, as amostras proteicas foram desnaturadas e submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE), conforme descrito no item 3.3.

Após o fracionamento, as amostras foram transferidas para membranas de nitrocelulose (GE Healthcare, Hybond™-P) por 75 minutos a 0,35 A por meio da aparelhagem Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) em tampão de transferência (para mais detalhes, ver soluções no APÊNDICE B). As membranas foram incubadas em tampão de bloqueio, *overnight* a 4°C. Em seguida, foi adicionado o anticorpo primário (anti-his, 1:6000, Sigma Aldrich, Ref.: SAB1305538, ou soro 1:500), por um período de incubação de 1h, seguido de três lavagens e posterior adição do anticorpo secundário (anti-mouse, 1:6000, Sigma Aldrich, Ref.: SAB3701021), por 1h. As membranas foram novamente lavadas, três vezes, e para revelação utilizou-se o produto Luminata Classic Western HRP substrate (Millipore) de acordo com as recomendações do fabricante.

3.5 OBTENÇÃO DE SORO HIPERIMUNE DE CAMUNDONGO PARA CHIKV E ZIKV

Soros hiperimunes de camundongos infectados foram obtidos em parceria com outros laboratórios e instituições. Soros de animais infectados com ZIKV foram cedidos gentilmente pela professora Dra. Silva Sardi, da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Fêmeas de camundongos da linhagem BALB/c foram infectadas com 7 semanas, pela via intravenosa com 1×10^6 PFU do ZIKV, sendo o sangue coletado após 35 dias de infecção por punção da veia cava inferior.

No caso do soro animais infectados por CHIKV, a parceria foi feita com o laboratório da professora Danielle da Glória de Souza do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos (Departamento de Microbiologia - UFMG). Animais C57BL/6 com 4 semanas de idade foram infectados por via intraplantar com 1×10^6 PFU de CHIKV sendo o soro coletado após 37 dias.

3.6 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SOROTECA HUMANA

Soros de pacientes infectados por DENV, ZIKV e CHIKV, além de amostras negativas, foram obtidos em parceria com o Serviço de Virologia e Riquetsioses da Fundação Ezequiel Dias (FUNED-MG), Belo Horizonte, pela colaboração com o Dr. Glauco Carvalho. Os protocolos de uso experimental dos soros coletados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa daquela instituição (ANEXO A).

As amostras são enviadas à FUNED com uma suspeita principal, para a qual é realizado determinado teste de acordo com os sintomas apresentados pelo paciente e seguindo-se o fluxograma da Figura 7 (área cinza). Os exames são voltados para a vigilância epidemiológica e têm como objetivo ajudar no fechamento de casos e tomada de decisões pelo governo. Dependendo do tempo após o início dos sintomas as amostras são encaminhadas para pesquisa viral (biologia molecular) ou de anticorpos (sorologia). Para todos os casos suspeitos de arboviroses, inicialmente é feito um teste diferencial para Dengue. Se pelos dados clínicos ou epidemiológicos da ficha do paciente surgirem alguma outra suspeita, mais testes são realizados. As diretrizes da FUNED são dinâmicas e dependem da situação epidemiológica do momento. No período investigado (2017) a investigação para Zika era feita somente para gestantes, recém-nascidos com microcefalia e pessoas com sintomas neurológicos associados à infecção.

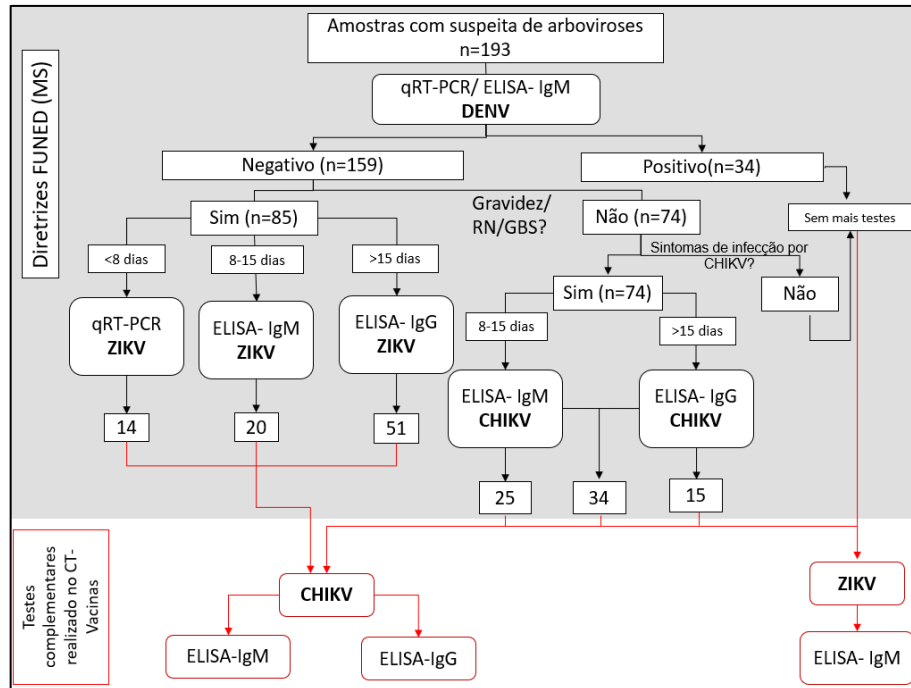


Figura 7- Caracterização do banco de amostras de arboviroses utilizado neste estudo. As amostras foram testadas inicialmente no LACEN-FUNED de acordo com as diretrizes do Ministério da Saúde, que recomenda a realização de testes contra o DENV para todos os casos suspeitos de arbovírus. O diagnóstico de ZIKV é considerado uma prioridade nos casos de suspeita de infecção em mulheres grávidas. Possíveis casos de CHIKV são investigados em casos de amostras negativas para DENV ou quando o paciente apresenta febre alta, aparecimento de artralgia inexplicada ou artrite aguda. Quando testado positivo para um arbovírus específico, as amostras não são testadas novamente para outros vírus (área cinza). Área branca: testes complementares, realizados no CT-Vacinas.

Os testes feitos pela FUNED dependem do que é fornecido pelo MS e no caso do período investigado, incluíam:

- Chikungunya: Sorologia (IgM e IgG) Euroimmun, qPCR e isolamento viral.
- Zika: Sorologia Euroimmun (IgM) ou Novagnost (IgM) e qPCR.
- Dengue: *in house* ou comercial Virion (IgM), Panbio (IgM), isolamento viral e PCR.

Quanto a essas amostras as informações foram fornecidas de forma qualitativa (resultado positivo ou negativo). Uma caracterização de acordo com a disponibilidade de kits foi realizada de forma complementar às diretrizes da FUNED e, para o caso de CHIKV, as amostras foram novamente testadas para obtenção da caracterização semiquantitativa (dado por um índice numérico proporcional a absorbância de cada amostra). As amostras testadas no CT-Vacinas (Figura 7, área branca) utilizaram os

seguintes kits comerciais: CHIKV: Euroimmun (IgG e IgM, Ref.: EI 293a G, EI 293a M), ZIKV: Euroimmun (IgM, Ref.:EI 2668 M), (caracterização dispostas no APÊNDICE C).

3.6 PROCEDIMENTO PADRÃO PARA O ELISA INDIRETO

Os antígenos produzidos foram aplicados em plataforma ELISA para a avaliação do potencial antigênico dos mesmos. As formulações dos reagentes utilizados estão descritas no APÊNDICE D. Placas de poliestireno (Costar, Ref. 2592, EUA) foram sensibilizadas *overnight* a 4°C com 100 µL da solução do antígeno diluído em tampão carbonato (pH 9,6). A solução foi descartada e os poços foram bloqueados por 2 h a 37°C, utilizando-se 280 µL da solução de bloqueio. Após o descarte da solução, as placas foram secas por 4 horas à temperatura ambiente, em sala com baixa umidade e então armazenadas em bolsas herméticas com dessecante. Para cada ensaio, 100µLde soro diluído em diluente de amostra, foram adicionados e incubados a 37°C (45 min em caso de IgG e 60 min para IgM, após a otimização do protocolo). Após cinco lavagens, adicionou-se 100µLdo anticorpo secundário (anti-human IgG, Fapon BEEIGGI201, ou anti-human IgM, Sigma A0420, ambos conjugados à enzima peroxidase) previamente diluído em estabilizante (Moss, Ref. HRPD1000) (1:5.000 para IgG e 1:40.000 IgM),sendo incubado a 37 °C (tempo de incubação: 60 min no caso de IgM e 30 min para IgG). As placas foram lavadas cinco vezes e incubadas com 100µLde TMB (3,3 ', 5,5; -tetrametilbenzidina) (Moss, Ref. TMBUS) por poço, ao abrigo de luz, por 15 minutos. A reação foi interrompida com 100 µL de solução de parada e absorbância medida em espectrofotômetro Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific) a uma densidade óptica (O.D.) de 450 nm. A concentração ideal do antígeno recombinante e da diluição de soros a ser empregada em cada teste foram determinados com base em uma distinção entre amostras positivas e negativas(razão).

Foi possível comparar o desempenho em ELISA da proteína CHIKV-E2 produzida em dois sistemas diferentes: em *E. coli* (sistema procarioto, não glicosilada), como já descrito, e em sistema eucarioto. No último caso, a proteína recombinante, cedida pelo professor Dr. Arturo Reyes-Sandoval (Jenner Institut, Universidade de Oxford, Reino Unido), foi produzida em células HEK-293-T (LÓPEZ-

CAMACHO *et al.*, 2019). A proteína glicosilada passou pela mesma etapa de padronização em ELISA assim como as demais proteínas produzidas no CT-Vacinas.

3.6.1 Análises dos resultados de ELISA e verificação do potencial antigênico das proteínas produzidas

Os gráficos e dados estatísticos foram gerados pelo programa GraphPad Prism 8, que fornece a análise por curva ROC, uma forma de demonstrar a relação antagônica entre o *signal* dado pelos verdadeiros positivos (sensibilidade), do *ruído* do teste, dado pelos falsos positivos (1-especificidade) -objetivando classificar os indivíduos em infectados e não infectados. O ponto de corte deste teste foi determinado pelo ponto mais alto da curva ROC, que confere os maiores valores de sensibilidade e especificidade.

A partir da curva ROC, é possível analisar a Área sob a Curva (AUC), uma medida que representa o desempenho geral do teste, pois leva em consideração todos os valores de sensibilidade e especificidade de cada ponto de corte, da seguinte forma (HOSMER; LEMESHOW, 2013):

- $0,5 \leq AUC < 0,7$: Sem discriminação (ou seja, incapaz de separar amostras positivas de negativas)
- $0,7 \leq AUC < 0,8$: Discriminação aceitável
- $0,8 \leq AUC < 0,9$: Discriminação muito boa
- $AUC \geq 0,9$: Discriminação excelente

Quanto maior o poder do teste de discriminar entre soropositivos e soronegativos mais a curva se aproxima do canto superior esquerdo. Dessa forma, quanto melhor o teste, mais a área sob a curva ROC se aproxima de 1.

Um valor de *cut-off* foi calculado pela média de soros verdadeiramente negativos⁴ mais três vezes o valor do desvio padrão (3DP)(KIM *et al.*, 2019), e confirmados pela Curva ROC. A partir do *cut-off* determinou-se um índice de classificação dos resultados (*I*), baseando-se na absorbância de cada amostra $Ab_{S_{450nm}}$, dividida pelo valor do *cut-off*, de acordo com a equação:

⁴Soros caracterizados como negativos pela FUNED e confirmados por testes sorológicos comerciais para as três arboviroses estudadas foram considerados verdadeiramente negativos.

$$I = \frac{Abs_{450nm}}{cut - off}$$

Os resultados foram classificados como:

$I < 0.8$: amostra não reagente (negativa)

$0.8 \leq I < 1.1$: amostra indeterminada

$I \geq 1.1$: amostra reagente (positiva)

O desempenho das proteínas recombinantes foi avaliado pela razão entre a média das absorbâncias encontradas para as amostras positivas dividida pela média das absorbâncias das amostras negativas. Os resultados foram comparados ao produto comparativo e determinando-se os parâmetros de sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia (AC), como mostrado no Quadro 4.

Quadro 4- Referência para a classificação dos resultados pelos testes de ELISA

Classificação dos Soros	Resultado do ELISA		Total
	Positivo	Negativo	
Positivos	Verdadeiro positivo (A)	Falso negativo (C)	A+C
Negativos	Falso Positivo (B)	Verdadeiro negativo (D)	B+D
Total	A+B	C+D	A+B+C+D
<p>Especificidade: $E = \frac{D}{(B+D)}$</p> <p>Sensibilidade: $S = \frac{A}{(A+C)}$</p> <p>Valor Preditivo Positivo: $VPP = \frac{A}{(A+B)}$</p> <p>Valor Preditivo Negativo: $VPN = \frac{D}{(C+D)}$</p> <p>Acurácia: $AC = \frac{(A+D)}{(A+B+C+D)}$</p>			

Um resultado falso negativo ocorre quando o teste apresenta um resultado negativo embora o paciente possua a infecção. Já um resultado falso positivo ocorre quando o teste apresenta resultado positivo, mas o paciente não possui a infecção. Estes dois parâmetros indicam os erros do teste. Os resultados verdadeiro positivo e verdadeiro negativo ocorrem quando o teste indica, respectivamente, resultado positivo na presença e negativo na ausência da infecção, indicando, portanto, a quantidade de acertos (CAMPBELL, *et al.*, 2007).

A especificidade refere-se à frequência com que as amostras verdadeiramente negativas recebem o resultado negativo pelo teste, ao passo que a sensibilidade indica a frequência com que o teste diagnóstico detecta as amostras verdadeiramente positivas. O VPN indica a probabilidade de um paciente com um resultado de teste negativo ser um verdadeiro negativo (ou seja, não ter sido infectado), relacionando-se, portanto, à especificidade, ao passo que o VPP indica a probabilidade de um paciente com um resultado de teste positivo ser verdadeiro positivo (ou seja, ter sido infectado), relacionando-se a sensibilidade. Por fim, a acurácia refere-se à probabilidade de o teste fornecer resultados corretos, ou seja, ser positivo nos

pacientes infectados e negativo nos não infectados. Ela é representada pela relação entre os verdadeiros positivos e verdadeiros negativos como uma proporção de todos os resultados (CAMPBELL *et al.*,2007). Amostras classificadas como “indeterminadas” ($0,8 \leq I < 1,1$) não foram utilizadas para os cálculos de E, S, VPN VPP, AC.

Para comparação entre testes foi avaliado o coeficiente Kappa (K) pela ferramenta online Graphpad (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/kappa1/>), que avalia o nível de concordância ou reprodutibilidade entre dois ou mais conjuntos de dados e que pode ser interpretado da seguinte forma (LANDIS; KOCH, 1977):

- K <0: Sem concordância;
- K:0,00 - 0,20: concordância mínima;
- K:0,21 - 0,40: concordância razoável;
- K: 0,41-0,60: concordância moderada;
- K:0,61 - 0,80: concordância substancial;
- K:0,81 - 1,00: concordância quase perfeita.

3.7 PRODUÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL EM COELHO PARA O DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMAS DE DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

Após sua purificação, o antígeno recombinante CHIKV-E2 foi utilizado para a produção de um anticorpo policlonal em coelho conforme publicado anteriormente (LEENAARS; HENDRIKSEN, 2005). Todos os procedimentos seguiram os princípios do código de ética para o uso de animais de laboratório e foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA -Fiocruz) sob número de protocolo P-29/19-3, LW-39/19- ANEXO B (inclui a produção de outros policlonais além do deste projeto).

Um coelho da raça Nova Zelândia foi submetido a coleta pré-imune e então imunizado com três doses de 100 µg de proteína acrescida de adjuvante (hidróxido de alumínio 30%), com intervalo de 14 dias entre as doses. O animal foi mantido sob condições controladas, em gaiola individual contendo os insumos necessários para o seu bem-estar no Biotério do Centro de Pesquisa René Rachou. As imunizações foram acompanhadas da coleta de 1 mL de sangue da veia auricular periférica do

animal (sangria de prova) e a reatividade do soro foi testada contra as proteínas específicas, por metodologia ELISA. Após a terceira dose, foi realizada uma punção cardíaca, sob acompanhamento de um veterinário, sendo administrada anestesia e sedação [Cloridrato de Ketamina 50% (0,5 mL/Kg) associado com a xilazina 5mg/Kg (0,2 mL/Kg), via intramuscular] e morte subsequente, sem causar dor ou agonia ao animal.

A purificação do anticorpo foi feita utilizando-se uma coluna de afinidade contendo resina de proteína A (HiTrap Protein A - GE)(MAGDELDIN, 2012). A coluna foi equilibrada com tampão de ligação (fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0). O sangue coletado foi centrifugado, filtrado (membrana 0,45 µm, Milipore) e o soro foi misturado ao tampão de ligação (fosfato de sódio 0,02 M) na proporção de 1:3 (soro: tampão). A eluição foi feita utilizando-se tampão ácido cítrico 0,1 M, pH 3,5 seguida de neutralização imediata (tampão Tris HCl 1 M, pH 9,0, proporção 1:3 do eluato). As frações purificadas foram analisadas em gel SDS-PAGE e quantificadas.

4 RESULTADOS

4.1 PRODUÇÃO DE CHIKV-E2 e ZIKV-E EM BL21(DE3)

Plasmídeos sintéticos contendo os genes de interesse (pET-21_CHIKV-E2, pET-21_ZIKV-E) foram utilizados para transformar bactérias da linhagem XL10 para manutenção do estoque e checagem após extração do DNA plasmidial e confirmação por restrição (experimentos realizados anteriormente conforme descrito em BAGNO, 2018). Após a confirmação, os plasmídeos foram utilizados para transformar bactérias da linhagem BL21(DE3) conforme detalhado no item 3.2. Para ambas as proteínas foi realizado um teste inicial de expressão (37°C, 4h, 0,5 mM IPTG para ambas as proteínas) para a seleção de clones, sendo possível perceber diferença na expressão entre as frações não induzidas (NI) e induzidas (I) (Figura 8A para CHIKV-E2 e D para ZIKV-E). Em seguida, foi realizado um teste de solubilidade em diferentes condições: CHIKV E2: *overnight* (18 e 25°) e 3h (37°C); ZIKV-E: *overnight* (20°C) e 3h (37°C)(Figura 8Bpara CHIKV-E2 e 7 E para ZIKV-E)⁵. Como sob todas as condições testadas as proteínas se apresentaram na fração insolúvel, foi feito ainda um teste de solubilidade em ureia, variando-se e as concentrações de 2, 4, 6 e 8 M. Como pode ser visto na Figura 8C, foi necessário 8 M de ureia para solubilizar a proteína CHIKV-E2 em quantidade significativa. Tentativas posteriores com a linhagem *Artic express* apresentaram resultados semelhantes (dados não mostrados). Já a proteína ZIKV-E apresentou boa solubilidade em tampão com 4M de ureia, sendo esta concentração a escolhida para prosseguir com os experimentos(Figura 8F).

⁵ Esses experimentos não foram feitos simultaneamente. A diferença entre os protocolos deve-se unicamente à disponibilidade de agitadores orbitais.

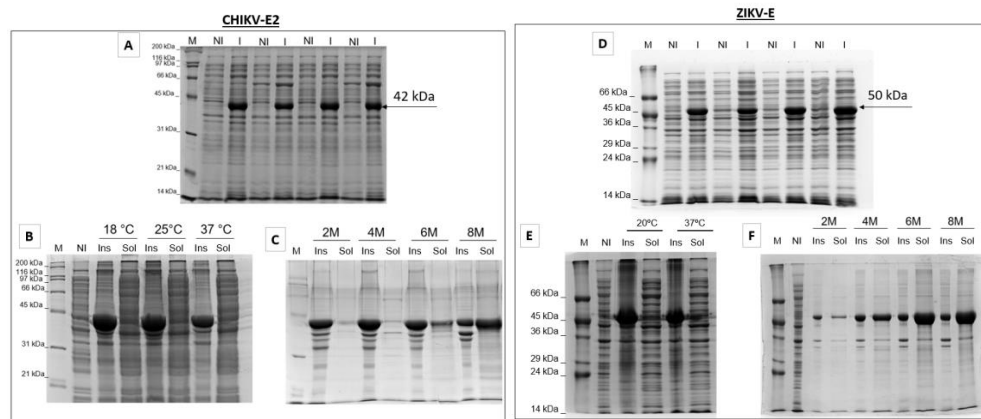


Figura 8- Padronização da expressão da proteína CHIKV-E2 e ZIKV-E em sistema procarioto-BL21(DE3). Géis de CHIKV-E2: A, B e C; géis de ZIKV-E: D, E, F. A e D: seleção de clones sem (não induzido, NI) e com adição de IPTG (induzido, I). **B e E:** Teste de solubilidade em diferentes temperaturas CHIKV E2: overnight (18 e 25°) e 3h (37°C); ZIKV-E: overnight (20°C) e 3h (37°C) Ins.: fração insolúvel, Sol.: fração solúvel. **C e F:** Teste de solubilidade em diferentes concentrações de ureia (2,4,6 e 8M) realizado após indução (25°C, *overnight*) para a proteína CHIKV-E2 e (20°C, *overnight*) para a proteína ZIKV-E.

Após a indução em larga escala (2L de cada cultura, 25°C, *overnight* para a proteína CHIKV-E2 e 20°C, *overnight* para a proteína ZIKV-E), as células foram centrifugadas e o sedimento celular foi solubilizado em tampão com ureia (8 M para CHIKV-E2 e 4M para ZIKV-E). Estas amostras foram submetidas à purificação por cromatografia de afinidade em coluna HisTrap no aparelho ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare Life Sciences). Para examinar a qualidade da purificação, as frações purificadas foram submetidas a fracionamento em SDS-PAGE, sendo que, para as duas proteínas foi possível obter frações com alto grau de pureza e baixa degradação, na altura esperada do gel (Figura 9.A). Com as frações purificadas foi feito para ambas as proteínas um *Western blot* utilizando anticorpo anti-his (Figura 9B) e, para verificar a antigenicidade das mesmas, incubou-se a membrana com soro de camundongos infectados com CHIKV e ZIKV, respectivamente (Figura 9C).

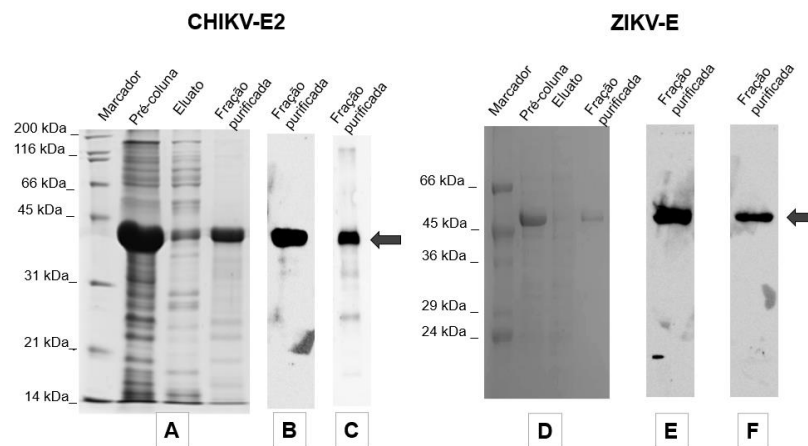


Figura 9- Purificação das proteínas CHIKV-E2 e ZIKV-E expressas em sistema procaríoto BL21(DE3) e confirmação por Western Blotting. A: Gel SDS-page da purificação por afinidade da proteína CHIKV-E2, B: *Western blot* com anticorpo anti-histidina. C: *Western blot* com soro de camundongos infectados com CHIKV. D: Gel SDS-page da purificação por afinidade da proteína ZIKV-E, E: *Western blot* com anticorpo anti-histidina. F: *Western blot* com soro de camundongos infectados com CHIKV.

Após a purificação, as proteínas foram quantificadas utilizando produto comercial (Randox, Ref.: UP1570). Para a proteína CHIKV-E2 o rendimento foi igual a 57mg/L de cultura, enquanto para ZIKV-E foi igual a 1,5 mg/L de cultura. É importante ressaltar que a menor quantidade de produção ZIKV-E pode estar relacionada a solubilização parcial com o uso de uma concentração menor de ureia (4M) quando comparada a CHIKV-E2 (8M). Uma nova purificação de ZIKV-E, nas mesmas condições, mas com tampão a 8M apresentou um rendimento de 11 mg/L de cultura (dado não mostrado). Ainda assim, é sabido que cada proteína pode apresentar níveis bem diferentes de expressão, ainda que após a otimização para um rendimento maior.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA SOROTECA

Os dados clínicos e epidemiológicos foram analisados com base nas informações das fichas recebidas pela FUNED. É importante mencionar que amostras suspeitas de Dengue e Chikungunya são encaminhadas com seus formulários de investigação do SINAN (Sistema de Notificação de Relatórios de Lesões), que incluem alguns sinais como mostrado na Tabela 1. Os formulários de pacientes suspeitos da Febre Zika são menos detalhados, e, durante o período desta investigação (por diretrizes do Ministério da Saúde), foram encaminhadas a FUNED somente amostras

de pacientes grávidas, recém-nascidos com microcefalia ou de pacientes com suspeita de GBS.

Tabela 1- Dados das fichas clínicas dos pacientes infectados com CHIKV e DENV.

Pacientes		CHIKV (n=74)	DENV (n=34)
		Nº de casos (%)	Nº de casos (%)
Idade	1 a 20	6 (8,1%)	15 (44,1%)
	21-40	21 (28,4%)	11 (32,4%)
	41-60	27 (36,5%)	4 (11,8%)
	>60	20 (27,0%)	4 (11,8%)
Gênero	Feminino	41 (55,4%)	15 (44,1%)
	Masculino	33 (44,6%)	19(55,9%)
Sintomas	Febre	58 (80,6%)	20 (66,7%)
	Mialgia	47 (65,3%)	16 (53,3%)
	Dor de cabeça	51 (70,8%)	20 (66,7%)
	Manchas	24 (33,3%)	7 (23,3%)
	Vômitos	17(23,6%)	12 (40,0%)
	Náusea	27 (37,5%)	11 (36,7%)
	Dor nas costas	30 (41,7%)	6 (20,0%)
	Conjuntivite	5 (6,9%)	0 (0,0%)
	Artrite	31 (43,1%)	1 (3,3%)
	Artralgia intensa	53 (73,6%)	3 (10,0%)
	Petéquias	5 (6,9%)	2 (6,7%)
	Dor retro orbital	18 (25,0%)	6 (20,0%)

A origem das amostras é ilustrada na Figura 10, em que é demonstrada a incidência, por cidade, de amostras positivas das três arboviroses analisadas.

Verificou-se uma prevalência de casos de CHIKV na região do Vale do Rio Doce (85%), enquanto infecções por DENV foram mais incidentes na região Metropolitana de Belo Horizonte (74%), ao passo que amostras de ZIKV foram encaminhadas à FUNED de várias regiões do estado (Figura 10).

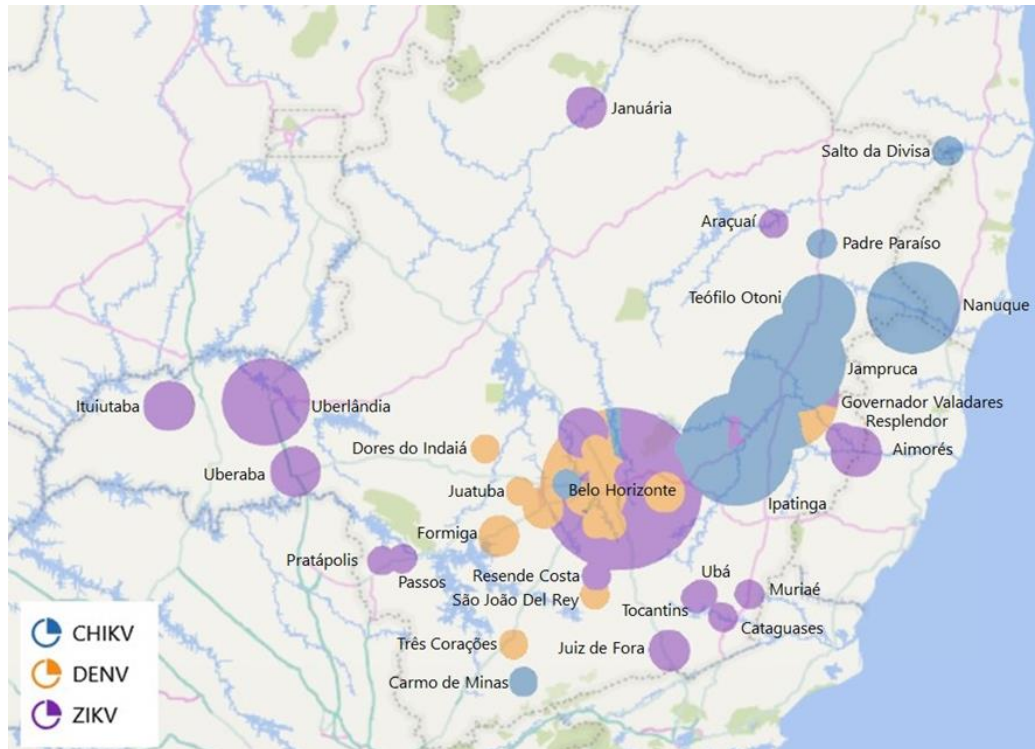


Figura 10-Origem das amostras de arboviroses testadas neste estudo. Distribuição de casos de Chikungunya (CHIKV, azul), Dengue (DENV, laranja) e Zika (ZIKV, roxo) no estado de Minas Gerais.

As amostras de CHIKV foram pré-classificadas em três grupos de acordo com os testes realizados pela FUNED: G1 testado somente para IgM, resultado reagente (n=25); G2: testado para IgM e IgG, resultado reagente para ambos (n=33), G3: testado para IgM com resultado indeterminado ou negativo e IgG reagente (n=15). De acordo com as recomendações do Ministério da Saúde, havendo disponibilidade de kit Chikungunya IgG, as amostras encaminhadas para a testagem de Chikungunya IgM podem ser testadas para este marcador após análise da ficha epidemiológica, sendo que o teste de IgG é recomendado para amostras com mais de 15 dias de sintomas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Pelas diretrizes que são seguidas (Figura 7, mostrada anteriormente na metodologia) o G1 compreende amostras com 8-15 dias após início dos sintomas e G2 e G3 amostras com mais de 15 dias após o início dos sintomas.

Como algumas amostras de CHIKV não tinham a caracterização completa (IgM e IgG), foi feito no CT-Vacinas uma testagem por kit comercial (Euroimmun) para essas amostras, independente das diretrizes, sendo também realizado um teste para utilizando um kit comercial para ZIKV (Euroimmun IgM). Todas as amostras

classificadas como positivas para CHIKV já haviam tido o diagnóstico de DENV descartado pela FUNED e, na avaliação com o kit comercial para ZIKV, todas as amostras apresentaram resultado negativo (dados não mostrados).

Considerando as amostras classificadas para CHIKV pela FUNED (exame clínico e laboratorial), três delas não apresentaram resultado reagente nem para IgM nem para IgG pelo kit comercial avaliado no CT-Vacinas: pacientes 56, 62 e 67 (amostras 5050, 4576 e 4668 respectivamente) (Apêndice D, juntamente com os outros testes realizados para CHIKV no capítulo).

4.3 ELISA COM A PROTEÍNA ZIKV-E

Para se avaliar a quantidade adequada de antígeno a ser utilizada na preparação da fase sólida, foi feito inicialmente uma titulação das proteínas. A proteína ZIKV-E foi titulada fixando-se a diluição da amostra (1:100) e conjugado anti-IgG (1:5.000) (Figura 11A). Em seguida, foi feito um teste com 400 ng de antígeno, variando-se a diluição dos soros de 1:50 a 1:400, para detecção de IgG (diluição 1:5.000 de anti-IgG, Figura 11B) e de IgM (diluição 1:40.000 do anti-IgM, Figura 11C).

Considerando os testes iniciais de padronização, as razões calculadas para as diversas condições testadas ficaram muito próxima de 1, revelando que este antígeno não foi capaz de diferenciar o *pool* de amostras positivas do *pool* de amostras negativas. Um teste feito com amostras individuais (400ng de antígeno, soro 1:100, conjugado anti-IgG 1:5.000, Figura 11D), sendo 20 positivas para ZIKV (ZIKV+) e 32 negativas (ZIKV-) constatou o observado em relação aos ensaios preliminares utilizando *pool* de soros. Este antígeno não apresenta potencial para o diagnóstico sorológico em plataforma ELISA. O *cut-off* calculado para este teste a partir da fórmula foi de 0,350, e nenhuma amostra positiva ficou acima dele, indicado baixa sensibilidade do teste. A área sobre a curva ROC (AUC=0,612) reafirma que o teste é incapaz de discriminar amostras positivas de negativas. É importante ressaltar que as amostras consideradas negativas foram também testadas com kits comerciais para DENV e CHIKV e tratam-se de amostras não reativas para tais arboviroses.

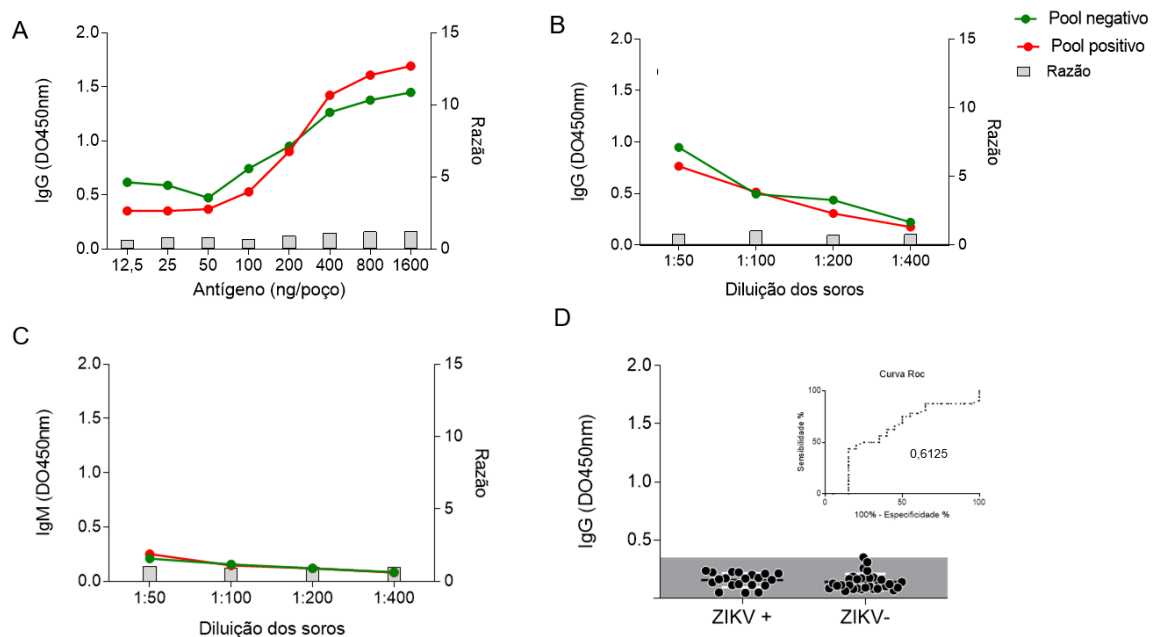


Figura 11-Avaliação do potencial diagnóstico do antígeno ZIKV-E em ELISA. A: Titulação do antígeno utilizando um *pool* positivo (vermelho) e um *pool* negativo (verde) de amostras para detecção de anticorpos do tipo IgG. B e C: Titulação dos *pools* de soro a uma quantidade fixa de 400 ng de antígeno/poço, para IgG e IgM, respectivamente. D: Ensaio de detecção de anticorpos IgG anti-ZIKV utilizando amostras individuais e curva ROC gerada pelo programa GraphPadPrism.

4.4 ELISA das proteínas de CHIKV

4.4.1 Padronização do ELISA para detecção de infecções pelo CHIKV

Um experimento inicial com os dois antígenos de CHIKV-E2 (produzido em *E.coli* e em HEK239-T) foi realizado a partir de um *pool* de soros positivo para CHIKV: 4586,4601,4629, 4606,4696,4777, 4801 e 4810 (confirmados para IgM e IgG pelo kit comercial) e um *pool* negativo (com sorologia negativa para CHIKV pelos kits comerciais: SCT01, SCT02, SCT05, NEG62, NEG38, NEG 36, NEG35 e NEG33), variando-se a quantidade de antígeno e diluição de soros. Os resultados para IgG e IgM são mostrados nas figuras 12 e 13, respectivamente.

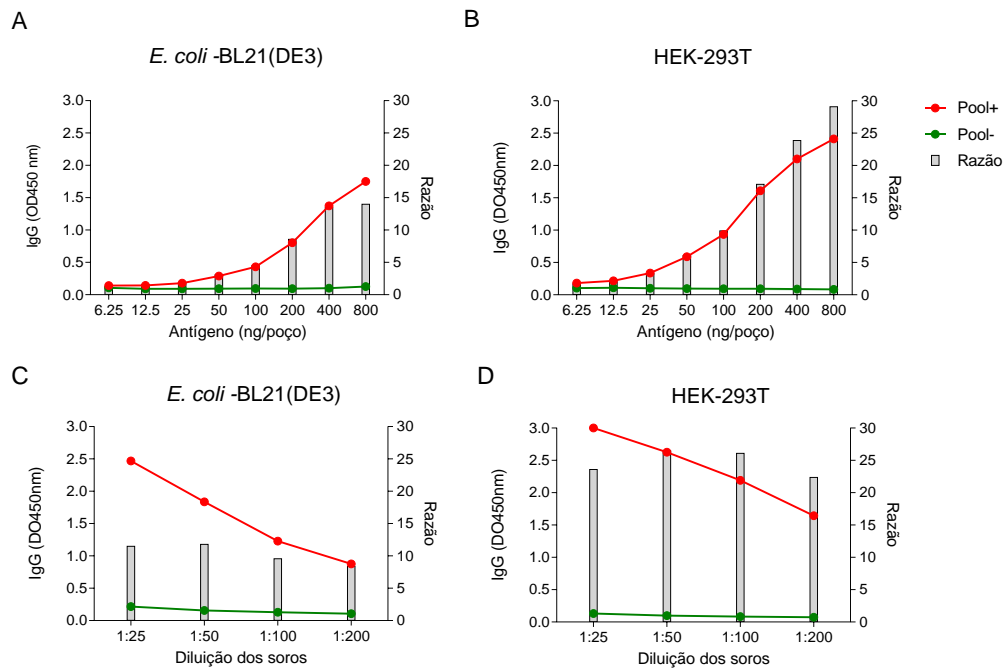


Figura 12 - Padronização do ELISA IgG indireto para detectar anticorpos contra CHIKV. Diferentes concentrações(título) de antígenos (A, B) e diferentes diluições de soros combinados (C, D) foram testadas em plataforma ELISA para determinar concentrações mínimas ótimas de antígeno e diluição ótima máxima de soros. Esquerda (CHIKV-E2 produzido em *E. coli*) direita (CHIKV-E2 produzido em HEK-293T).

Para IgG, empregou-se inicialmente uma diluição fixa (1:100) para as amostras (*pool* positivo e *pool* negativo para CHIKV) e para o conjugado (anti-IgG 1:5.000). A partir deste ensaio, foi estabelecido o uso de 200 ng de antígeno/poço como a concentração mínima ideal para ambos os antígenos, com base na razão entre absorvâncias dos *pools* positivo e negativo (nove vezes para a proteína produzida em *E. coli* e de 17 para a proteína produzida em HEK-293T)(Figura 12 A e B). Foram realizados então ensaios de titulação das amostras e estabeleceu-se a diluição de soro 1:100 como a diluição a ser aplicada ao teste, pois com a quantidade fixa de 200 ng/poço as razões apresentadas foram de dez vezes para a proteína produzida em *E. coli* e de 26 para a proteína produzida em HEK-293T (Figura 12 C e D).

Para IgM, inicialmente, os dois antígenos foram titulados a partir da diluição de soro 1:100 e conjugado 1:40.000 (Figura 13A e B). Foi possível perceber uma baixa sensibilidade de diferenciação para a proteína de procaríoto em quantidades de antígeno abaixo de 400 ng, sendo esta titulada até 3200 ng/poço. As melhores razões

de separação positivo-negativo foram obtidas a partir de uma diluição de 1:25 do soro, utilizando 3200 ng/poço no caso da proteína produzida em *E. coli*(razão = 4, Figura 13C) e 200 ng no caso da proteína produzida em HEK-293T (razão = 9, Figura 13D).

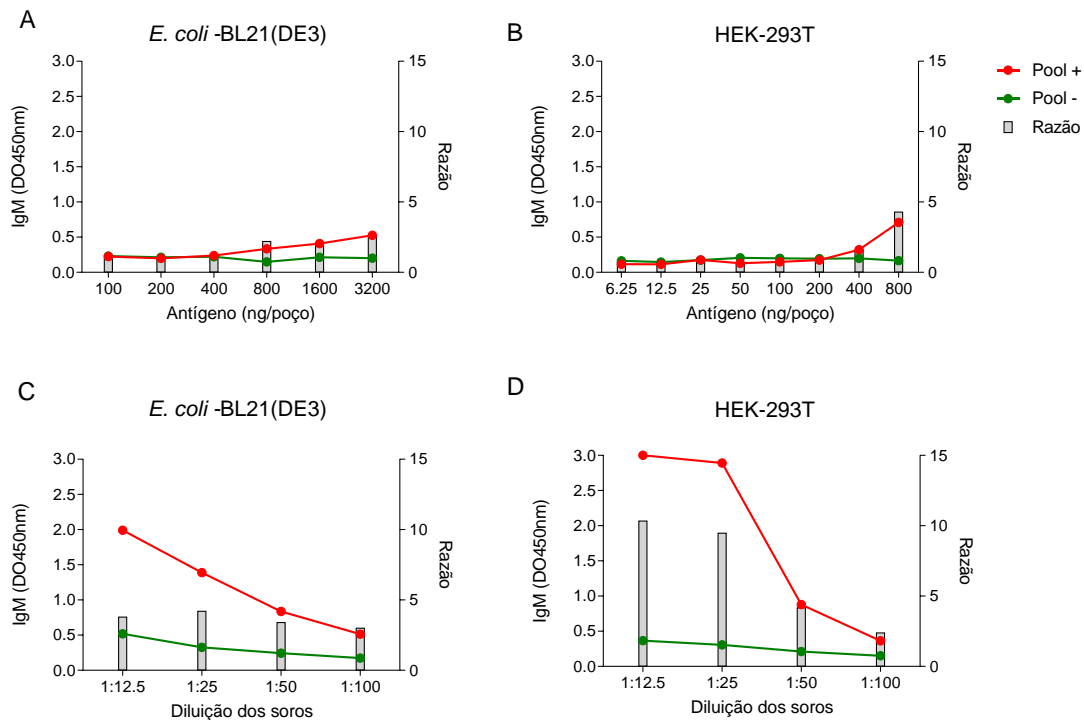


Figura 13- Padronização do ELISA IgM indireto para detectar anticorpos contra CHIKV. Diferentes concentrações(título) de antígenos (A, B) e diferentes diluições de soros combinados (C, D) foram testadas em plataforma ELISA para determinar concentrações mínimas ótimas de antígeno e diluição ótima máxima de soros. Os gráficos à esquerda mostram os resultados para o CHIKV-E2 produzido em *E. coli* e à direita mostram os resultados usando o antígeno recombinante produzidos em sistema eucarioto.

4.4.2 Comparação de desempenho das proteínas CHIKV-E2 em ELISA

Os antígenos CHIKV-E2 produzidos em *E. coli* BL21(DE3) e HEK-293T foram testados em plataforma ELISA, para avaliação da capacidade de reconhecerem anticorpos específicos anti-CHIKV. Ao todo, foram testadas, 158 amostras, sendo 74 amostras positivas para CHIKV e 84 amostras negativas, previamente caracterizadas por produto diagnóstico comercial. Os resultados deste ensaio, bem como as respectivas curvas ROC, são apresentados na Figura 14 (Resultados individuais dispostos no Apêndice D).

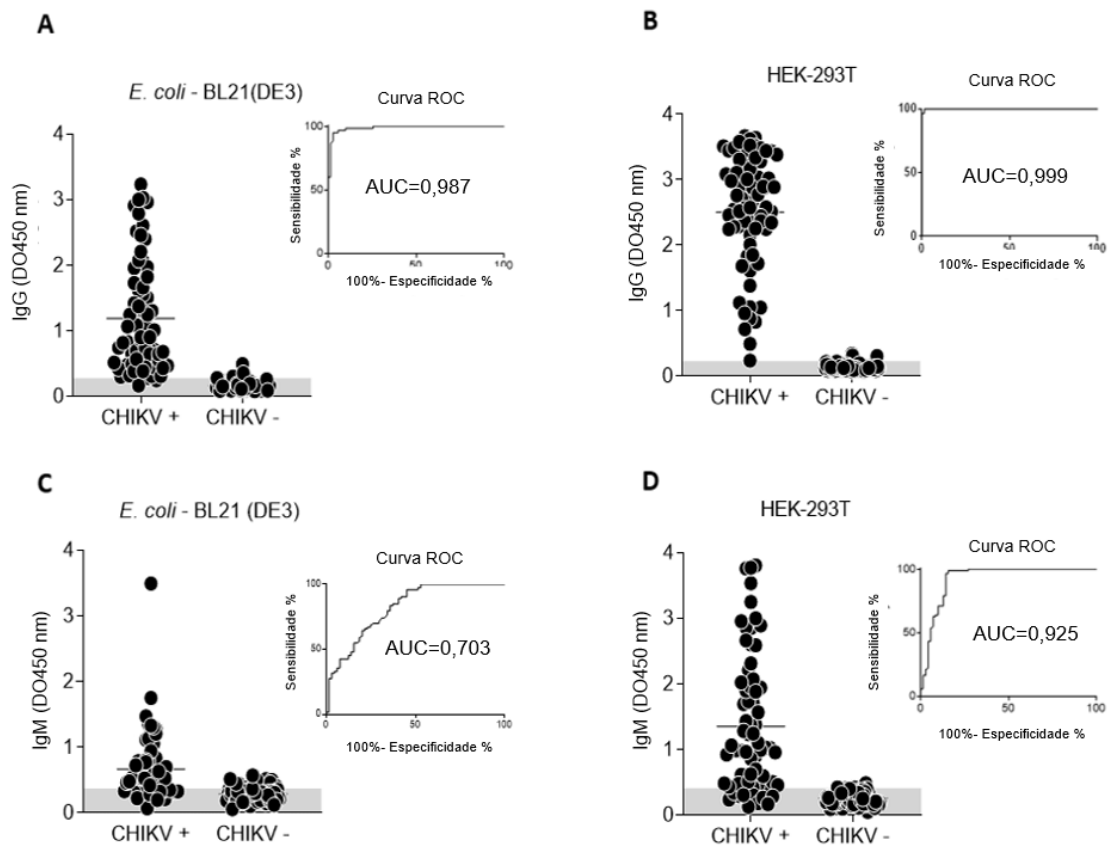


Figura 14-Comparação de desempenho dos antígenos CHIKV-E2 produzidos em *E. coli* ou em células HEK-293T em ELISA. Amostras individuais de soros positivos ou negativos para CHIKV de um banco já caracterizado foram testadas por ELISA empregando antígenos produzidos em sistema procaríoto (A, C) e eucarioto (B, D). Cada ponto representa uma amostra de soro individual. A curva ROC, gerada pelo programa GraphPadPrism revela a relação entre especificidade e sensibilidade de cada teste é mostrada a direita de cada gráfico de dispersão. AUC: área sob a curva ROC, relacionada ao desempenho do teste

Os resultados de cada ensaio, incluindo valores de sensibilidade, especificidade, valor predito positivo (PPV), valor predito negativo (VPN), positividade e acurácia (AC) são exibidos na Tabela 2.

Tabela 2- Avaliação dos parâmetros de desempenho dos testes ELISA avaliados para detectar anticorpos anti-CHIKV.

		Comercial- IgM		Comercial- IgG	
CHIKV	Indeterminadas	6		1	
	Não reagente	9		4	
	Reagente	59		69	
	Testadas	74		74	
	Positividade	80%	76,70%-84,30%	93%	91,70-94,30%
	Sensibilidade	87%	76,36% - 93,77%	95%	86,56% - 98,49%
	VPP	100%	-	99%	90,76% - 99,79%
Doadores saudáveis	Indeterminadas	4		0	
	Não reagente	80		83	
	Reagente	0		1	
	Testadas	84		84	
	Especificidade	100%	95,49% - 100,00%	99%	93,54% - 99,97%
	VPN	90%	82,87% - 94,23%	95%	88,89% - 98,18%
	AC	94%	88,77% - 97,18%	97%	92,72% - 98,96%
		HEK-293 IgM		HEK-293 - IgG	
CHIKV	Indeterminadas	8		0	
	Não reagente	14		5	
	Reagente	57		69	
	Testadas	79		74	
	Positividade	72%	68,16%-75,41%	93%	89,30-96,70%
	Sensibilidade	80%	69,14% - 88,78%	93%	84,93% - 97,77%
	VPP	98%	89,02% - 99,75%	97%	89,76% - 99,27%
Doadores saudáveis	Indeterminadas	9		2	
	Não reagente	74		79	
	Reagente	1		2	
	Testadas	84		83	
	Especificidade	99%	92,79% - 99,97%	98%	91,36% - 99,70%
	VPN	84%	76,76% - 89,43%	94%	87,13% - 97,36%
	AC	90%	83,62% - 94,13%	95%	90,92% - 98,17%
		<i>E. coli</i> IgM		<i>E. coli</i> -IgG	
CHIKV	Indeterminadas	14		2	
	Não reagente	8		4	
	Reagente	42		68	
	Testadas	64		74	
	Positividade	66%	57,56%-74,45%	92%	89,09-95,01%
	Sensibilidade	84%	70,89% - 92,83%	94%	86,38% - 98,47%
	VPP	71%	62,24% - 78,74%	99%	90,68% - 99,79%
Doadores saudáveis	Indeterminadas	20		1	
	Não reagente	33		55	
	Reagente	17		1	
	Testadas	70		57	
	Especificidade	66%	51,23% - 78,79%	98%	90,76% - 99,96%
	VPN	80%	67,95% - 88,92%	93%	84,60% - 97,37%
	AC	75%	65,34% - 83,12%	97%	91,25% - 98,74%

VPP: valor predito positivo, VPN: valor predito negativo, AC: acurácia. Amostras indeterminadas não foram consideradas para o cálculo de sensibilidade e especificidade. A taxa de positividade considera amostras que apresentaram resultado reagente diante de todas as amostras iniciais classificadas como positivas (considera amostras indeterminadas no número de amostras testadas).

Considerando todas as amostras com diagnóstico positivo para CHIKV pela FUNED, para a detecção de IgG, os valores de positividade/ sensibilidade foram de 93/95%, 93/93% e 92/94% para o kit comercial e ELISA com antígenos produzidos a partir de HEK-293T e *E.coli*, respectivamente. Ambos os antígenos também apresentaram altos valores de especificidade: 98% ambos ELISAS feito *in house* e 99% para o kit comercial. Em contraste, o desempenho dos diferentes antígenos no ensaio de detecção de IgM diferiram consideravelmente. A positividade/sensibilidade do teste que emprega a proteína CHIKV-E2 expressa em *E.coli* foi de 66/84%, enquanto a sensibilidade do ELISA usando o antígeno produzido nas células HEK293-T foi 72/80%. Quanto aos valores de especificidade, houve uma diferença significativamente maior: 66% e 99%, respectivamente. A acurácia nos ensaios de detecção de IgG foi de 97% para ambos os antígenos. Entretanto, para IgM, a proteína glicosilada apresentou 90% de acurácia contra apenas 75% no teste empregando o antígeno expresso em bactérias. Estes resultados são consistentes com os valores observados da AUC mostrados na Figura 14, que representam o desempenho geral de cada teste.

Os pacientes 62 e 67 (amostras 4576 e 4668), apesar do diagnóstico clínico e laboratorial realizados previamente, não apresentaram resultado reagente para nenhum dos testes realizados, incluindo com o kit comercial. Uma nova análise, desconsiderando essas amostras aumentaria a sensibilidade do produto comercial, HEK-293T e *E. coli* para: 89%, 83%, 88% para IgM e 97%, 96%, e 97% para IgG.

Uma correlação utilizando as amostras testadas (positivas e negativas) foi feita entre os métodos de ELISA apresentados neste trabalho (Figura 15). Para IgG, o maior coeficiente de correlação de Pearson (r) obtido, foi entre os ELISA *in house*, utilizando as proteínas CHIKV-E2 expressas em *E.coli* e HEK293-T ($r=0,9065$). As correlações entre os resultados obtidos por essas proteínas e o kit comercial apresentaram coeficientes muito próximos ($r=0,7662$ no caso da correlação com *E. coli* e $r=0,7799$ com HEK293-T). Para IgM, a melhor correlação foi entre o ELISA de HEK293-T com o kit comercial ($r=0,7970$). A correlação *E.coli* e HEK293-T retornou um coeficiente $r=0,6367$ e para *E.coli* e kit comercial $r=0,5570$.

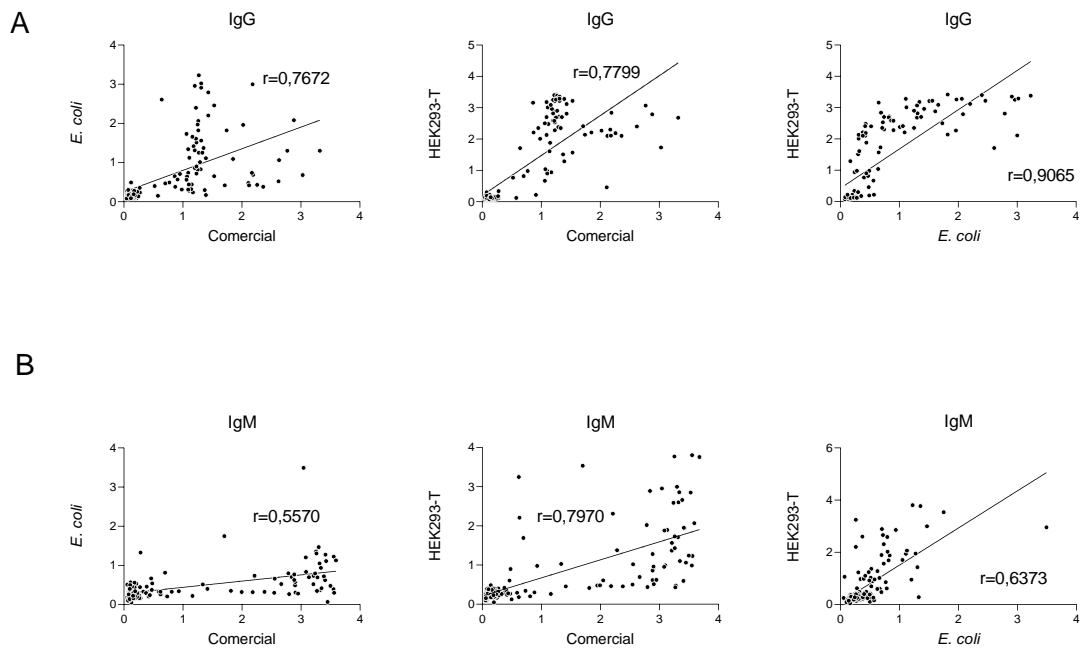


Figura 15-Correlação entre os métodos de ELISA apresentados neste trabalho utilizando amostras positivas e negativas para CHIKV. Comparação (DO) entre o kit comercial, ELISA *in house* utilizando a proteína E2 feita em células HEK-293T, e ELISA *in house* utilizando a proteína CHIKV-E2 feita em células de *E.coli*, A: avaliação para detecção de IgG. B: avaliação da detecção de IgM.

A concordância entre os testes realizados foi avaliada pelo coeficiente Kappa (Tabela 3), sendo os mesmos comparados dois a dois e considerando as três categorias de classificação dos resultados: reagente (R) não-reagente (NR) e indeterminado (Ind). Para IgM a concordância entre o ELISA *in house* utilizando a proteína CHIKV-E2 de *E.coli* foi considerada razoável comparada tanto ao ELISA comercial ($K= 0,271$) quanto ao ELISA com HEK-293T ($K= 0,292$), ao passo que a proteína glicosilada apresentou uma concordância substancial ($K=0,707$) com o teste comercial. Para IgG, a concordância foi classificada como quase perfeita para ambos os antígenos comparados ao teste comercial ($K= 0,838$ e $K= 0,910$, *E. coli* e HEK-293T, respectivamente) e entre eles ($K= 0,808$).

Tabela 3-Análise da concordância entre os testes para CHIKV pelo coeficiente Kappa (K).

		Análises IgM			
		Comercial IgM			
		R	NR	Ind	Soma
<i>E. coli</i> IgM	R	38	21	10	69
	NR	5	38	17	60
	Ind	10	0	1	11
	Soma	53	59	28	140
		Kappa= 0,271(0,154-0,388)			

		Análises IgG			
		Comercial IgG			
		R	NR	Ind	Soma
<i>E. coli</i> IgG	R	65	1	1	67
	NR	3	54	2	59
	Ind	2	2	0	4
	Soma	70	57	3	130
		Kappa= 0,838 (0,751- 0,925)			

		Comercial IgM			
		R	NR	Ind	Soma
HEK-293T IgM	R	52	2	3	57
	NR	4	77	4	85
	Ind	2	9	0	11
	Soma	58	88	7	153
		Kappa= 0,707 (0,608 - 0,806)			

		Comercial IgG			
		R	NR	Ind	Soma
HEK-293T IgG	R	68	2	1	71
	NR	2	79	0	81
	Ind	0	2	0	2
	Soma	70	83	1	154
		Kappa= 0,910 (0,847 -0,974)			

		HEK-293-T IgM			
		R	NR	Ind	Soma
<i>E. coli</i> IgM	R	40	14	5	59
	NR	14	37	4	55
	Ind	7	18	3	28
	Soma	61	69	12	142
		Kappa= 0,292 (0,172 - 0,412)			

		HEK-293T IgG			
		R	NR	Ind	Soma
<i>E. coli</i> IgG	R	65	1	2	68
	NR	4	51	2	57
	Ind	2	2	0	4
	Soma	71	54	4	129
		Kappa=0,808 (0,714 - 0,901)			

Uma avaliação do índice global de cada método foi feita a partir da normalização dos mesmos (Figura 16). Para o kit comercial a mediana de IgM ficou em torno de 76% do índice global do teste e para IgG a mediana ficou em 37%. Para a proteína E2 de *E coli*, a mediana do ELISA de IgM ficou em 15% e de IgG ficou em 27% do índice global. Já para o ELISA com a proteína produzida em HEK-293T, a mediana de IgM ficou em 26% e de IgG ficou em 70% do índice global do método.

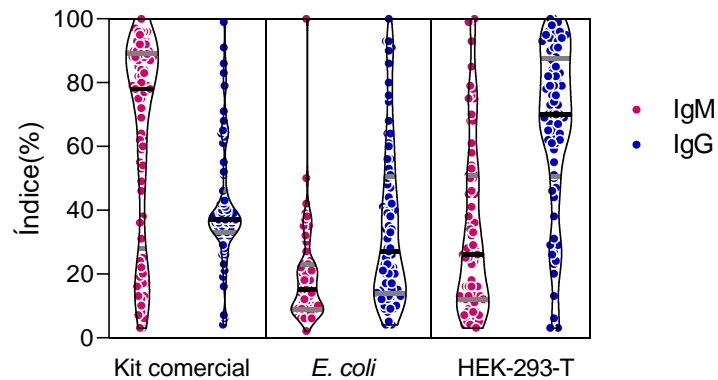


Figura 16: Índice percentual de cada método avaliado para a detecção de anticorpos do tipo IgM e IgG nas amostras de CHIKV. A mediana de cada teste está indicada em preto e os quartis em cinza.

Além dos dados globais de desempenho, foi feita uma comparação entre os pacientes classificados como de fase aguda (8-15 dias, G1) e crônica (>15 dias, G3) de acordo com as diretrizes tomadas pela FUNED, avaliando-se os índices obtidos de IgM e IgG em cada ELISA testado neste trabalho (Figura 17A). Amostras classificadas como de fase aguda apresentaram diferença significativa (teste de Mann-Whitney) em relação às de fase crônica para detecção de IgM pelo kit comercial ($p < 0,0001$) mas não apresentaram diferença significativa quanto a detecção de anticorpos do tipo IgG ($p = 0,5108$). Já para os ELISA feitos *in house* essa diferença foi significativa tanto para IgM quanto para IgG ($p < 0,05$ para os dados de IgM e IgG feitos com a E2 de *E. coli* e $p < 0,0001$, para IgM e IgG HEK-293T). Uma análise por correlação entre as amostras de cada paciente do estudo considerando as absorvâncias obtidas para IgM e IgG exibiu um coeficiente negativo para os três métodos avaliados (Figura 17B).

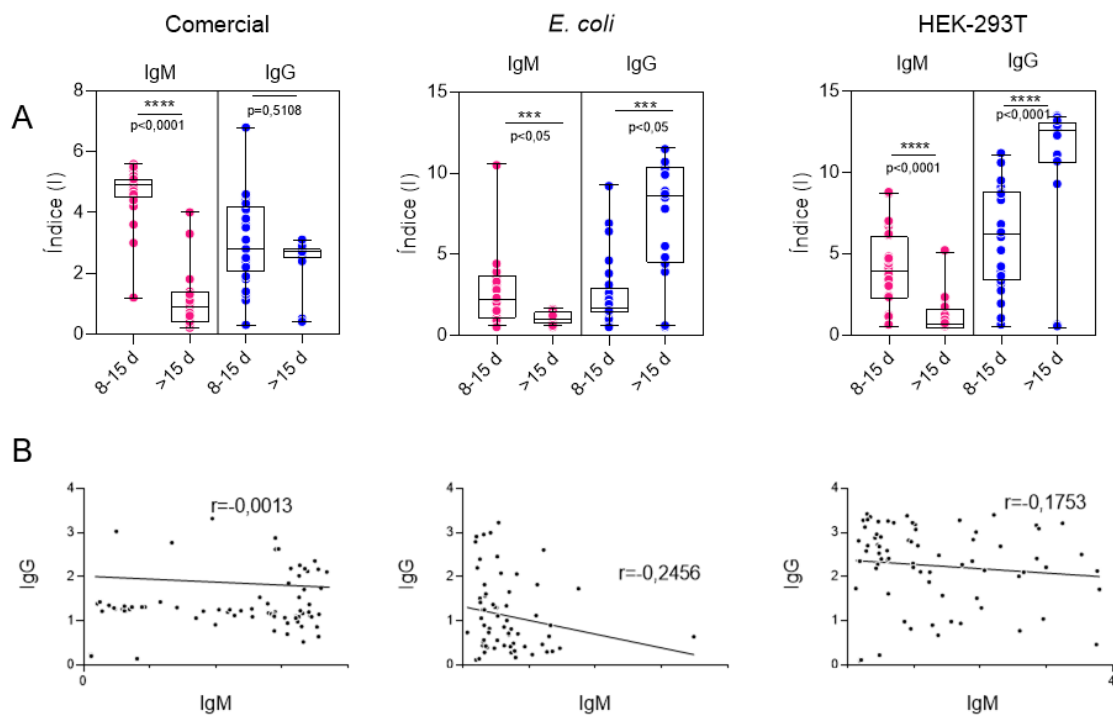


Figura 17: Avaliação da produção de anticorpos do tipo IgG e IgM pelos métodos de ELISA apresentados neste trabalho. Kit comercial, ELISA utilizando a proteína E2 feita em células HEK-293T, e ELISA utilizando a proteína E2 feita em células de *E.coli*. **A:** Avaliação da detecção de IgM e IgG para pacientes em fase aguda (8-15 dias após infecção) e crônica (>15 dias) para cada método avaliado. Foi aplicado o teste de Mann-Whitney e valores $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. **B:** Correlação entre as absorvâncias das amostras testadas para IgM e IgG para cada método avaliado.

Neste estudo, não foi possível fazer uma avaliação direta entre o tempo após o início dos sintomas de cada paciente, mas os dados individuais foram avaliados quanto aos índices de IgM e IgG de cada amostra obtidos pelos diferentes métodos de ELISA avaliados (Figura 18, dados no apêndice D). As amostras foram agrupadas de acordo com as diretrizes tomadas pela FUNED. Pela Figura 18 A é possível perceber que a linha de tendência de IgG do kit comercial se manteve praticamente constante, tendo uma queda do índice de IgM entre amostras de fase aguda e de fase crônica. Mas no caso deste kit, o percentual de IgM foi acima do percentual de IgG para quase todas as amostras testadas. Nos kits de ELISA *in house*, por outro lado, foi observada a tendência clássica de detecção maior de anticorpos do tipo IgM em amostras de fase aguda e IgG em amostras de fase crônica. É importante mencionar

que, para todos os casos, as amostras (eixo x) não estão organizadas em ordem crescente de dias após o aparecimento de sintomas nem de índice.

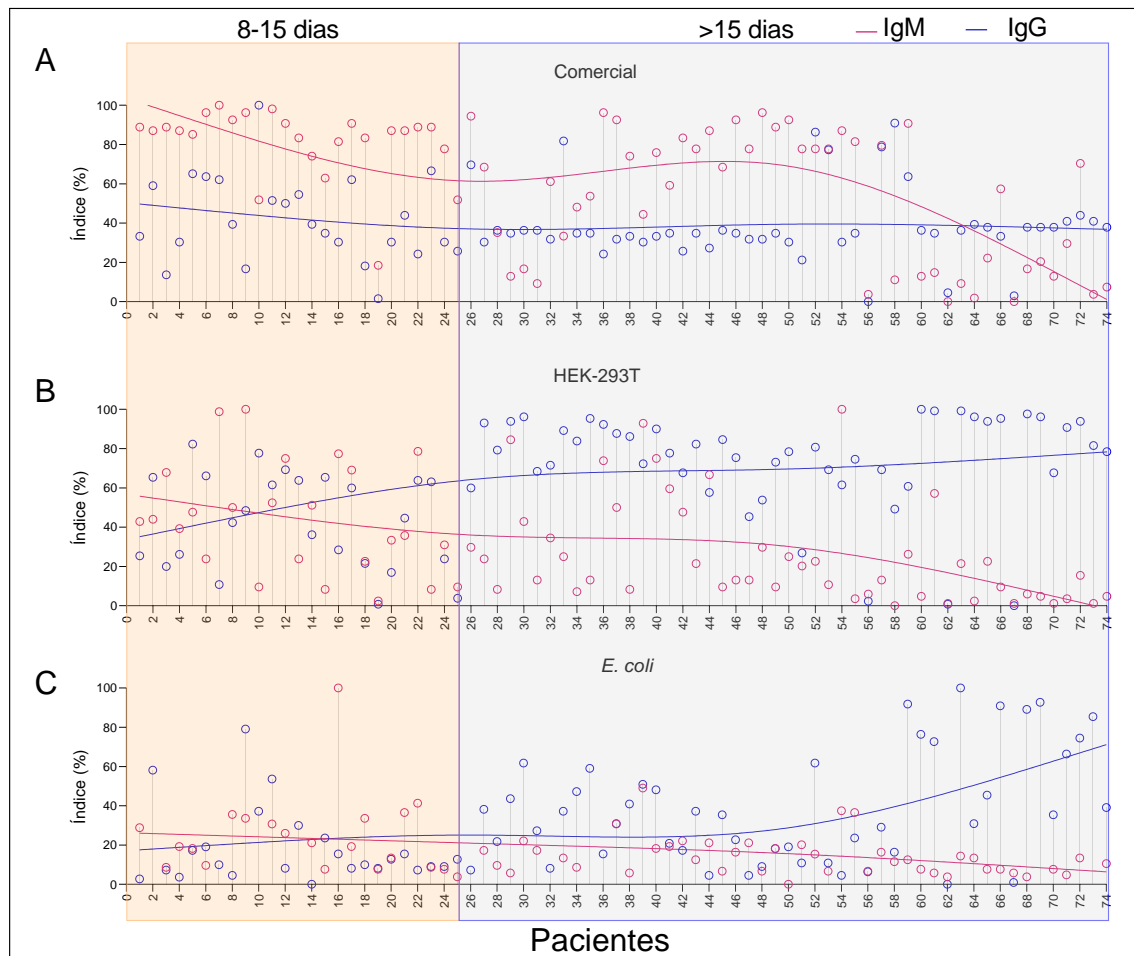


Figura 18: Curva de distribuição dos índices para IgM e IgG para os pacientes testados para CHIKV neste estudo. Os índices individuais IgM (esferas rosas) e IgG (esferas azuis) estão dispostas para cada paciente (eixo X), sendo avaliados pelo Kit comercial (A), ELISA utilizando a proteína E2 feita em células HEK-293T(B), e ELISA utilizando a proteína E2 feita em células de *E. coli* (C). As linhas de tendência foram construídas com base nos resultados individuais pela opção “Fit spline” do GraphPadPrism que permite ajustar uma curva sem um modelo pré-definido. Os pacientes estão agrupados em fase aguda (8-15 dias) e crônica(>15 dias), entretanto, não há relação de ordem crescente de dias pós início dos sintomas dentro de cada grupo.

4.5 PRODUÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL α -CHIKV-E2 EM COELHO

Para acompanhar a produção de anticorpos α -CHIKV-E2 em coelho foi feito um ELISA das coletas pré-imune (dia 0) e a cada 15 dias, utilizando proteína A conjugada à peroxidase como anticorpo secundário. Como pode ser visto na Figura 19A, com 30 dias já foi possível detectar uma alta produção de anticorpos, atingindo-se um platô em seguida. Após os 60 dias, foi feita uma punção cardíaca para coleta de maior

volume de sangue e o anticorpo foi purificado por afinidade utilizando-se uma coluna de proteína A. O resultado da purificação foi analisado por SDS-page (Figura 19B), sendo possível a visualização de duas bandas (cadeias leves próximas a 25 kDa e da cadeia pesada próxima 50 kDa)(JANEWAY *et al.*, 2001). O anticorpo purificado foi quantificado (concentração 2,9 mg/mL) e apresentou um rendimento de 7mg por litro de sangue coletado.

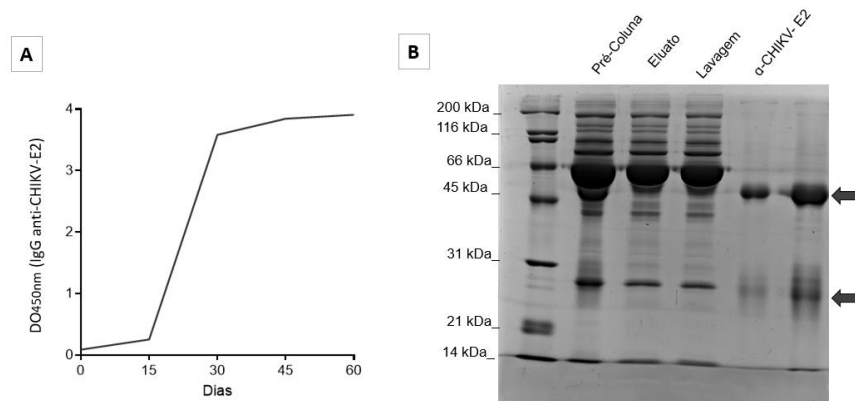


Figura 19: Produção de anticorpo policlonal α -CHIKV-E2. A: Absorbância (DO 450 nm) de IgG anti-CHIKV-E2 em função do tempo, em ELISA. B: Purificação do anticorpo por coluna de proteína A, sendo possível a visualização de duas bandas (cadeia leve próxima a 25 kDa e cadeia pesada próxima a 50 kDa).

5 DISCUSSÃO

Neste capítulo, foi descrita a produção de duas proteínas de arbovírus para serem utilizadas em plataformas de diagnóstico sorológico: CHIKV-E2 e ZIKV-E. Estas proteínas foram estudadas *in silico* e códon otimizadas para a expressão heteróloga em sistema procarioto. Ainda que sob diferentes condições de indução, ambas as proteínas foram expressas e purificadas de forma eficaz.

Para avaliação do potencial antigênico das proteínas, uma parceria estabelecida com a FUNED possibilitou a obtenção de soros positivos para arboviroses. Quanto às origens das amostras, verificou-se uma prevalência de casos de CHIKV na região do Vale do Rio Doce, enquanto infecções por DENV foram em sua maioria da região Metropolitana de Belo Horizonte, e amostras de ZIKV foram encaminhadas à FUNED de várias regiões do estado. No período em que essas amostras foram coletadas (2017), além de Belo Horizonte, a cidade de Governador Valadares apresentou cocirculação das três arboviroses e já havia apresentado notificação para tais infecções em anos anteriores. É importante lembrar que a cidade é uma importante interposição ligando as regiões Sul à Nordeste do país, e que foi um dos grandes focos de ZIKV em 2016 (DE ALMEIDA; ALVES, 2020).

Na avaliação dos dados clínicos e epidemiológicos das amostras utilizadas neste estudo, os principais sintomas relatados pelas fichas clínicas para os pacientes soropositivos para CHIKV foram: febre (80,6%), artralgia intensa (73,6%) e dor de cabeça (70,8%). Com exceção da artralgia, esses também foram os principais sintomas apresentados em pacientes com DENV (66,7% para ambos) (Tabela 1). Este fato, reforça mais uma vez a importância do diagnóstico diferencial, já que a incidência de sintomas como febre e dor de cabeça são muito comuns nestas e em outras infecções (arbovirais ou não). Este estudo foi publicado em BAGNO *et al.*, 2019 (*J.Clin. Virol.*).

A avaliação da capacidade das proteínas produzidas de atuarem como antígenos em ensaios de ELISA foi realizada utilizando soros caracterizados previamente por produtos diagnósticos comerciais. A proteína ZIKV-E não apresentou potencial de diferenciação entre soros positivos e negativos em plataforma ELISA. Em contrapartida, a proteína recombinante de CHIKV foi capaz de discriminar

significativamente os pacientes infectados dos indivíduos saudáveis sugerindo ser uma boa candidata para o diagnóstico sorológico, sendo sua avaliação em plataforma ELISA publicada em BAGNO *et al.*, 2019 (*Data in Brief*).

Além disso, foi possível comparar o desempenho de dois antígenos CHIKV-E2, um produzido em células *E. coli* BL21 (DE3) (não glicosilado) e outro produzido em células de mamíferos HEK-293T (glicosilado). Para a detecção de IgG anti-CHIKV, foi utilizada a mesma concentração de proteína por poço e a mesma diluição de soros, gerando desempenhos equivalentes nos testes para ambos os antígenos recombinantes. Estes resultados sugerem que, para um ELISA anti-CHIKV IgG indireto, o antígeno produzido em sistema procarioto tem desempenho semelhante ao da proteína expressa nas células dos mamíferos. Portanto, o antígeno CHIKV-E2 fabricado em *E. coli* representa a melhor opção de custo-benefício uma vez que sistemas de expressão procariotos são geralmente a primeira opção para produção de proteínas recombinantes devido ao seu baixo custo, crescimento rápido e boa produtividade (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

Por outro lado, a proteína glicosilada produzida em células HEK-293T apresentou uma melhora significativa na detecção de anticorpos anti-CHIKV IgM quando comparada ao mesmo antígeno produzido em *E. coli* e tendo como referência o kit comercial. Isso pode ser explicado primeiramente pelo fato de que imunoglobulinas do tipo M possuem menos afinidade que as do tipo G e, portanto, são propensas a reconhecerem menos as proteínas que não contêm características moleculares que se assemelham aos antígenos contra os quais foram originados (como resíduos de glicano) (Honjo *et al.*, 2002). Além disso, existem evidências sugerindo que os anticorpos da classe IgM têm uma tendência especial a reconhecer antígenos glicosilados (STERNER *et al.*, 2016).

A comparação entre os métodos de ELISA apresentados neste trabalho também demonstraram alto grau de correlação (Figura 15) entre a absorbância das amostras testadas com ambas as proteínas CHIKV-E2 (a produzida em *E. coli* e a produzida em HEK293-T).

Segundo o fabricante comercial, o kit anti-CHIKV-IgG (Euroimmun) utiliza proteínas estruturais recombinantes, o que não esclarece qual(is) antígenos são utilizados (podendo ser uma combinação). Isso pode justificar uma menor correlação

entre os ELISA feitos *in house* e o comercial, já que pacientes podem responder de forma diferente para cada antígeno. Além disso, o fato de que ELISA feitos *in house* utilizaram as mesmas formulações, sendo essas diferentes das do fabricante comercial, também podem ter contribuído para os resultados observados para a correlação entre os métodos para detecção de IgG.

No caso de IgM, no entanto, essas diferenças parecem estar associadas principalmente a antigenicidade de cada método. Diferentemente de IgG, um maior coeficiente de correlação foi obtido entre ensaios realizados utilizando o kit comercial e a proteína produzida em HEK-293T. Foi visto que para IgM a proteína glicosilada apresentou um maior potencial antigênico quando comparada a proteína não glicosilada e isso parece ter afetado o grau de correlação e a concordância entre as mesmas (avaliados pelo coeficiente de correlação, r , e Kappa, K , respectivamente).

Para IgG os coeficientes Kappa entre os testes foram todos acima de 0,80, o que representa uma concordância quase perfeita, ao passo que as comparações envolvendo o ELISA com a proteína de procaríoto foram de concordância leve ($0,20 < K < 0,39$). Ainda assim, o coeficiente de correlação entre os ELISA *in house* (maior coeficiente obtido para IgG) foi consideravelmente maior ($r=0,9065$) quando comparado ao melhor resultado de correlação para IgM (ELISA de HEK293-T com o kit comercial, $r=0,7970$), o que demonstra que os métodos de detecção de IgG estão em condições mais assertivas que os métodos para IgM.

Quando se avalia o tempo após o início dos sintomas, amostras classificadas como de fase aguda (8-15 dias) apresentaram diferença significativa em relação às de fase crônica (> 15 dias) para detecção de IgM pelo kit comercial, mas não apresentaram diferença significativa quanto a detecção de anticorpos do tipo IgG. Já para os ELISA feitos *in house* essa diferença foi significativa tanto para IgM quanto para IgG (Figura 17 A). Para os três métodos avaliados, houve uma diminuição na média dos índices de IgM quando comparado o grupo de fase aguda e fase crônica, como esperado (pelas diretrizes do Ministério da Saúde). No caso de IgG, os índices aumentaram entre a fase aguda e crônica para os ELISA *in house*, mas não apresentaram diferença entre esses dois grupos avaliados pelo teste comercial. A avaliação entre as absorbâncias para IgM e IgG de cada amostra positiva testada mostrou não haver correlação entre os índices de IgM e IgG para os métodos

utilizados(Figura 17 B).Neste estudo, não foi possível fazer uma avaliação direta entre o tempo após o início dos sintomas de cada paciente, mas pela Figura 18 foi possível avaliar os índices de IgM e IgG de cada amostra testada pelos diferentes métodos. De maneira geral, o teste comercial apresentou uma distribuição global de IgM maior que IgG, enquanto os ELISA *in house* apresentaram índices maiores para IgG que IgM, conforme observado na Figura 16.

Alguns testes comerciais estão disponíveis para detecção de anticorpos IgM anti-CHIKV. A maioria(com exceção do kit Euroimmun, CTK e SD- Quadro 2), são do formado de μ -captura (MAC-ELISA) e, dentre oito testes avaliados pela CDC apenas três tiveram desempenho aceitável (JOHNSON *et al.*, 2016). Um ensaio no formato MAC-ELISA, desenvolvido pelo CDC, usa o vírus inteiro como antígeno. Apesar da alta sensibilidade, a desvantagem desse tipo de teste é que a inativação completa das partículas de CHIKV sem perda de propriedades antigênicas requer irradiação gama e liofilização para armazenamento a longo prazo(GOODMAN *et al.*, 2014). Conseqüentemente, o custo da produção de antígeno a partir da cultura de CHIKV pode ser alta, e muitos dos ELISA disponíveis comercialmente apresentam de fato um custo elevado (ERASMUS *et al.*, 2015). Testes para detecção de IgM por μ -captura utilizando antígenos recombinantes ainda serão testados no CT-Vacinas.

As glicoproteínas são um dos principais componentes dos vírus patogênicos têm papéis importantes na infecção, imunidade e são fundamentais para uma ampla gama de processos moleculares e celulares(CIFUENTES-MUÑOZ *et al.*, 2014). Glicoproteínas recombinantes produzidas nas células eucarióticas são corretamente glicosiladas e provavelmente retêm epítomos lineares e não lineares que podem ser facilmente reconhecidos por uma ampla gama de anticorpos específicos(VARKI; GAGNEUX, 2017). Dessa forma, o uso de tais proteínas pode resultar em sistemas de diagnóstico com maiores sensibilidades e/ou especificidades. No entanto, essas proteínas são mais complexas de produzir em escala industrial e são mais caras ao chegar ao mercado(TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2019).

Por outro lado, as proteínas recombinantes produzidas por bactérias são muito mais simples, mais baratas e geralmente propensas a serem obtidas em maiores quantidades quando comparadas às proteínas produzidas em sistemas eucariotos. A falta de modificações pós-traducionais em bactérias, entretanto, pode

gerar proteínas que são menos eficientemente reconhecidas por anticorpos específicos, particularmente quando a proteína original é glicosilada. Isso pode resultar na perda de especificidade e/ou sensibilidade quando essas proteínas são usadas em sistemas de diagnóstico (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

Portanto, apesar das vantagens e desvantagens de cada sistema de expressão, a escolha de usar proteínas recombinantes produzidas em eucariotos ou procarióticos deve ser uma decisão tomada empiricamente, considerando uma equação que inclui custo, facilidade de produção e desempenho geral dos testes que empregam cada proteína. A comparação dos testes produzidos com a proteína E2 produzida em vetores procariotos e eucariotos foi publicada durante o desenvolvimento desta tese (BAGNO *et al.*, 2020 - *Viruses*).

6 CONCLUSÃO

Os resultados do ELISA utilizando a proteína ZIKV-E, revelaram baixa acurácia, sugerindo a necessidade de uma outra estratégia para obtenção de um antígeno capaz de ser empregado em plataformas de diagnóstico sorológico. Dessa forma, decidiu-se por não prosseguir com mais ensaios envolvendo esta proteína e tentar uma nova abordagem de expressão, como será abordado no Capítulo IV.

Analisando o desempenho do antígeno CHIKV-E2 produzido em *E. coli* e comparando-o a mesma proteína produzida em células HEK-293T, constatou-se que o segundo apresentou um desempenho melhor em ELISA para detecção de anticorpos IgM anti-CHIKV. Em contrapartida, para a detecção de IgG, o desempenho de ambos foi muito próximo, sendo o antígeno produzido em *E. coli* considerado preferencial por ser uma opção de melhor custo-benefício. Este mesmo antígeno, utilizado para a construção de protótipos de ELISA e teste rápido, será descrito nos Capítulos II e III, respectivamente.

CAPÍTULO II

Prototipagem do kit de ELISA para detecção de infecções pelo vírus Chikungunya

“Tudo o que nos aparece e nos confronta é um aspecto de nós mesmos. No momento em que acolhemos isso, nós nos transmutamos, porque somos seres em transformação.”

Monja Coen- O inferno somos nós (2018).

1 INTRODUÇÃO

1.1 VALIDAÇÃO E PROTOTIPAGEM

No capítulo I, foi apresentado um teste ELISA capaz de detectar com eficiência pacientes soropositivos para o CHIKV, distinguindo-os de indivíduos negativos. No entanto, mais do que a descrição de um novo teste, a validação para obtenção de protótipo adequado à produção em larga escala é tão essencial quanto o seu desenvolvimento. Esta é uma etapa importante para que o produto seja considerado passível de transferência da academia para o setor produtivo, e conseqüentemente, para o mercado.

No CT-Vacinas, uma vez que determinado antígeno apresente um rendimento satisfatório, além de resultados promissores de sensibilidade e especificidade em ELISA, ele é aplicado nas etapas subsequentes de validação e obtenção de protótipo adequado para transferência tecnológica e comercialização. Dentre os antígenos produzidos, aquele que se mostrou promissor e que foi obtido em quantidade suficiente para a realização dos demais testes, até o momento, foi a proteína CHIKV-E2 expressa em sistema procarioto. Ela foi o antígeno utilizado em todos os ensaios que serão apresentados neste capítulo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a validação analítica e avaliação do protótipo do kit de ELISA desenvolvido para detecção de anticorpos IgG anti-CHIKV.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Avaliar parâmetros de precisão do protótipo proposto.
- ii. Avaliar a especificidade e sensibilidade analítica e a ação de possíveis interferentes do teste.
- iii. Estabelecer os controles (positivo e negativo) a serem utilizados.
- iv. Estimar a estabilidade de todo o conjunto de reagentes (kit completo)

3 METODOLOGIA

3.1. VALIDAÇÃO E ANÁLISE DE PROTÓTIPO

O ELISA para detecção de anticorpos do tipo IgG anti-CHIKV foi validado com base nas atuais recomendações bioanalíticas internacionais. Foram testados parâmetros de repetitividade, reprodutibilidade e estabilidade para avaliar o potencial do teste como um produto público e/ou comercial (BORMAN; ELDER, 2017). Para minimizar variações na sensibilização da fase sólida, esta etapa foi realizada em plataforma de dispensação automática (Biolisa Washer Plus, Quibasa) em uma indústria de produção de produtos para diagnóstico. As placas foram sensibilizadas, bloqueadas e após descarte da solução de bloqueio, foram armazenadas em estufa de secagem a 37°C por 4h, sendo posteriormente embaladas a vácuo. O protocolo foi o mesmo aplicado nos ensaios do capítulo I (soluções descritas no APÊNDICE D) com exceção do conjugado que, para a implementação do controle constituído por anticorpo policlonal de coelho teve que ser substituído por proteína A conjugada à peroxidase (Merck, Ref.:18-160, diluição 1:10.000 em diluente Moss). As placas e soluções previamente preparadas foram armazenadas entre 2-8°C até o momento de uso.

3.1.1 Análise de desempenho

Amostras pré-caracterizadas (52 amostras positivas para CHIKV e 54 amostras negativas para CHIKV) foram avaliadas utilizando o protótipo e comparadas a um produto comercial (Ref. EI 293a G, Euroimmun). O *cut-off* foi avaliado com base na fórmula ($M_{neg}+3DP$) e comparado à curva ROC. O índice de cada amostra foi calculado pela razão entre a absorbância e o *cut-off*. Os resultados foram classificados de acordo com o índice (Conforme descrito no Capítulo I, item 3.6.1) e o desempenho do teste foi avaliado pela curva ROC e pelo índice baseado na fórmula descrita.

3.1.2 Precisão

A precisão é definida como: "A proximidade da concordância entre resultados de testes independentes obtidos nas condições estipuladas" (ISO 5725-1, 1994). De acordo com a ISO 5725, quando um procedimento de medição padronizado é adotado

em unidades de teste idênticas, sob as mesmas circunstâncias (mesmo operador, laboratório, máquina, ambiente, tempo, etc.), qualquer variação pode ser atribuída a um erro aleatório e uma medida deste tipo de variabilidade é denominado como repetitividade. Por outro lado, se o procedimento de medição padronizado é usado em circunstâncias diferentes, mas em unidades de teste idênticas, qualquer variabilidade devido a estas circunstâncias são vistas como reprodutibilidade. "Unidades idênticas" podem ser considerados os reagentes ou amostras de um mesmo lote (DEUTLER, 1991).

As definições de repetitividade e reprodutibilidade podem depender de decisões locais sobre quais fontes de variabilidade incluir ou excluir (HUNTER, 1982). De forma mais simplificada, a reprodutibilidade pode ser definida como a precisão entre dois laboratórios, mas também representa a precisão do método nas mesmas condições operacionais por um curto período de tempo (FDA, 2018b).

Andreasson e colaboradores definiram três tipos diferentes de "precisão", dependendo das condições estipuladas, são elas: repetitividade (r), precisão intermediária (R_w) e reprodutibilidade (R). A repetitividade às vezes é chamada de precisão dentro da corrida ou dentro do dia, enquanto a precisão intermediária também é conhecida como repetitividade entre as corridas ou entre os dias (ANDREASSON *et al.*, 2015).

A repetitividade do produto ELISA CHIKV-E2 foi avaliada mantendo-se o máximo de fatores constantes (laboratório, técnico, instrumento, lote dos reagentes) num mesmo dia e num único ensaio, com três amostras diferentes (sendo 16 repetições cada). Para precisão intermediária, essas mesmas amostras foram avaliadas, da mesma forma, em três dias diferentes.

A precisão é um parâmetro difícil de ser quantificado, sendo mais comumente relatado a sua relação inversa, a imprecisão. Como medidas de imprecisão, foram calculados o Desvio Padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV%) para cada condição (repetitividade e precisão intermediária) (ANDREASSON *et al.*, 2015), sendo esperado um % CV <20% (FDA, 2018b).

Além disso, foi feito um estudo para avaliar a precisão entre lotes. Três lotes diferentes do produto foram preparados em dias diferentes e testados simultaneamente, avaliando-se quatro amostras (duas positivas e duas negativas para

CHIKV). Os resultados foram comparados pelo teste Kruskal-Wallis, com $P > 0.05$ considerado não significativo (KRUSKAL *et al.*, 2012).

A avaliação da reprodutibilidade no contexto de análise do protótipo ELISA CHIKV-E2 foi associada à validação externa, sendo detalhada no item 3.1.6.

3.1.3 Especificidade analítica / Interferentes

A reatividade cruzada é uma interferência comum nos imunoenaios, causada por uma influência inespecífica de substâncias presentes em uma determinada amostra, que se assemelham estruturalmente ao analito (têm epítomos semelhantes ou iguais), resultando em super ou subestimação de resultados (KROLL; ELIN, 1994).

Devido à sua relação filogenética, a reatividade cruzada pode ocorrer entre vírus intimamente relacionados, como flavivírus (DENV e ZIKV) e *Alphavirus* (CHIKV), que circulam no território brasileiro (ESPÓSITO; DA FONSECA, 2015; RATHORE; ST. JOHN, 2020). Além disso, pacientes com níveis aumentados de fator reumatoide (FR), podem apresentar resultados falso-positivos devido à ligação deste anticorpo ao domínio constante Fc de complexos antígeno-anticorpo (SCHIETTECATTE; ANCKAERT; SMITZ, 2012).

Soros humanos que apresentam características e condições que pudessem interferir no ensaio para CHIKV foram investigados, como segue:

- Amostras positivas para CHIKV (IgG) (controle positivo) (n=8).
- Amostras negativas para CHIKV, DENV e ZIKV (controle negativo) (n=8).
- Amostras positivas para ZIKV (IgG) e negativas para CHIKV (n=8).
- Amostras positivas para DENV (IgG) e negativas para CHIKV (n=5).
- Amostras com concentrações aumentadas de FR e negativas para CHIKV (n=8).

A reatividade cruzada e os interferentes foram avaliadas pela análise de absorbâncias (OD_{450nm}) e índices (I) das amostras.

3.1.4 Padronização dos controles

O anticorpo policlonal α -CHIKV-E2 purificado (conforme descrito no capítulo 1), foi dialisado em PBS 1X, liofilizado (24h, Vácuo 15 mBar e -54°C) e solubilizado em diluente estabilizante (Moss) em volume quatro vezes menor que o original (concentração 4X). A partir desta solução preparou-se diluições seriadas (1:100 a 1:4.000 em diluente Moss) para determinar as diluições ideais para os controles positivo e negativo. A partir dessa determinação, testou-se a estabilidade deste controle diluído por 21 dias ($2-8^{\circ}\text{C}$ e 37°C , ver *Ensaio de degradação acelerada*, no item 3.1.5).

3.1.5 Estabilidade

A estabilidade de um produto refere-se à capacidade de manter a qualidade e a eficiência do produto durante o prazo de validade. Como muitos fatores inesperados podem existir durante o transporte ou armazenamento, a estabilidade sob essas condições deve ser estimada.

A degradação na temperatura do armazenamento pode ser muito lenta para que os ensaios de estabilidade em tempo real sejam práticos a fim de se definir se um produto é apto para comercialização por um determinado período. Nesses casos, os estudos de degradação acelerada são adequados para obter uma previsão relativamente rápida da estabilidade.

Ensaio de degradação acelerada: O ensaio é realizado a 37°C para acelerar reações químicas e/ou físicas dos reagentes proteicos e pode ser usado para prever a vida útil dos reagentes que são armazenados em condições apropriadas. As placas sensibilizadas e todos os demais reagentes foram mantidos a 37°C por 21 dias (equivalente a 2,3 anos a $2-8^{\circ}\text{C}$) (MATEJTSCHUK; PHILLIPS, 2007). Os ensaios foram realizados conforme padronizado anteriormente em quatro momentos (dias: 0, 7, 14 e 21) e o índice (I) foi avaliado.

Ensaio de estabilidade em tempo real: um lote preparado e testado em agosto de 2019 foi armazenado entre $2-8^{\circ}\text{C}$ e novamente testado em agosto de 2020 (12 meses após o preparo).

O produto pode ser considerado estável se a recuperação média varia entre 80-120%, o que significa uma taxa de variação de $\pm 20\%$ comparado a referência inicial (Dia 0)(FDA, 2018b).

3.1.6 Validação externa do produto ELISA CHIKV-E2

Com intuito de validar o produto ELISA CHIKV-E2 em outra instituição, foi estabelecida uma parceria com o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos de Bio-Manguinhos (FIOCRUZ-RJ). O kit completo (placa e demais reagentes) foi enviado ao Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED) e o teste foi realizado utilizando um banco de soros previamente caracterizados naquela instituição. Foram avaliadas 142 amostras no total, sendo: n=51 negativas para CHIKV, n=74 positivas para CHIKV, n=8 positivas para ZIKV e n=9 positivas para DENV. Os resultados foram analisados e comparados ao observado no CT-Vacinas, aplicando o teste Chi-quadrado com intervalo de confiança de 95%.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DE DESEMPENHO

Após a validação do protótipo de ELISA para CHIKV, não foi observada variação quanto a classificação dos resultados entre o método do *cut-off* calculado ($M_{neg}=0,194$, $DP=0,100$, *cut-off* 0,506) e o gerado pela curva ROC (0,407, de área 0,998). Considerando a primeira análise, das 50 amostras positivas pelo produto comercial, 47 apresentaram resultado reagente ($\geq 1,1$), nenhuma apresentou resultado não reagente e três apresentaram resultado indeterminado ($0,9 \leq I < 1,1$). Das 54 amostras negativas testadas, 52 apresentaram resultado não reagente ($I < 0,9$) e duas apresentaram resultado reagente. Considerando a análise por curva ROC, das 50 amostras soropositivas testadas, 49 apresentaram resultado reagente, nenhuma apresentou resultado não reagente e uma foi classificada como amostra indeterminada. Das 54 amostras negativas testadas, 50 apresentaram resultado não reagente, duas apresentaram resultado reagente e duas apresentaram resultado indeterminado. Portanto, a sensibilidade, especificidade e acurácia de ambos os testes foram de 100%, 96%, e 98%, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4- Desempenho do ELISA para CHIKV utilizando a proteína E2 e proteína A-HRP como conjugado

		Método <i>cut-off</i> : $M_{neg}+3DP(0,506)$				Método <i>cut-off</i> : Curva ROC (0,407)				
		CHIKV-E2				CHIKV-E2				
		R	NR	Ind.	Soma	R	NR	Ind.	Soma	
Comercial	R	47	0	3	50	R	49	0	1	50
	NR	2	52	0	54	NR	2	50	2	54
	Ind.	0	0	0	0	Ind.	0	0	0	0
	Soma	49	52	3	104	Soma	51	50	3	104
		Especificidade: 96 (87,3- 99,5) %				Especificidade: 96(86,7- 99,5) %				
		Sensibilidade: 100(92,4-100)%				Sensibilidade: 100(92,7-100)%				
		Positividade: 94 (83,4-98,8)%				Positividade: 96 (86,5-99,5)%				
		Acurácia: 98(93,6-99,8)%				Acurácia: 98(92,9-99,7)%				

R: reagente, NR: não reagente, Ind.: indeterminada. Amostras indeterminadas não foram incluídas no cálculo de sensibilidade e especificidade. A taxa de positividade considera amostras que apresentaram resultado reagente diante de todas as amostras iniciais classificadas como positivas (considera amostras indeterminadas no número de amostras testadas).

Neste ensaio, a média das absorbâncias das amostras negativas foi de 0,194 e o desvio padrão das mesmas foi de 0,100. Definiu-se por trabalhar com um controle

positivo com absorbância em torno de 2,4 e de um controle negativo em torno de 0,200 (Média das negativas) para compreender o cálculo: $Cut-off = (C^+) * DP + M_{neg}$, retornando um *cut-off* de 0,427, o que mantém os valores encontrados para sensibilidade e especificidade (Os resultados individuais estão dispostos no Apêndice E).

4.2 PRECISÃO

As absorbâncias de três amostras foram medidas 16 vezes por três dias consecutivos para testar a precisão do produto ELISACHIKV-E2. Os CV intra- e interensaio foram menores que 10% (Tabela 5), ficando abaixo do limite máximo recomendado ($CV < 20\%$) (FDA, 2018) demonstrando alta precisão dentro de um único lote do produto.

Tabela 5-Avaliação da precisão (repetibilidade e precisão intermediária) do ELISA para detecção de anticorpos anti-CHIKV-E2.

ID AMOSTRA	Média dos valores	Resultado	REPETIBILIDADE		PRECISÃO INTERMEDIÁRIA	
			DP _r	%CV _r	DP _{Rw}	%CV _{Rw}
C1857	0,116	NR (100%)	0,005	4,5	0,011	9,7
L8P	0,169	NR (100%)	0,006	3,5	0,010	6,0
4823	0,946	R (100%)	0,050	5,3	0,050	5,3

NR: não reagente, R: reagente

DP_r: Desvio padrão dentro da corrida; CV_r (%): Coeficiente de Variação dentro da corrida (%);

DP_{Rw}: Desvio padrão entre as corridas; %CV_{Rw}: Coeficiente de Variação entre as corridas (%).

Na análise de precisão entre lotes, três kits preparados previamente foram testados simultaneamente, e comparados com base nos índices obtidos para quatro amostras (duas positivas e duas negativas). Não houve diferença significativa (ns) entre os três lotes como demonstrado pela análise de significância ($p > 0,05$) (Figura 20).

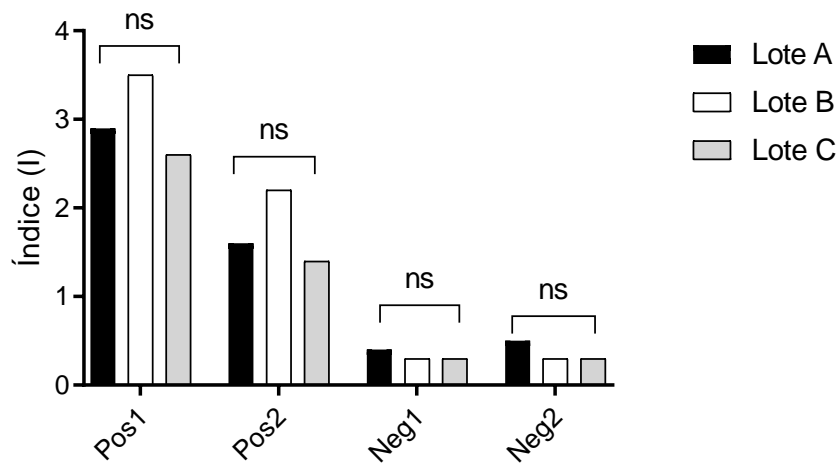


Figura 20- Avaliação da precisão entre lotes do ELISA CHIKV-E2. Não foi encontrada diferença significativa entre três lotes do produto considerando a análise pelo teste Kruskal-Wallis ($p=0,7434$).

ESPECIFICIDADE ANALÍTICA/INTERFERENTES

Para avaliar possíveis reatividades cruzadas, amostras positivas para DENV e ZIKV e amostras com Fator reumatoide elevado (FR+) foram testadas. Como observado na Figura 21, os interferentes avaliados não afetaram a capacidade do ELISA de distinguir pacientes soropositivos para CHIKV dos outros grupos.

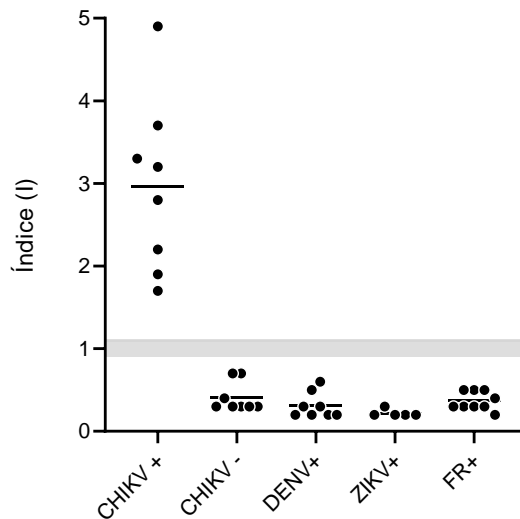


Figura 21- Estudo de reatividade cruzada / interferentes do kit ELISA CHIKV-E2. No mesmo ensaio, foram testadas amostras positivas para CHIKV e outros arbovírus (DENV e ZIKV) e amostras de concentração aumentada para fator reumatoide (FR).

4.3 PADRONIZAÇÃO DOS CONTROLES

Foi feita uma titulação do anticorpo policlonal (1:100 a 1:4000) para determinar as diluições ideais para os controles positivo e negativo. A partir deste resultado (dados não mostrados), selecionou-se as diluições 1:100, 1:200 e 1:300 para escolha do controle positivo e 1:4000, para o controle negativo. Foi avaliada a estabilidade dessas diluições por 21 dias (2-8 e 37°C). Para ambas as temperaturas, houve um aumento de absorvância para todas as diluições na leitura do sétimo dia. Isso já havia sido observado (no desenvolvimento de outros produtos) para o conjugado, fato que levou a adaptação do protocolo. Tanto para o conjugado quanto para o controle, foi determinado deixar a solução em repouso por 7 dias após produção, a fim de se obter a estabilização da mesma (MAGARI; MURPHY; FERNANDEZ, 2002). As diluições testadas apresentaram boa estabilidade ao comparar os resultados com e sem agressão acelerada (Figura 33). Foi determinada a diluição 1:200 (absorvância em torno de 2,4) para o controle positivo uma vez que o *cut-off* calculado a partir do mesmo mais se assemelhou ao *cut-off* determinado no item 4.1. A taxa de queda global do controle positivo foi de 14% e do negativo foi de 20%, sendo ambos considerados estáveis (FDA, 2018b).

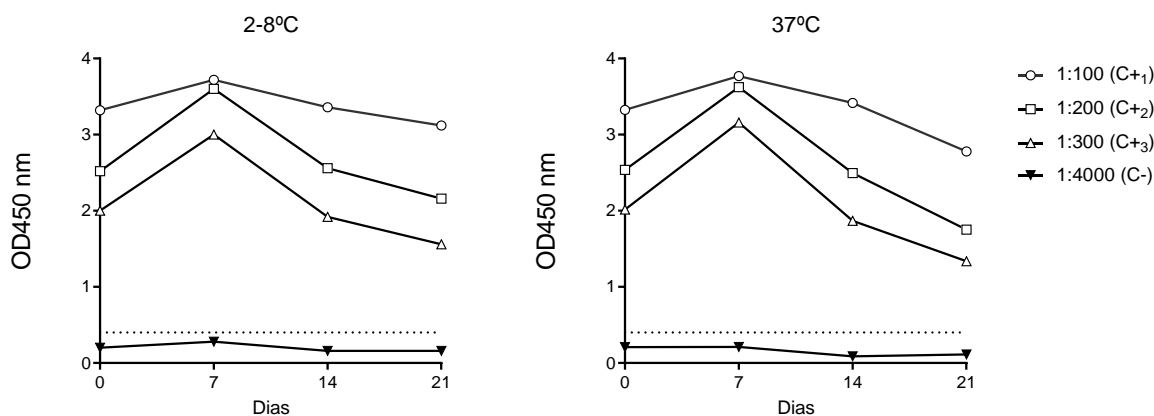


Figura 22- Teste de estabilidade a 2-8° C (sem agressão acelerada) e 37°C (com agressão acelerada) para definição dos controles. O policlonal anti-CHIKV-E2 foi diluído em diferentes concentrações e submetido teste de estabilidade com execução do ELISA a cada 7 dias.

4.4 ESTABILIDADE DO PRODUTO ELISA CHIKV-E2

Como intuito de avaliar a estabilidade, placas sensibilizadas com a proteína recombinante e bloqueadas foram armazenadas a 37°C durante 21 dias. Ao final do período de armazenamento (21 dias), as amostras não apresentaram alterações em sua classificação anterior (Tabela 6).

Tabela 6- Ensaio de degradação acelerada para o kit ELISA CHIKV-E2.

Amostra	Cut-off*	D0	D7	D14	D21	Taxa de queda		
		0,407	0,399	0,269	0,251	D7	D14	D21
	Classificação**	Índice						
4696	Pos	3,7	3,5	3,0	3,0	-5%	-19%	-20%
4907	Pos	1,3	1,2	1,1	1,1	-9%	-17%	-17%
L8P	Neg	0,7	0,6	0,6	0,6	-11%	-13%	-13%
450	Neg	0,4	0,4	0,4	0,3	0%	0%	-18%
Taxa queda global						-8%	-16%	-16%

Vermelho: resultado reagente; verde: resultado não-reagente.

*Calculado com base no controle positivo do teste $Cut-off = (C+ * 0,1) + 0,2$, valores encontrados no item 4.1.

**Kit comercial IgG (Euroimmun)

Além disso, o ensaio de estabilidade em tempo real demonstrou que o conjunto completo de reagentes foi estável por no mínimo 12 meses, em armazenamento a 2-8 °C, sendo que as amostras testadas não apresentaram resultado diferente da classificação inicial (Tabela 7).

Tabela 7-Ensaio de estabilidade em tempo real para o ELISA CHIKV-E2

Amostra	Classificação **	Agosto 2020	Agosto 2019	Taxa queda
		cut-off=0,290*	cut-off=0,430*	
		Índice		
GMF	Neg	0,6	0,5	-17%
MMF	Neg	0,5	0,4	-20%
A24	Neg	0,4	0,4	0%
M11S	Neg	0,8	0,8	0%
5046	Pos	5,6	5,6	0%
5078	Pos	2,9	2,7	-7%
5059	Pos	1,4	1,3	-7%
4810	Pos	1,7	2,0	18%
4913	Pos	2,6	3,0	15%
Taxa queda global				-2%

Vermelho: resultado reagente; verde: resultado não-reagente.

*Calculado com base no controle positivo do teste $Cut-off = (C+ * 0,1) + 0,2$, valores encontrados no item 4.1.

**Kit comercial IgG (Euroimmun)

Conforme demonstrado, os valores de absorvância dos soros testados permaneceram estáveis ao longo do tempo, com o percentual de queda sendo comparado ao recomendado por agências regulatórias ($\pm 20\%$; FDA, 2018), o que permite a detecção de resultados confiáveis durante toda a vida útil do produto.

4.5 VALIDAÇÃO EXTERNA

O teste de validação externa do sistema diagnóstico desenvolvido no CT-Vacinas foi executado nas instalações do Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED/Bio-Manguinhos). Resultados indeterminados foram desconsiderados do cálculo de sensibilidade e especificidade. Das 74 amostras positivas testadas, 67 apresentaram resultado reagente, duas apresentaram resultado indeterminado e cinco não reagiram, o que representa uma sensibilidade de 93%. Das 51 amostras negativas testadas, 46 apresentaram resultado não reagente, duas apresentaram resultado indeterminado e três reagiram, o que representa uma especificidade de 94%. Além disso, não apresentou reação cruzada com as amostras de Zika (oito amostras testadas) ou dengue (nove amostras testadas, sendo duas indeterminadas). O documento emitido pelo LATED pode ser encontrado no ANEXO C. Os valores de sensibilidade e especificidade obtidos em Bio-Manguinhos foram comparados aos resultados da validação interna do CT-Vacinas e não houve diferença estatística significativa pelo teste Chi-quadrado ($p=0,80107$).

5 DISCUSSÃO

Neste capítulo, foi apresentada a análise de um ELISA para detectar anticorpos do tipo IgG contra o CHIKV empregando a proteína recombinante CHIKV-E2, produzida conforme descrito no Capítulo I. Os resultados demonstraram que o teste desenvolvido tem o potencial necessário para ser produzido e aplicado ao sistema de saúde. Primeiramente, o protótipo apresentou altos valores de sensibilidade e especificidade tanto na validação interna (100% e 96%, respectivamente) quanto externa (93% e 94%, respectivamente). Esse desempenho determina uma acurácia altamente desejável. Além disso, não foi encontrada reatividade cruzada contra pacientes soropositivos para ZIKV e DENV ou pacientes com níveis aumentados de fator reumatóide.

Ao analisar os resultados de sensibilidade e especificidade individualmente (Apêndice E) foram obtidos resultados reagentes (R) para duas amostras classificadas como negativas, sendo a357 de caracterização inicial: NR- ZIKV (FUNED), NR-CHIKV (Euroimmun) e NR- DENV (Panbio), R-CHIKV(HEK293T) e 476: NR ZIKV (FUNED), NR CHIKV (Euroimmun) mas R DENV Panbio (embora testada previamente pela FUNED e classificada como negativa, dados não mostrados). Estes resultados não parecem estar relacionados a uma reatividade cruzada com outros arbovírus e, embora no último caso houve reatividade com o teste para DENV (Panbio), essa amostra tinha sido classificada como negativa para DENV pela FUNED, estando mais relacionada a um resultado falso-positivo. Como visto no estudo de reatividade cruzada, amostras classificadas como soropositivas para DENV e ZIKV não apresentaram reatividade com o kit de ELISA para CHIKV proposto neste estudo.

Quando comparado ao teste realizado no Capítulo I utilizando a proteína E2 (produzida em *E.coli*) e anti-IgG como conjugado, o teste apresentado neste capítulo (utilizando a mesma proteína como antígeno, mas proteína A ligada a peroxidase como conjugado e realizada em plataforma de dispensação automática) apresentou uma melhora na sensibilidade. As amostras 4617, 5059 (que no capítulo 1 tinham dado resultado não reagente) e 4829 (anteriormente indeterminada) apresentaram, com a nova proposta, um resultado reagente. Além disso, a amostra 4829 apresentou resultado não reagente tanto para o kit comercial quanto para o ELISA com a proteína produzida em HEK-293, apresentou resultado indeterminado para o teste de E2 de *E.*

coli no capítulo I e neste capítulo apresentou resultado reagente. Por outro lado, as amostras 4997 e 4601 apresentaram resultado indeterminado neste capítulo embora tivessem apresentado resultado reagente anteriormente.

Conforme solicitado pelas agências de regulamentação, foram examinados parâmetros de repetitividade, reprodutibilidade e estabilidade para avaliar o potencial do ELISA anti-CHIKV como um produto comercial. A repetitividade e reprodutibilidade (inter-ensaio) obtidas para o produto foram consideradas dentro do aceitável, com CV <10% para ambos os testes (FDA, 2018). As análises interensaios também foram consideradas satisfatórias, sem diferenças estatisticamente significativas entre três lotes. Considerando a grande variabilidade inerente aos métodos baseados em imunoenaios, esses resultados indicam características significativas de alta qualidade do ELISA anti-CHIKV proposto.

Um estudo de degradação acelerada foi realizado durante 21 dias a 37°C, o que equivale a 2,3 anos a 2-8°C (MATEJTSCHUK; PHILLIPS, 2007). A diminuição observada nos valores de absorbância está dentro dos níveis aceitáveis de variação para um teste de degradação acelerada (KOLOSOVA *et al.*, 2006; MEI *et al.*, 2012).

Considerando a baixa sensibilidade de testes comerciais disponíveis para a detecção de CHIKV (JOHNSON *et al.*, 2016) e a baixa acessibilidade em regiões subdesenvolvidas a técnicas mais robustas, como PCR e isolamento de vírus, este ensaio ELISA representa uma adição importante aos testes imunológicos atualmente disponíveis para o diagnóstico de infecções por CHIKV.

O teste para detecção de anticorpos anti-CHIKV apresentado neste trabalho teve seu desempenho equivalente ao de produtos comerciais, fabricados internacionalmente e de alto valor agregado. Como demonstrado, o produto proposto apresentou sensibilidade de 93-100% e especificidade de 94-96% considerando as validações interna e externa. Ao comparar produtos comerciais para o mesmo fim (detecção de IgG anti-CHIKV) com base numa classificação prévia de amostras analisadas pelo CDC (Atlanta, EUA), De Salazar encontrou, para os fabricantes Inbios e Euroimmun, uma sensibilidade de 93% e 100% e especificidade de 91% e 82%, respectivamente (DE SALAZAR *et al.*, 2017). Uma alta taxa de falsos positivos, relacionada a uma baixa especificidade do teste como citado, pode gerar custos desnecessários para o sistema de saúde e isso, num cenário de epidemia, pode

representar perdas significativas na economia do país. Além disso, outro problema é a incerteza que resultados falso-positivos geram em relação aos dados epidemiológicos oficiais. Tal incerteza pode prejudicar no longo prazo o desenvolvimento de políticas públicas de prevenção e tratamento das arboviroses.

Mendonza e colaboradores avaliaram os kits da Euroimmun e Abcam, e encontraram especificidade de 98% de para o primeiro, 100% para o segundo e sensibilidade de 96% para ambos (MENDOZA *et al.*, 2019). Apesar da boa acurácia, o estudo revelou uma reatividade cruzada do kit Euroimmun para IgG com amostras de ZIKV de 5,9% (o que não foi observado no kit proposto).

Existe uma diferença significativa no que diz respeito aos dados de especificidade do kit da Euroimmun entre o primeiro e segundo estudo citados (82 contra 100%) e essas variações podem estar relacionadas com variações lote a lote ou ainda estabilidade e problemas relacionados à importação dos mesmos.

Diante de uma epidemia, o diagnóstico diferencial das arboviroses para o manejo adequado dos pacientes é extremamente importante. A validação apresentada neste trabalho é uma etapa necessária antes que um teste ELISA em potencial possa atingir o status de pré-produção. Ressalta-se que a nacionalização de produtos biotecnológicos é extremamente estratégica para o país, visto que, infelizmente, o Brasil é um exportador de *commodities* e importador de tecnologias manufaturadas. A independência com relação a geração de produtos biotecnológicos, como o desenvolvido aqui, é um passo importante para a gestão de recursos e decisões voltadas à saúde pública.

6 CONCLUSÃO

O ELISA anti-CHIKV desenvolvido apresenta uma boa sensibilidade e especificidade, tendo uma ampla perspectiva de aplicação na clínica e sorovigilância do CHIKV.

O protótipo foi validado com base nas atuais recomendações bioanalíticas e está atualmente em processo de registro na autoridade sanitária e de saúde brasileira (ANVISA).

CAPÍTULO III

Desenvolvimento de um protótipo de teste rápido para Chikungunya

“A biologia vê o certo e o errado como a mesma cor sob uma luz diferente.”

Delia Owens- Um lugar bem longe daqui (2018).

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 IMUNOCROMATOGRAFIA DE FLUXO LATERAL (IFL)

Um ensaio de fluxo lateral é composto por um sistema cromatográfico, que envolve a separação dos componentes de uma mistura com base nas diferenças em seu movimento por uma membrana, e uma reação imunoquímica (entre anticorpo-antígeno). A IFL baseia-se no movimento da amostra na membrana por capilaridade. Ensaio padrão de IFL possuem quatro áreas principais: suporte para a amostra, suporte para o conjugado, membrana (geralmente de nitrocelulose) e filtro absorvente (BAHADIR; SEZGINTÜRK, 2016) (Figura 23).

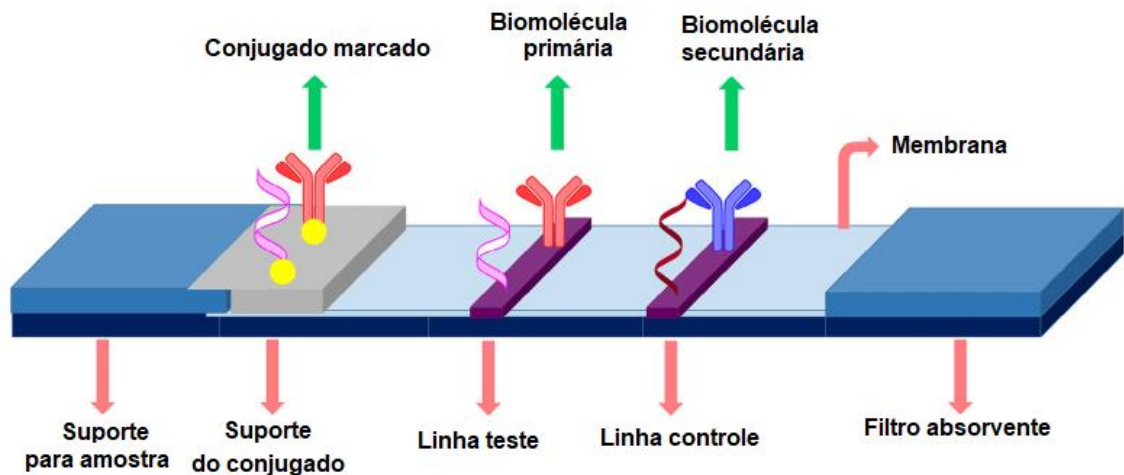


Figura 23- Componentes principais de um teste imunocromatográfico de fluxo lateral (IFL). Adaptado de Bahadır & Sezgintürk (2016).

A função de cada componente do teste e algumas considerações sobre eles são descritas a seguir (SAJID *et al.*, 2015).

i. Suporte para amostra: feito de celulose e/ou fibra de vidro, sendo este o local de aplicação da amostra. Sua função é carrear a amostra para os outros componentes do IFL, de forma suave contínua e homogênea.

ii. Suporte do Conjugado: local onde ficam as moléculas marcadas que irão reconhecer os componentes da amostra. Este material deve liberar imediatamente o conjugado marcado quando entrar em contato com a amostra líquida em movimento. Além disso, o conjugado marcado deve permanecer estável durante toda a vida útil

da tira de fluxo lateral. Os principais materiais utilizados para fazer o suporte do conjugado são: fibra de vidro, celulose e poliésteres.

iii. Membrana de nitrocelulose: é altamente crítica na determinação da sensibilidade de IFL, sendo fáceis de usar além de possuírem um bom custo-benefício e oferecerem alta afinidade por proteínas e outras biomoléculas. Nela, encontram-se as linhas teste e controle. As membranas de nitrocelulose estão disponíveis em diferentes taxas de capilaridade, sendo que testes que exigem maior sensibilidade devem utilizar membranas de baixa capilaridade (fluxo mais lento).

iv. Filtro absorvente: atua como um coletor, que ajuda a manter a taxa de fluxo do líquido sobre a membrana e interrompe o refluxo da amostra. Sua capacidade de adsorção e de reter o líquido pode desempenhar um papel importante nos resultados.

Para a construção do conjugado, diferentes reagentes podem ser usados como cromógenos, sendo que as nanopartículas de ouro coloidal são escolhidas na maioria das vezes devido a sua alta estabilidade, facilidade de síntese e detecção visual. O ouro coloidal é inerte, sendo capaz de gerar partículas esféricas perfeitas. Além disso, uma característica importante para o emprego dessas nanopartículas em testes rápidos é que o ouro deixa de ser amarelo e se torna vermelho em solução aquosa, permitindo a visualização da reação (SINGH *et al.*, 2015). Foi demonstrado também que as propriedades ópticas dessas estruturas aumentam a sensibilidade de análises por IFL (YANG *et al.*, 2011).

Essas nanopartículas têm uma alta afinidade por biomoléculas e podem ser facilmente funcionalizadas (conjugadas). Ligantes moleculares (proteínas) adsorvem-se em ouro coloidal por uma combinação de interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Por isso, durante a conjugação, é importante controlar o pH do ligante e da solução de ouro coloidal (CHUN, 2009).

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver um protótipo de teste rápido baseado em Imunocromatografia de Fluxo Lateral para o diagnóstico de infecções pelo vírus Chikungunya(CHIKV).

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

1. Construir testes rápidos baseados em imunocromatografia de fluxo lateral utilizando a proteína recombinante CHIKV-E2
2. Padronizar o conjugado que irá compor o teste
3. Definir as composições das linhas teste e controle

3 METODOLOGIA

3.1 PROPOSTA DE MODELO PARA O TESTE RÁPIDO

Dois modelos de teste rápido foram propostos. Primeiramente, o formato indireto, para detecção de anticorpos do tipo IgG, composto pelo antígeno recombinante na linha teste e proteína A na linha controle, sendo o conjugado formado por um anti- IgG humano ligado a partícula de ouro coloidal (Au- α -IgG) (Figura 24 A).

Já no formato sanduíche, o antígeno recombinante é conjugado com ouro coloidal e os ensaios podem ser realizados contra mais de uma imunoglobulina. Esse formato permite a diferenciação da fase aguda (detecção de IgM) e crônica (detecção de IgG) (quando for o caso) e para este trabalho foi proposta a impregnação de um α -IgM e um α -IgG na membrana de nitrocelulose. Neste caso, a linha controle pode ser um anticorpo policlonal produzido em coelhos imunizados com o antígeno recombinante (Figura 24 B).

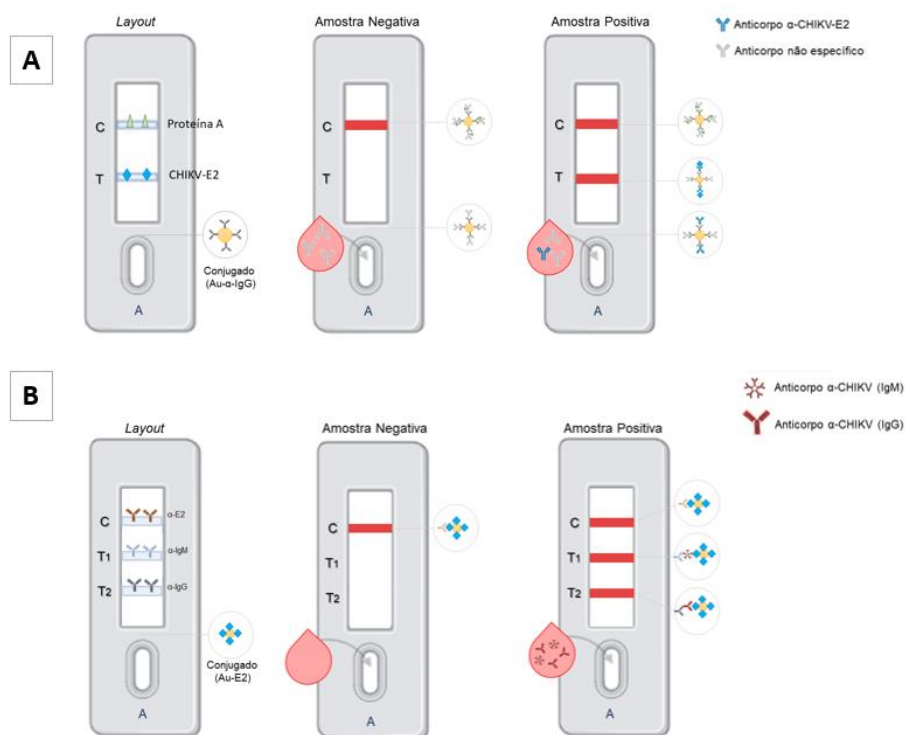


Figura 24- Modelos de teste rápido por IFL propostos. A:Formato indireto, para detecção de anticorpos do tipo IgG anti-CHIKV, tendo como conjugado o anticorpo funcionalizado ao ouro. B: Formato sanduíche, para detecção de IgG e IgM, tendo como conjugado o antígeno funcionalizado ao ouro.

3.2 SÍNTESE DO OURO COLOIDAL

A síntese de ouro coloidal foi feita pela redução do ácido tetracloroáurico com citrato de sódio(CHUN, 2009). Água destilada foi aquecida em um frasco erlenmeyer, sendo adicionada uma solução de ácido tetracloroáurico (HAuCl_4 , 1%) seguida de uma solução de citrato de sódio($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 4%), com agitação vigorosa e constante aquecimento. A reação foi acompanhada pela mudança de coloração (amarelo-cinza-roxo-vermelho) e, após aproximadamente 10 min, a solução atingiu a coloração vermelho alaranjada característica da formação das partículas de ouro coloidal. Neste momento, a solução foi retirada do aquecimento e deixada em repouso até atingir a temperatura ambiente.

Foram produzidas partículas de ouro coloidal de 15nm e 20nm com o objetivo verificar se esse parâmetro interfere diretamente na sensibilidade do teste. As duas preparações seguiram o mesmo procedimento, alterando apenas as proporções (concentrações finais, C_f) dos reagentes utilizados, da seguinte forma: partícula de 15nm: HAuCl_4 ($C_f= 0,02\%$) e $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ($C_f= 0,08\%$), partícula de 20 nm: HAuCl_4 1% ($C_f= 0,01\%$) e $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ($C_f= 0,16\%$). Esta padronização foi feita anteriormente por SANTOS (2019).

A concentração relativa de cada lote de ouro coloidal foi determinada por absorbância a 520 nm. Todas as soluções de ouro coloidal exibem um único pico de absorção na faixa visível entre 510 e 550 nm. Foram consideradas aceitáveis as leituras de absorbâncias compreendidas entre 1,000 e 2,000.

3.3 PREPARAÇÃO DO CONJUGADO

Inicialmente, foi feita uma titulação da proteína (antígeno recombinante ou anticorpo, dependendo do formato do teste) para avaliar a quantidade mínima necessária para a estabilização do ouro coloidal. Adicionou-se um volume constante (15 μL) de solução de ouro a um volume de 15 μL de diluições seriadas da proteína. Após homogeneização, 15 μL de uma solução de PBS 10X foi adicionada a todos os tubos, um sal forte capaz de desestabilizar a interação proteína-ouro quando a mesma não está bem estabelecida. A desestabilização é evidenciada pela mudança de cor da solução formada (rosa para roxo/azulado).A quantidade mínima de proteína capaz de impedir a mudança de cor foi considerada como a quantidade mínima necessária para estabilizar a solução de ouro coloidal(DOS SANTOS *et al.*, 2019).

Após esta padronização, a proteína recombinante (ou anticorpo) foi adicionada por gotejamento à solução de ouro coloidal (pH corrigido previamente para 8,5 com uma solução de 0,2M K_2CO_3), sob agitação magnética e incubada à temperatura ambiente por 20 minutos. A solução foi estabilizada com BSA (concentração final 1%) (Sigma-Aldrich) e em seguida, centrifugada (8.000 x g, 40 min). O sobrenadante foi descartado, o sedimento foi recuperado em solução tampão de armazenamento (Borato 0,01 M, BSA 3%, Sacarose 3%, pH 7,5), adsorvido à fibra de vidro sendo a mesma seca em uma sala com baixa umidade.

Para o formato indireto, anticorpos α -IgG humano (Ref. I1886, Sigma) foram conjugados a partículas de ouro coloidal. Já para o formato sanduíche, o antígeno recombinante (CHIKV-E2, tampão HEPES 100 mM) foi conjugado ao ouro coloidal. Para que esta ligação ocorra é necessário que a molécula que irá se conjugar seja preferencialmente solúvel, e permaneça estável em um tampão livre de ureia e com baixa concentração de sais, pois estes elementos interferem na interação com o ouro. No formato sanduíche, essa conjugação proteína recombinante-ouro não foi estável (resultados mostrados na seção 4.1.1).

3.4 PREPARO IMPREGNAÇÃO DAS LINHAS TESTE E CONTROLE

O formato sanduíche tem como objetivo a utilização do anticorpo policlonal produzido em coelho (produção no capítulo I) na linha controle e anticorpos (α -IgM e α -IgG) nas linhas teste. No entanto, não foi possível a obtenção de um conjugado estável para este formato, já que a proteína CHIKV-E2 precipitou em tampões com concentração de ureia abaixo de 4M (dado não mostrado). Dessa forma, optou-se por seguir com o formato indireto. Neste caso, a linha controle (LC) foi constituída de proteína A (Ref. P6031, Sigma) diluída em PBS 1X (Cf: 0,3 mg/mL) e a linha teste (LT) foi preparada com o antígeno CHIKV-E2 (após diálise em PBS 1X, 4 M de ureia Cf: 0,48 mg/mL).

As membranas de nitrocelulose (Ref. CN150, Sartorius) foram impregnadas em plataforma de dispensação automática Jet Spray (Autokun), seguida de secagem em sala com controle de umidade. Os parâmetros do aparelho foram ajustados de forma

que cada tira de 0,4 cm recebesse em cada linha impregnada (LC e LT) o equivalente a 0,5 μ L de solução.

3.5 MONTAGEM E EXECUÇÃO DOS TESTES

Num cartão adesivo de três regiões, foram afixadas às membranas de nitrocelulose (contendo as linhas teste e controle) na parte central, fibra de vidro (Fiber glass sheet, EM33-02-01, E.A.S.E. contendo o conjugado - ouro coloidal) na parte inferior e fibra de celulose (C083 Cellulose Fiber Sample Pad Roll, CFSP001700, Millipore), na parte superior, para absorver a amostra e o tampão de corrida.

Após a impregnação, secagem, e montagem dos componentes no cartão adesivo, o mesmo foi cortado em tiras de largura de 0,4cm utilizando uma guilhotina (Cutter, Autokun) e envoltos por um cassete plástico.

Foram avaliados 5 tampões de corrida (formulações descritas no Quadro 5) durante a padronização dos testes. Para a execução de cada teste, as amostras de soro (volumes testados: 5, 10 e 20 μ L), foram adicionadas a área contendo o suporte de amostra sendo em seguida adicionado 100 μ L de tampão de corrida, aguardando-se 15 minutos. Se uma amostra continha anticorpos anti-CHIKV, estes reagiram primeiro com o conjugado Au- α -IgG e, à medida em que o complexo passava pelo local de captura, estes reagiram no local da linha teste, levando à formação de uma linha vermelha visível. Na ausência de anticorpos específicos (amostras negativas), não foi observada reatividade neste local.

Quadro 5- Relação dos tampões de corrida utilizados durante o desenvolvimento do teste rápido

Tampão	Composição
1	Triton X-100 0,01%; azida sódica 0,1%; e tetraborato de sódio 10 H ₂ O 20Mm; pH 7,5
2	Triton X-100 0,1%; azida sódica 0,1%; tetraborato de sódio 10 H ₂ O 20Mm; e BSA 1,0%; pH 7,5
3	Tween 20 0,1%; azida sódica 0,1%; e tetraborato de sódio 10 H ₂ O 10mM pH 7,5
4	Tween 20 0,1%; azida sódica 0,1%; tetraborato de sódio 10 H ₂ O 10mM; BSA 1,0%, pH 7,5
5	Borato 0,01M, Tween-20 0,1% pH 7,5

4 RESULTADOS

4.1 TESTE RÁPIDO PARA CHIKV UTILIZANDO A PROTEÍNA CHIKV-E2 PRODUZIDA EM *E.coli*

4.1.1 Padronização do conjugado

Considerando o formato sanduíche, tentativas de conjugação do antígeno CHIKV-E2 produzida em *E.coli* ao ouro coloidal apresentaram dificuldades. Por se tratar de uma proteína bastante insolúvel, não foi possível a realização da diálise completa (remoção total de ureia), havendo perdas consideráveis por precipitação (97%) mesmo por diálise gradativa (passando de 8M para 6M e então para 4M, quando houve evidência visível de grande perda por precipitação, dados não mostrados).

A Figura 25-I.A mostra a titulação da proteína CHIKV-E2 (após diálise em tampão HEPES 100 mM e concentração em coluna de gel-filtração), com a partícula de ouro. A viragem da cor de vermelho para cinza, é um sinal de instabilidade, por isso, sempre é escolhida uma diluição anterior a este ponto. A partir da diluição 1/16 foi feita a tentativa de conjugação, no entanto o complexo não ficou estável apresentando sinais de floculação (Figura 25-I.B). Dessa forma, decidiu-se investir no formato indireto. Para isso foi feita uma conjugação de anti-IgG com o ouro, sendo escolhida a diluição de 1/4 (Figura 25-II.A) Como pode ser observado na Figura 25-II.B, este conjugado permaneceu estável.

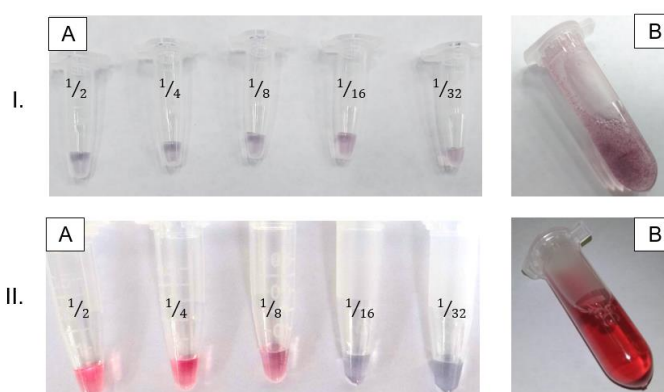


Figura 25- Etapa de produção do conjugado para composição do teste rápido no formato sanduíche (I) e indireto (II), respectivamente. I.A. Titulação da proteína CHIKV-E2. B. Conjugado obtido após adição da proteína CHIKV-E2 de *E. coli* a solução de ouro coloidal, com sinais de floculação (instabilidade). II.A Titulação de anti-IgG humano. II.B. Conjugado obtido após adição de anti-IgG a solução de ouro coloidal, sem sinais de floculação (estável).

4.1.2 Desenvolvimento de um protótipo de teste rápido para CHIKV

Uma vez que o conjugado Au- α -IgG permaneceu estável, foram feitos alguns testes com o mesmo seguindo-se o formato indireto e impregnando-se a proteína CHIKV-E2 (dialisada em PBS 1X, 4 M de ureia 0,48 mg/mL) na linha teste e proteína A na linha controle (0,3 mg/mL em PBS 1X). Foram testados conjugados formados por partículas de 15 e 20 nm (conforme protocolo pré-estabelecido por SANTOS, 2019), volumes de amostra de 5, 10 e 20 μ L, além de diferentes formulações de tampões de corrida. As melhores condições para a realização do teste foram:

- Conjugado Au- α -IgG (20 nm).
- Tampão de corrida: Borato 0,01M, Tween-20 0,1% pH 7,5; 100 μ L.
- Volume de amostra: 20 μ L.

Após essas padronizações, um teste preliminar com duas amostras positivas e duas amostras negativas para CHIKV, revelaram que a proteína CHIKV-E2 produzida em *E.coli* possui potencial para ser utilizada no diagnóstico por IFL no formato indireto (Figura 26) .

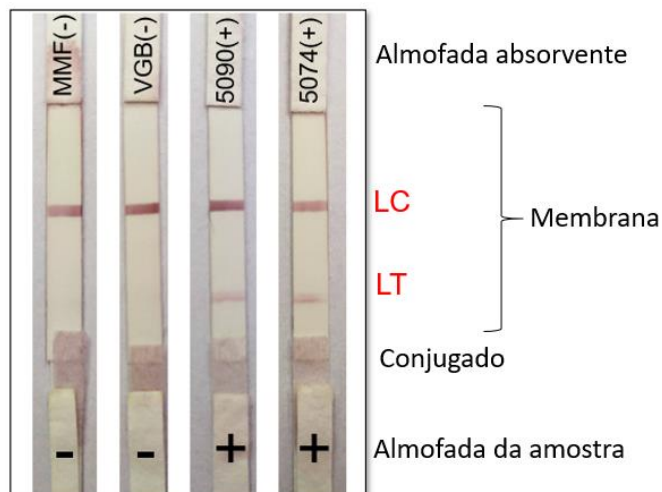


Figura 26- Teste preliminar de IFL do tipo indireto para o diagnóstico de infecções por CHIKV. O teste foi feito com conjugado Au- α -IgG, antígeno CHIKV-E2 na linha teste (LT) e proteína A na linha controle (LC), testando-se duas amostras negativas (MMF e VGB) e duas positivas para CHIKV (5090 e 5074). A leitura dos resultados foi indicada abaixo de cada imagem, de acordo com a presença ou não de banda e corresponde ao resultado esperado para as quatro amostras avaliadas.

5 DISCUSSÃO

A tendência de descentralizar os diagnósticos das clínicas e hospitais para locais mais próximos dos pacientes tem aumentado a demanda por testes do tipo *point of care* (POC), que são capazes de fornecer resultados imediatos em tempos mais curtos e podem ser facilmente executados sem a exigência de pessoal altamente treinado e infraestrutura. Apesar dos POC, de maneira geral, apresentarem uma menor sensibilidade quando comparados a ensaios baseados em ELISA (JOHNSON *et al.*, 2016), eles podem ser uma alternativa (ou a única) em regiões de difícil acesso a laboratórios. Os dispositivos POC baseados em ensaios de imunocromatografia de fluxo lateral (IFL) estão entre as estratégias de diagnóstico com maior crescimento registrado.

Neste capítulo, foi avaliado o uso da proteína CHIKV-E2 produzida por meio de expressão heteróloga em *E.coli* (conforme descrito no capítulo I), em plataformas de diagnóstico por IFL. Os sistemas procarióticos são amplamente utilizados para expressar proteínas recombinantes, incluindo antígenos de CHIKV (FUMAGALLI *et al.*, 2018; KR VERMA *et al.*, 2014; TRIPATHI; PRIYA; SHRIVASTAVA, 2014). Essas plataformas têm a vantagem de serem simples, rápidas e baratas. No entanto, a maioria dos sistemas de expressão bacteriana é limitada em sua capacidade de produzir proteínas de maneira solúvel e pode resultar na formação de agregados conhecidos como corpúsculos de inclusão (ROSANO; CECCARELLI, 2014), como observamos para o antígeno trabalhado.

O fato desta proteína ser insolúvel, comprometeu o desenvolvimento de um teste no formato sanduíche, capaz de distinguir uma infecção aguda (detecção de anticorpos do tipo IgM) de uma infecção tardia (detecção de anticorpos do tipo IgG). Entretanto, constatou-se a possibilidade de utilização deste antígeno pelo formato indireto. Existem ainda outras possibilidades de padronização, como por exemplo testar diferentes membranas de nitrocelulose (variação de porosidade), lavagens e tratamentos de membrana, variação dos componentes do tampão de corrida, entre outros. Neste caso, ressalta-se a necessidade de um maior número de testes para o cálculo de sensibilidade e especificidade visando uma melhor avaliação do potencial do protótipo como um produto comercial.

6 CONCLUSÃO

Ainda que mais testes sejam necessários para avaliar a acurácia do teste rápido indireto para CHIKV, este formato demonstrou potencial para ser melhor explorado. Entretanto, ainda há a necessidade de um antígeno solúvel para a composição do teste no formato sanduíche.

Somado ao que já foi discutido no capítulo I para a detecção de infecções por ZIKV, existe um incentivo para a produção de proteínas em um sistema eucarioto, quando o antígeno produzido em *E coli* não apresente desempenho desejado. Levando isso em consideração, foi proposta a expressão das proteínas de interesse em sistema baculovírus, que será abordada no capítulo a seguir.

CAPÍTULO IV

Produção heteróloga de proteínas recombinantes dos vírus Chikungunya e Zika em Baculovírus

“Os homens são mais resistentes do que isso. Nossa crença geralmente é mais forte quando deveria ser mais fraca. Essa é a natureza da esperança.”

Brandon Sanderson – Mistborn (2006).

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 BACULOVÍRUS

Membros da família *Baculoviridae*, são vírus que infectam artrópodes, majoritariamente insetos da ordem Lepidoptera, além das ordens Diptera e Hymenoptera. Baculovírus são de considerável importância por causar grande impacto na população de insetos, sendo amplamente utilizados como controles de pragas (BONNING, 2005)

Dentre os membros da família *Baculoviridae* mais estudados está o Nucleopoliedrovírus multicapsídeo de *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV). Comparado à maioria dos baculovírus, esse isolado tem uma gama relativamente ampla de hospedeiros, podendo infectar produtivamente em torno de 25 espécies de insetos. O AcMNPV foi o isolado utilizado para desenvolver os vetores de baculovírus recombinantes originais e seu genoma ainda é usado como base da produção da maioria dos vetores de baculovírus (KOST; KEMP, 2016).

1.1.1 Estrutura e Ciclo de multiplicação dos Baculovírus

O protótipo AcMNPV, que forma a base da maioria dos vetores de expressão, foi o primeiro baculovírus sequenciado completamente, apresentando 134 kb em tamanho e compreendendo 154 ORFs. Sua estrutura compreende vírus de fita dupla, apresentando DNA circular recoberto por um capsídeo em forma de bastonete (CHAMBERS *et al.*, 2018).

Os baculovírus apresentam um ciclo replicativo bifásico, impulsionado por duas formas estruturais distintas: o vírus extracelular ou “brotado” (tradução livre do inglês *budded virus*, BV), responsáveis pela transmissão do vírus célula a célula, e o vírus derivado da oclusão (do inglês *occlusion-derived virus*, ODV), responsáveis pela transmissão horizontal do vírus inseto a inseto (Figura 27A).

A fase primária ocorre quando os corpos de oclusão (do inglês *occlusion body*, OB) desmontam em resposta ao alto pH liberando vírus derivados de oclusão (ODV) no lúmen do intestino médio. Após atravessar a membrana, os vírions ODV se ligam a microvilosidades das células do epitélio intestinal, liberando nucleocapsídeos no

citoplasma. Após a replicação viral e montagem de nucleocapsídeos no núcleo, estes passam pelo citoplasma e geram o fenótipo do vírus brotado (BV). Os BV podem infectar algumas células diretamente (células traqueais, hemócitos) ou podem circular na hemolinfa, infectando outros tecidos, como células de gordura e músculo. A infecção de outros tecidos na fase secundária da infecção resulta na geração de BV adicionais, que difundem ainda mais a infecção no inseto. ODV e OB são produzidos em todos os tipos de células e são subsequentemente liberados quando ocorre a lise celular (HITCHMAN; POSSEE; KING, 2009; ROHRMANN, 2013) (Figura 27B).

Um panorama do ciclo multiplicativo dos baculovírus é mostrado na Figura 27 (C e D). Após a adsorção do BV por endocitose mediada por clatrina, os endossomos são transportados ao longo dos microtúbulos e após a acidificação do endossomo, o nucleocapsídeo (em azul) é liberado. A polimerização de actina fornece uma força propulsora para transportar o nucleocapsídeo pelo poro nuclear. A exposição do nucleocapsídeo no núcleo resulta na expressão gênica viral, replicação do DNA e montagem de nucleocapsídeos da progênie (Figura 27D, em azul e verde). Dentre estes, alguns são marcados para saída do núcleo (BV, em azul) e outros para produção de ODV (em verde). Nucleocapsídeos que saem do núcleo são observados em vesículas citoplasmáticas (vesículas de transporte), que parecem liberar posteriormente nucleocapsídeos no citoplasma. Os nucleocapsídeos destinados a se tornarem ODVs interagem com as membranas derivadas da membrana nuclear interna (MNI) para formar os ODVs (Figura 27C;), que são subsequentemente ocluídos pela proteína poliedrina (BLISSARD *et al.*, 2018). O BV é a forma usada na cultura de células para o BEVS, pois demonstrou ser cerca de mil vezes mais infeccioso que ODV (revisto por ROHRMANN, 2013) e são produzidos em quantidades substanciais em cerca de 12 a 18h após infecção (BLISSARD; THEILMANN, 2018).

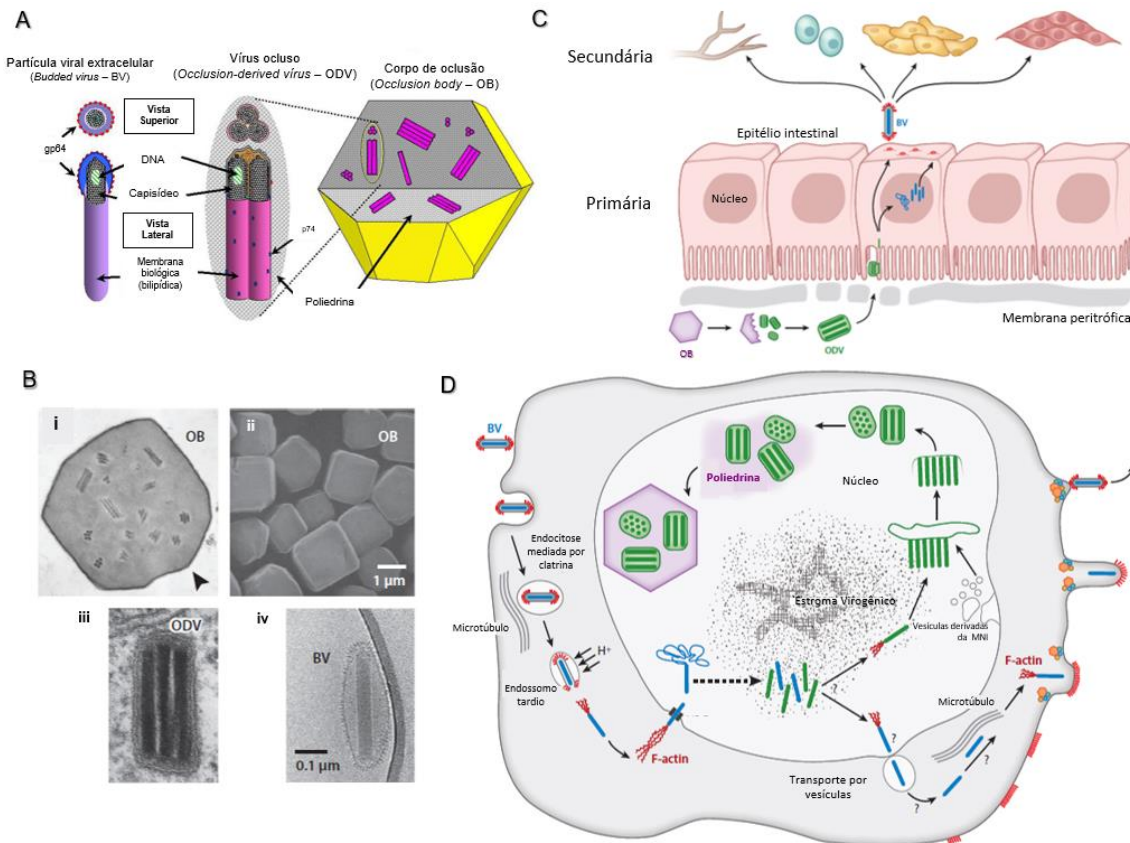


Figura 27- Estrutura e ciclo multiplicativo dos baculovírus AcMNPV. (A) Diagrama estrutural de um AcMNPV. BV apresenta um único nucleocapsídeo envolto pela membrana celular e proteínas virais inseridas. ODV é composto de diversos nucleocapsídeos envolvidos pelo mesmo envelope. No OB, os ODV e BV se mantêm protegidos do ambiente externo. Desenhado por Dr. Dwight Lynn (Agricultural Research Service, EUA) e adaptado de Hitchman e colaboradores 2009. **(B)** Micrografias eletrônicas dos fenótipos de virion AcMNPV. (i) Micrografia eletrônica de transmissão (TEM) de uma seção transversal de um corpo de oclusão (OB) mostrando ODV incorporado com múltiplos nucleocapsídeos por envelope. Ao redor do OB está o envelope poliédrico (seta). (ii) Micrografia eletrônica de varredura do AcMNPV OB. (iii) TEM de uma seção transversal mostrando a estrutura detalhada do ODV. (iv) Estrutura do AcMNPV BV. **(C)** Fenótipos dos vírions de baculovírus e seu papel na infecção de tecidos hospedeiros. O diagrama ilustra as fases primária e secundária da infecção. A infecção primária e a transmissão horizontal dos baculovírus em larvas do hospedeiro são mediados por via oral pelos ODV, após ingestão de OB. A infecção secundária envolve a disseminação da infecção pelos tecidos dentro das larvas hospedeiras e é iniciada pela forma BV. **(D)** Adsorção, replicação e liberação de baculovírus em células hospedeiras não-intestinais. O diagrama representa a infecção por BV e subsequente replicação viral e produção de BV e ODV. Adaptado de BLISSARD; THEILMANN, 2018.

1.1.2 Produção heteróloga de proteínas em Baculovírus

Considerando-se os sistemas eucariotos disponíveis para a produção heteróloga de proteínas, o sistema de vetor de expressão baculovírus (*Baculovirus Expression Vector System*, BEVS) é uma das plataformas amplamente utilizadas. A variedade de vetores, aliada a possibilidade do uso de células de inseto adaptadas a meios sem

soro e produtos comerciais disponíveis, são fatores que contribuíram para sua expansão em muitos laboratórios. Nos passados 30 anos houve um aumento considerável nos artigos científicos publicados e em patentes que citam o uso de BEVS(VAN OERS; PIJLMAN; VLAK, 2015).

Sua capacidade de expressar proteínas complexas é bem demonstrada pelo uso rotineiro desta tecnologia na produção de glicoproteínas, receptores acoplados à proteína G (*G-protein-coupled receptors*, GPCRs; *virus like particles*, VLPs) além de proteínas consideradas "de difícil expressão heteróloga" (STOLT-BERGNER *et al.*, 2018).

Uma validação adicional da tecnologia de expressão de baculovírus recombinantes é evidenciada pela fabricação comercial de vacinas humanas e veterinárias utilizando este sistema de expressão, incluindo a vacina VLP para papilomavírus humano da farmacêutica GSK, (DESCHUYTENEER *et al.*, 2010), vacina contra a influenza hemaglutinina (HA) da companhia *Protein Sciences*(COX, 2012) e a vacina contra o circovírus suíno (PCV2) (FAN *et al.*, 2007). A seguir encontra-se uma revisão de alguns dos principais componentes deste sistema.

1.1.3 Linhagens celulares utilizadas para produção heteróloga de proteínas em baculovírus

As linhagens celulares mais comuns utilizadas em plataforma BEVS são derivadas das espécies *Spodoptera frugiperda* (Sf9 e Sf21) e *Trichoplusia ni* (*High Five*) da ordem dos Lepidoptera. Sf9 e Sf21 são derivadas do tecido ovariano da lagarta do cartucho do milho(O'REILLY *et al.*, 1992)e a linhagem celular *High Five* é originária de células ovarianas de lagartas-mede-palmo (GRANADOS *et al.*, 1994). A literatura recomenda a utilização de células Sf9 ou Sf21 para transfecção, purificação e amplificação de vírus recombinantes. As células Sf9 são de tamanho regular, fáceis de manipular e formam monocamadas mais favoráveis para ensaios de placas. As células Sf9 e Sf21 também podem ser usadas para expressão de proteínas recombinantes, mas a linhagem celular *High Five*TM pode produzir níveis mais altos de expressão (5 a 10 vezes maiores)(DAVIS *et al.*, 1992).

Quanto ao tipo de cultivo, as células Sf9 e Sf21 podem ser mantidas aderentes ou em suspensão e não requerem adaptação de uma forma para outra. Já as células

High Five são normalmente cultivadas aderentes e requerem adaptação à cultura de suspensão (INVITROGEN, 2009a). Uma síntese das linhagens celulares usadas na produção e manutenção de BVs é apresentada no Quadro 6.

Quadro 6- Linhagens celulares utilizadas para produção heteróloga de proteínas em baculovírus

Linhagem	Tempo de dobramento	Aparência	Densidade celular por confluência
Sf9	24-30 horas	Esférica, granular, tamanho regular. Fortemente aderente.	4,0 × 10 ⁶ (25 cm ²) 1,2 × 10 ⁷ (75 cm ²) 2,4 × 10 ⁷ (150 cm ²)
Sf21	24-30 horas	Esférica, granular, tamanhos diferentes. Fortemente aderente.	3,8 × 10 ⁶ (25 cm ²) 1,1 × 10 ⁷ (75 cm ²) 2,3 × 10 ⁷ (150 cm ²)
High Five	18-24 horas	Esférica, granular, tamanhos diferentes. Levemente aderente.	3,0 × 10 ⁶ (25 cm ²) 9,0 × 10 ⁶ (75 cm ²) 1,8 × 10 ⁷ (150 cm ²)

Fonte: INVITROGEN, 2009.

1.2 ANTÍGENOS DE CHIKV E ZIKV PRODUZIDOS EM BACULOVÍRUS DESCRITOS NA LITERATURA E UTILIZADOS EM ELISA

Estudos anteriores já relataram a expressão recombinante de genes dos vírus *Zika* e *Chikungunya* em sistema baculovírus. Cho e colaboradores relataram a expressão das proteínas E1 e E2 do CHIKV para execução de sorodiagnóstico por meio de ELISA de captura de IgM. Neste teste, a especificidade para ambos os antígenos foi de 100%, apresentando 77,5% e 90% de sensibilidade para E1 e E2, respectivamente (CHO *et al.*, 2008).

Em outro estudo, proteínas do envelope do CHIKV expressas em baculovírus foram empregadas em um ELISA de captura de IgG. O teste apresentou 83,0 % de sensibilidade e 87,8% de especificidade (KUMAR *et al.*, 2014).

Um estudo descreveu a obtenção da proteína ZIKV-E por expressão heteróloga em AcMNPV seguida da avaliação da sua imunogenicidade em camundongos. Os anticorpos anti-E obtidos a partir de soros dos camundongos foram capazes de neutralizar o ZIKV *in vitro* (LUO *et al.*, 2020).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

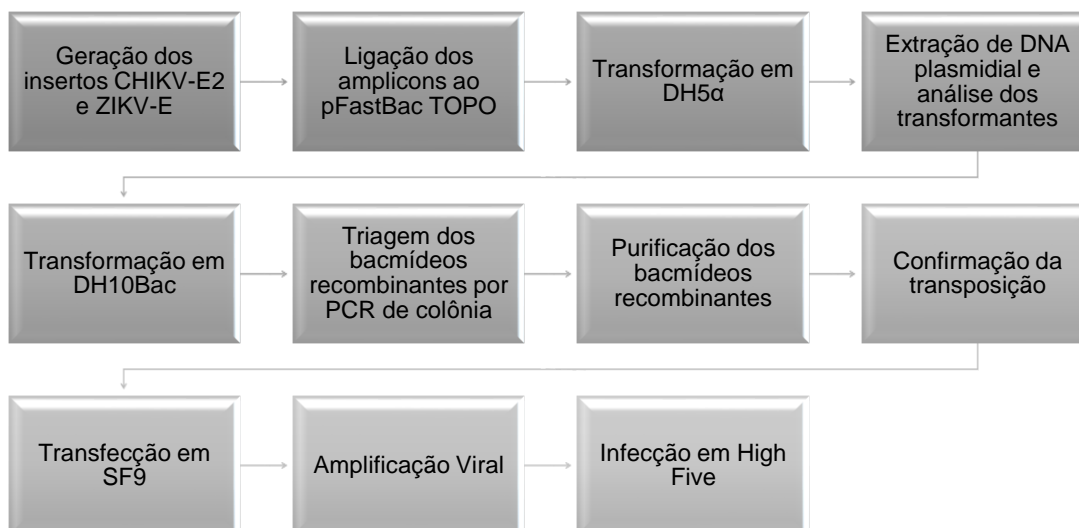
Expressar e purificar proteínas recombinantes dos vírus CHIKV e ZIKV em sistema baculovírus.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- i. Construir, por clonagem em *E.coli*, vetores pFastBac™ TOPO™ recombinantes contendo os genes de CHIKV-E2 e ZIKV-E.
- ii. Obter e purificar bacmídeos recombinantes contendo os genes de interesse a partir de transposição bacteriana.
- iii. Obter e purificar baculovírus recombinantes, contendo os genes das proteínas CHIKV-E2 e ZIKV-E.
- iv. Amplificar os baculovírus recombinantes em células *SF9*.
- v. Expressar e purificar as proteínas recombinantes CHIKV-E2 e ZIKV-E em células *SF9* e *High Five*.

3 METODOLOGIA

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO CAPÍTULO



3.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES EM SISTEMA BACULOVÍRUS - BAC-TO-BAC

Baseado no método desenvolvido por Luckow e colaboradores (1993), o sistema de expressão Bac-to-Bac® HBM TOPO® (Ref. A11339, Thermo Fisher), permite a expressão do gene de interesse controlada pelo promotor da poliedrina (PH) do AcMNPV. O cassete de expressão é flanqueado por transposons (Tn7) e contém um sinal de poliadenilação (SV40). A presença da sequência codificadora do sinal de secreção N-terminal da *Honey Bee Mellitin* (HBM) facilita a secreção do produto gênico clonado em meio extracelular e a *tag* de poli-histidina C-terminal permite purificação da proteína secretada.

O sistema Bac-to-Bac® HBM TOPO®, apresenta como etapa inicial a construção do plasmídeo recombinante contendo o gene a ser expresso. Após a amplificação do gene de interesse por PCR, é feita a ligação no vetor pFastBac™/HBM-TOPO®, que é utilizado, em sequência, para transformar uma linhagem bacteriana de clonagem (DH5α ou One Shot Mach). Em seguida, é feita a purificação do DNA plasmidial sendo o mesmo utilizado para transformar bactérias da linhagem

DH10Bac™. As células DH10Bac™ contêm um vetor *shuttle* de baculovírus (bacmídeo) com um sítio *mini-attTn7* e um plasmídeo auxiliar (*helper*).

Após a transformação das células DH10Bac™ utilizando o vetor pFastBac™/HBM (plasmídeo doador), ocorre a transposição entre a porção *mini-Tn7* do vetor pFastBac™/HBM e o sítio de destino *mini-attTn7* para gerar um bacmídeo recombinante. Essa reação de transposição ocorre na presença de proteínas fornecidas pelo plasmídeo auxiliar. Após confirmação da transposição, o DNA do bacmídeo recombinante é isolado e utilizado para transfectar células de inseto (Figura 28).

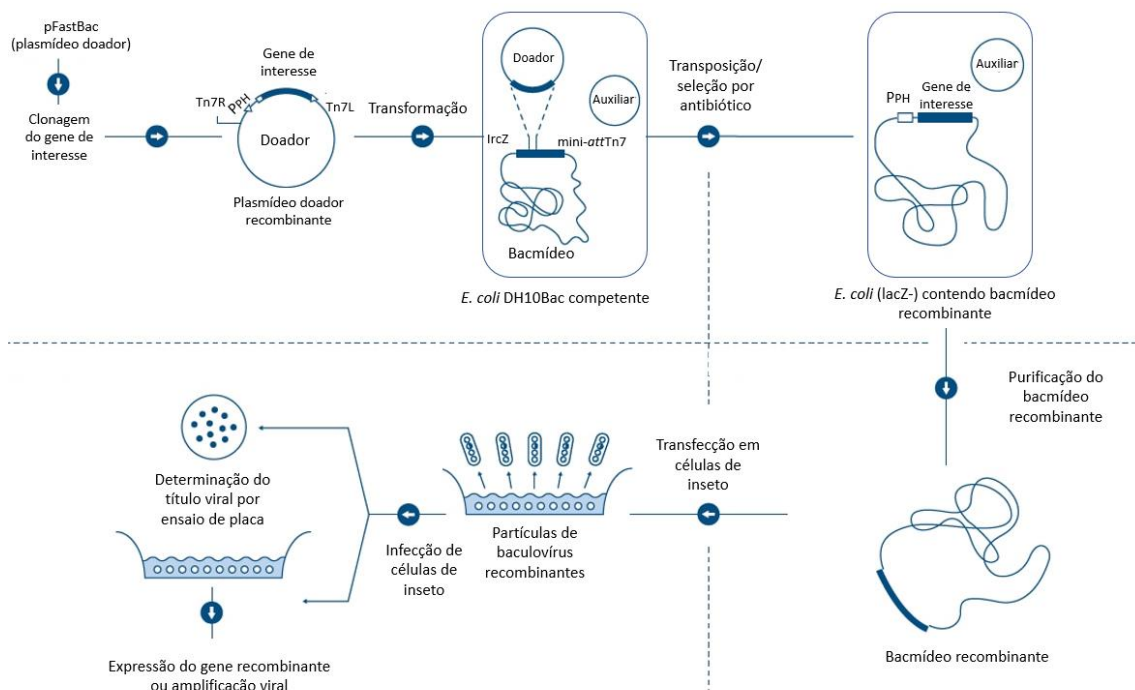


Figura 28- Panorama da expressão de proteínas recombinantes em baculovírus pelo sistema Bac-to-Bac® HBM TOPO® (Thermo Fisher). Bactérias da linhagem DH10Bac, que contêm o genoma do baculovírus AcMNPV em forma de bacmídeo, são transformadas com o plasmídeo pFastBac (doador), contendo o gene de interesse. Dentro da célula ocorre a transposição do gene de interesse para o bacmídeo. O DNA recombinante (bacmídeo) é purificado e utilizado para transfectar células de inseto, que passam a produzir os baculovírus recombinantes. Estes podem ser avaliados quanto ao título viral e são utilizados para infectar novas células (expansão viral) para produção da proteína recombinante. Adaptado do manual Bac-to-Bac® HBM TOPO® (INVITROGEN, 2009a).

3.2.1 Geração dos vetores pFastBac™ TOPO™ recombinantes

Vetores *pFastBac™ TOPO™* fornecem os meios para a inserção direta de um produto de PCR de extremidade cega (blut-end) no plasmídeo em uma etapa única

de clonagem. As topoisomerasas contidas nas extremidades do mesmo se ligam ao DNA fita dupla em locais específicos e clivam a ligação fosfodiéster após 5'-CCCTT em uma fita. A energia decorrente desta quebra é convertida na formação de uma ligação covalente entre o fosfato 3' da fita clivada e um resíduo tirosil (Tyr-274) da topoisomerase. A ligação fosfo-tirosil entre o DNA e a enzima podem subsequentemente ser clivada pelo hidroxil 5' da fita original, revertendo a reação e liberando a topoisomerase (SHUMAN, 1994)(Figura 29).

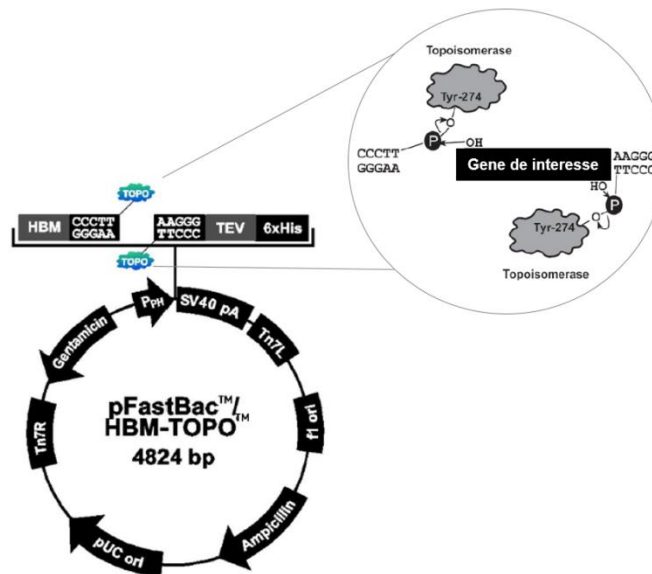


Figura 29- Representação do vetor pFastBac™ TOPO™. A ligação ao gene de interesse é promovida pelas enzimas topoisomerasas, presentes nas extremidades do plasmídeo. Adaptado do manual Bac-to-Bac® HBM TOPO® (INVITROGEN, 2009b).

3.2.1.1. Verificação de códons para utilização de DNA molde

Plasmídeos pET21 contendo os genes de interesse CHIKV-E2 e ZIKV-E (citados no capítulo I) foram utilizados como DNA molde para geração dos insertos necessários para a etapa inicial da produção de proteínas em BEVS. Inicialmente, foi feita a verificação de códons raros na sequência, visando a expressão nas células de *Spodoptera frugiperda* (SF9) e *Trichoplusia ni* (*High Five*), uma vez que estas sequências tinham sido otimizadas anteriormente para expressão em *E. coli*. Para isso, foi utilizado o programa ATGme (<http://atgme.org>), que diferencia códons raros e altamente raros a partir da sequência fornecida e da tabela de códons do organismo utilizado para expressão (DANIEL *et al.*, 2015).

3.2.1.2. Geração dos insertos ZIKV-E e CHIKV-E2 por PCR

Utilizando-se os plasmídeos pET21_CHIKV-E2 e pET21_ZIKV-E como DNA molde, foram feitas reações de PCR com iniciadores que compreendiam a sequência gênica das proteínas de interesse (pares CHIKV-E2_F/CHIKV-E2_R e ZIKV-E_F/ZIKV-E_R, APÊNDICE E) utilizando a enzima *Platinum™ SuperFi™ DNA Polymerase proofreading* (Invitrogen, EUA). As reações foram preparadas contendo: 10 µL de tampão 5X (contendo 7,5 mM MgCl₂), 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP's), 0,5 µM de cada iniciador, 0,02 U/µL da polimerase, 10 ng de DNA e H₂O estéril q.s.p. (quantidade suficiente para) 50 µL. Após homogeneização, as reações foram colocadas em um termociclador (Veriti, Applied Biosystems), seguindo o programa: um ciclo inicial de 98°C por 30"; 35 ciclos a 98°C por 10", (64°C ou 68°C)⁶ por 10" e 72°C por 40"; seguido de extensão final a 72°C por 5'.

O produto da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1 % em tampão TAE (40 mM Tris Base, 20 mM Ácido Acético, 1 mM EDTA, pH 8,0) acrescido de corante SYBR Safe (0,1 µL /mL, Invitrogen), a um potencial de 80 V. Para a determinação do tamanho do produto de PCR foi incluído o marcador de peso molecular de 1 kb (Promega), e o gel foi visualizado à luz ultravioleta (ChemiDoc, Bio-Rad).

Após a confirmação das bandas de tamanho esperado, os fragmentos correspondentes aos amplicons foram excisados e purificados utilizando um kit extração de DNA a partir de gel de agarose (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN) segundo recomendações do fabricante.

3.2.1.3. Ligação dos produtos de PCR no vetor pFastBac™ TOPO™

Após a purificação dos amplicons CHIKV-E2 e ZIKV-E estes foram usados para ligação ao vetor pFastBac™ TOPO™, na razão 2:1 (inserto:vetor) utilizando os reagentes fornecidos pelo kit (Bac-to-Bac™ TOPO™ Cloning Kit). A reação foi incubada 5 min à temperatura ambiente e armazenada à 20°C *overnight*. No dia

⁶Temperatura de anelamento de 64 °C para amplificação de CHIKV-E2 e 68 °C para ZIKV-E.

seguinte, a mesma foi utilizada para transformar células da linhagem bacteriana DH5 α . Os mapas dos plasmídeos construídos podem ser vistos no APÊNDICE E.

3.2.1.4. Transformação da linhagem bacteriana DH5 α utilizando os vetores pFastBac™ TOPO™ recombinantes e análise dos transformantes

Cada produto da ligação (inserto + pFastBac) foi adicionado a uma alíquota de DH5 α quimiocompetente, previamente incubada no gelo. As alíquotas foram submetidas a choque térmico de 42°C por 45 segundos, seguida de nova incubação em gelo por dois minutos. As células transformadas foram plaqueadas em meio sólido LB ágar contendo ampicilina (100 μ g/mL) e incubadas *overnight* a 37°C. Clones resistentes foram submetidos a extração de DNA plasmidial, pelo kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante, e seguida de quantificação por espectrofotometria (NanoDrop 2000, Thermo Scientific).

Para confirmação da construção pFastBac_CHIKV-E2, foi feita uma digestão com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III (Promega) (2,5 uL de cada enzima, 1 μ g BSA, 1 μ L Tampão E 10X, 0,45 μ g de DNA e H₂O livre de nuclease q.s.p. 10 μ L, incubação 37°C, 3h), sendo que estas possuem um sítio em cada extremidade do vetor próxima a ligação com o inserto. Esta análise permite verificar se o gene de interesse está presente no plasmídeo, porém não assegura sobre sua orientação. Por isso, foi feita também uma PCR utilizando os iniciadores CHIKV-E2(F) e SV40 polyA(R), que permitisse a confirmação da orientação correta do gene. As reações foram preparadas contendo: 4 μ L de tampão 5X (contendo 1,5 mM MgCl₂), 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP's), 0,5 μ M de cada iniciador, 0,5 U da polimerase *GoTaq*, 10 ng de DNA e H₂O estéril q.s.p. 20 μ L. Após homogeneização, as reações foram colocadas em um termociclador (Veriti, Applied Biosystems), seguindo o programa: um ciclo inicial de 95°C por 5'; 35 ciclos a 95°C por 20'', 56°C por 20'' e 72°C por 1'30''; seguido de extensão final a 72°C por 7'.

Para confirmação da construção pFastBac_ZIKV-E, foi realizada uma digestão com a enzima *Eco*RV, que possui um sítio de restrição no vetor pFastBac e um no gene ZIKV-E, permitindo inferir sobre a orientação correta do inserto (2,5 uL da enzima, 1 μ g BSA, 1 μ L Tampão D 10X, 0,45 μ g de DNA e H₂ONF q.s.p. 10 μ L,

incubação 37°C, 3h). Os resultados da PCR e restrições foram submetidos à eletroforese em gel de agarose como descrito no item 3.2.1.2.

3.2.2. Geração dos bacmídeos recombinantes

Uma vez confirmadas as construções pFastBac_CHIKV-E2 e pFastBac_ZIKV-E, estes plasmídeos, assim como o pFastBac_Gus foram usados para transformar alíquotas da linhagem bacteriana DH10Bac, fornecida pelo kit e contendo o vetor do baculovírus (bacmídeo). Após o choque térmico (42 °C por 45 seg, gelo por 1 minuto), foi adicionado 900 µL de meio SOC e a cultura foi transferida para um agitador (37°C, 220 rpm) para recuperação por 4 h. A cultura foi plaqueada em LB ágar contendo canamicina (50 µg/mL), gentamicina (7µg/mL), tetraciclina (10 µg/mL), X-gal (100 µg/mL) e IPTG (40 µg/mL), sendo incubada em estufa a 37°C por 48 h. Após este período são observadas colônias brancas (positivas para transposição) e azuis (negativas para transposição). Colônias brancas foram coletadas, re-plaqueadas e submetidas a triagem por PCR de colônia utilizando iniciadores pUC/M13 (APÊNDICE E) que flanqueiam a região de transposição, sendo possível a confirmação com base na diferença de tamanho do fragmento amplificado (Figura 30).

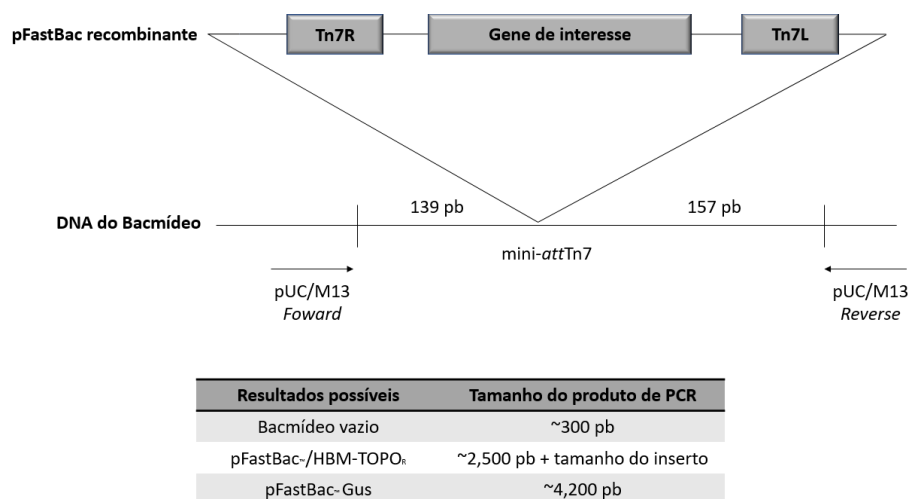


Figura 30- Representação da etapa da transposição entre o plasmídeo doador (pFastBac recombinante) e o bacmídeo para geração do bacmídeo recombinante. Esta etapa ocorre dentro das células DH10Bac, por intermédio de proteínas fornecidas pelo plasmídeo auxiliar presente nesta linhagem. Adaptado do manual Bac-to-Bac® HBM TOPO® (INVITROGEN, 2009a).

Colônias brancas foram coletadas, inoculadas em 500 µL de meio LB e colocadas em agitação (37 °C, 220 rpm) por 2 h. Em seguida, foi preparada a reação de PCR, com o kit *Taq DNA polymerase* (Thermo Fisher Scientific). Para cada reação (20 µL), foi adicionado H₂O (q.s.p 20 µL), 4 µL tampão 5X (1,5 mM de MgCl₂), dNTPs (0,2 mM/cada), iniciadores (0,2 µM/cada), polimerase (0,5 U) e 1 µL da cultura a ser testada.

Após homogeneização, a reação foi colocada em termociclador seguindo o seguinte programa: desnaturação inicial de 95°C por 10', 30 ciclos de amplificação (95°C por 45''/ 55°C por 45''/ 72°C por 5'), seguido de extensão final a 72°C por 7'.

Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese por gel de agarose como descrito no item 3.2.1.2. Após a confirmação da transposição, foi selecionado um clone de cada gene de interesse para purificação de bacmídeos recombinantes utilizando o kit PureLink™ HiPure Plasmid Prep (Invitrogen). A purificação dos bacmídeos foi realizada a partir de um volume de 200 mL de cada cultura. Eles foram quantificados e novamente testados por PCR com iniciadores pUC/M13. Nesta reação, procedeu-se de forma semelhante à PCR de colônia, utilizando, porém 10 ng de bacmídeo purificado e diminuindo o tempo de desnaturação inicial para 3 minutos.

3.2.3. Produção dos baculovírus recombinantes

3.2.3.1. Transfecção em Sf9

Após obtenção de bacmídeos recombinantes para os genes CHIKV-E2 e ZIKV-E, foi feita a transfecção desse DNA para células da linhagem SF9, utilizando o reagente *Cellfectin II*, uma formulação lipídica catiônica, fornecida pelo kit Bac-to-Bac® HBM TOPO (Invitrogen) conhecida por atingir alta eficiência de transfecção em células de insetos.

Para isso, células SF9 em fase log (1.5×10^6 – 2.5×10^6 células/mL) com viabilidade maior que 95%, foram plaqueadas em garrafas T25 a uma densidade de 2×10^6 células/mL. As garrafas foram incubadas em estufa a 27°C para adsorção.

Após 30 minutos, preparou-se os reagentes de transfecção em placa de poliestireno. Separadamente, diluiu-se cada bacmídeo (2 µg) em 100 µL de meio Grace's (Invitrogen). Em outro poço, 9 µL de *Cellfectin II* foi diluída em 100 µL de meio

Grace's. Após homogeneização, as soluções contendo os bacmídeos foram misturadas a solução de *Cellfectin II* diluída e incubadas por 30 minutos.

O sobrenadante das células preparadas foi removido e a solução de transfecção foi adicionada por gotejamento, acrescentando-se em seguida, 800 µL de meio Grace's. Uma garrafa plaqueada da mesma forma recebeu apenas meio Grace's (1000 µL), sendo o controle negativo de células(CC). As garrafas foram colocadas em agitação suave por 4h, a TA. Em seguida, o sobrenadante de cada garrafa foi removido e adicionou-se 5 mL de meio SF900 III. As garrafas foram incubadas a 27°C e observadas diariamente a fim de se acompanhar os efeitos citopáticos.

Partículas virais são, em geral, liberadas no meio 72 horas após a transfecção. No entanto, as células podem não apresentar todos os sinais de infecção viral até 4 ou 5 dias após a transfecção (Quadro 7). A partir da observação do fenótipo de infecção tardio (24-72h) o sobrenadante pode ser coletado e utilizado para infectar células e aumentar o título viral.

Quadro 7-Efeitos citopáticos observados em células de inseto após a transfecção com bacmídeo recombinante.

Sinais de infecção	Fenótipo
<i>Precoce (<24h)</i>	Aumento do diâmetro celular. Aumento no tamanho do núcleo.
<i>Tardio (24-72h)</i>	Crescimento celular interrompido. Aparência granular, sinais de brotamento viral. Perda de adesão, células se soltam.
<i>Bastante tardio (72h)</i>	Lise celular.

Fonte: Manual Bac-to-Bac® HBM TOPO® (INVITROGEN, 2009a)

3.2.3.2. Amplificação do estoque de baculovírus recombinantes

Após 72h da transfecção, quando foi possível constatar efeito citopático, os vírus recombinantes foram isolados a partir do sobrenadante das culturas que receberam o bacmídeos. Cada sobrenadante foi coletado, centrifugado (500 g, 5 min), filtrado (filtro 0,22 µm) e denominado passagem viral 1 (P1). Para amplificação do estoque viral, 500 µL de cada P1 foi adicionado a uma nova cultura de SF9 (T25, densidade 2x10⁶ células/mL), sendo a cultura incubada devidamente até observação novamente dos

efeitos citopáticos (aprox.72h). Este procedimento foi repetido até se obter a passagem viral 3 (P3). Estoques virais foram suplementados com 2% de SFB, armazenados a 4°C e protegidos da luz.

3.2.4. Expressão e purificação das proteínas recombinantes ZIKV-E e CHIKV-E2

Testes iniciais de expressão foram realizados em culturas SF9 e *High Five*. Para SF9, 2 mL da P3 de cada baculovírus recombinante (BV_{ZIKV-E} e $BV_{CHIKV-E2}$) foi adicionada, isoladamente, em garrafas (densidade 2×10^6 células/mL com 40 mL de cultura em suspensão. Estas foram mantidas em agitador orbital por 72 h (100 rpm, 27 °C).

Uma vez que células *High Five* precisam ser adaptadas para culturas em suspensão, optou-se por testar inicialmente em garrafa T75, com cultura aderente: 4×10^5 células/mL foram infectadas com 3 mL de P3 do $BV_{CHIKV-E2}$, considerando o título 10^7 virions/mL a uma MOI de 5 virions/célula. A garrafa foi incubada a 27 °C por 72 h.

Para cada cultura foi feita uma centrifugação inicial a 5000 g por 3 min para separar células do sobrenadante e, em seguida, o sobrenadante foi coletado encaminhado para ultracentrifugação (80.000g, 4°C, 60 minutos). Coletou-se novamente o sobrenadante e este foi submetido a purificação em coluna de afinidade Histrap (1mL) no aparelho ÄKTAprime plus (GE).

A cada purificação a coluna foi inicialmente equilibrada com tampão (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8,0). A amostra foi passada pela coluna e, após lavagem, foi feita a eluição com gradiente de Imidazol (0-500 mM). Frações referentes ao pico de proteína foram coletados, e concentrados em coluna Amicon (Membrana NMWL 10 kDa, Merck). As análises de expressão e purificação das proteínas foram realizadas por SDS page, como descrito no item 3.3do Capítulo I.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DE CÓDONS DAS SEQUÊNCIAS EXISTENTES PARA EXPRESSÃO EM SISTEMA BACULOVÍRUS

O programa *ATGme* diferencia códons que são usados com frequências baixas (5 a 10%, denominados raros e assinalados em laranja) daqueles usados com frequências ainda mais baixas ($\leq 5\%$, denominados altamente raros e assinalados em vermelho). A análise de códons das sequências já disponíveis no laboratório revelou que a otimização prévia melhorou as sequências para expressão em ambas as linhagens de células de inseto, uma vez que eliminou a presença de códons altamente raros da sequência (códons vermelhos), como pode ser visto na Figura 22.

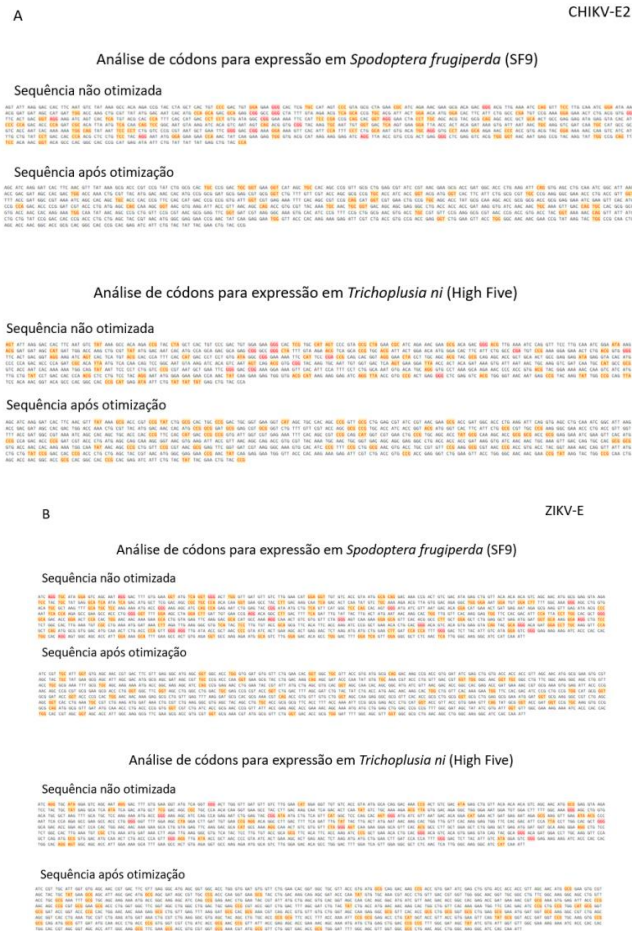


Figura 31- Análise de códons da sequência CHIKV-E2 (A) e ZIKV-E (B) antes e após otimização para *E.coli* tendo como base a tabela de códons das linhagens SF9 e High Five. O programa *ATGme* diferencia códons que são usados com frequências baixas (5 a 10%, denominados raros e assinalados em laranja) daqueles usados com frequências ainda mais baixas ($\leq 5\%$, denominados altamente raros e assinalados em vermelho).

4.1 GERAÇÃO DOS VETORES pFastBac RECOMBINANTES

A primeira etapa de construção dos vetores pFastBac recombinantes consistiu na obtenção dos insertos por meio de reação de PCR utilizando como molde plasmídeos contendo os genes de interesse. A Figura 32 mostra o resultado do gel de agarose após a PCR indicando bandas de tamanho esperado para cada fragmento (CHIKV-E2:1092 pb e ZIKV-E: 1344 pb).

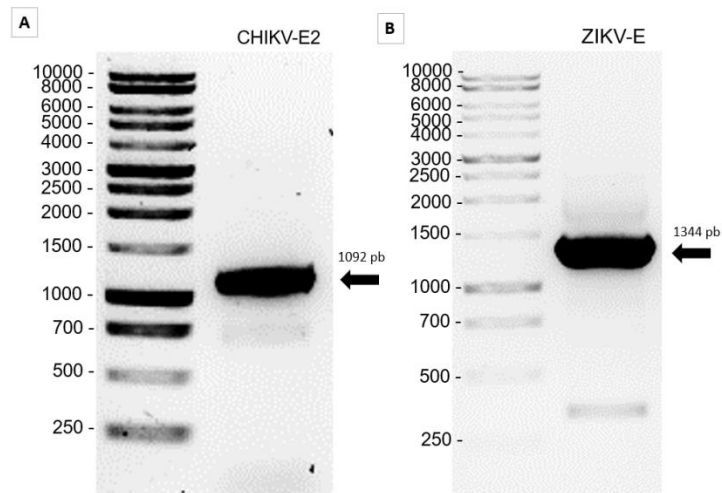


Figura 32-Gel de agarose após a PCR mostrando a amplificação dos fragmentos de CHIKV-E2 (A) e ZIKV-E (B). Bandas no tamanho esperado de 1092 pb para CHIKV-E2 e 1344 pb para ZIKV-E.

Em seguida, esses fragmentos foram excisados, purificados e utilizados na ligação ao pFastBac TOPO. O produto da ligação foi utilizado para transformar bactérias da linhagem DH5 α , que após recuperação foram semeadas em meio seletivo (LB ágar-Amp). Clones resistentes foram submetidos à extração de DNA plasmidial, para a confirmação da inserção correta do inserto no vetor, por digestão enzimática e/ou PCR.

A Figura 33 demonstra que os cinco clones pFast_CHIKV-E2 testados foram positivos, sendo que a digestão com *Bam*HI e *Hind*III indica que o inserto foi inserido com sucesso, pois são enzimas externas ao gene de interesse, liberando um fragmento de tamanho próximo ao do plasmídeo vazio (4671 pb) e um de tamanho próximo ao do inserto CHIKV-E2 (1245 pb) (Figura 33. A). Neste caso, foi necessária uma confirmação de que o gene foi inserido na orientação correta, sendo feita uma PCR utilizando um iniciador interno, CHIKV-E2 (F) e um externo, SV40 polyA(R). Nas

cinco reações, o fragmento amplificado apresentou tamanho esperado (1200 pb) (Figura 33 B).

Para a confirmação da construção pFast_ZIKV-E foi possível utilizar a enzima *EcoRV* que possui um sítio de restrição externo (no plasmídeo) e um interno (no gene). A reação foi positiva para dois clones (4 e 5), mostrando uma banda maior de 4749 pb e uma menor de 1419 pb (Figura 33 C).

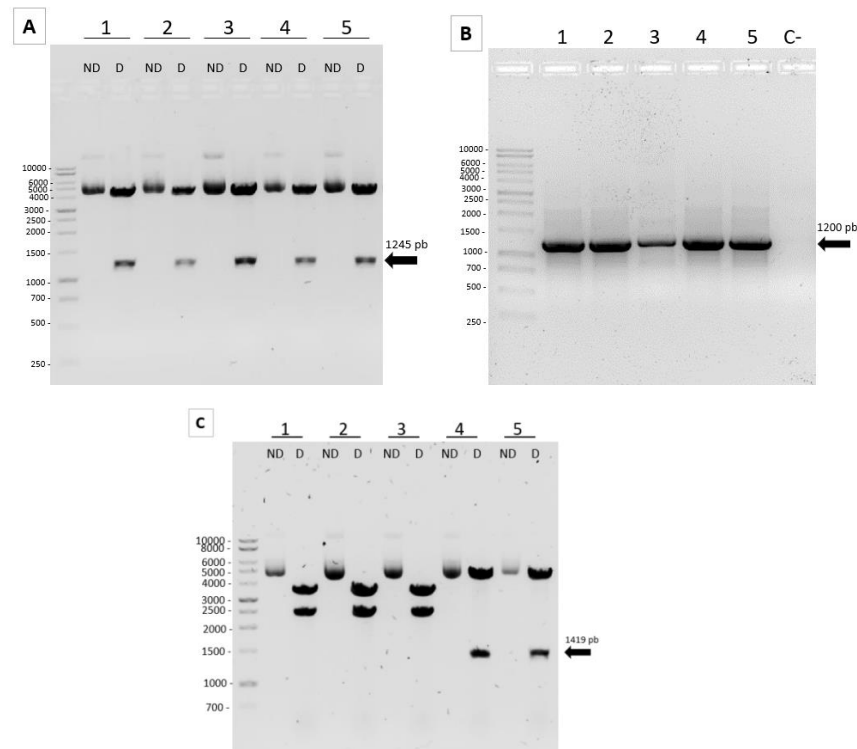


Figura 33- Confirmação da construção dos vetores recombinantes pFast_CHIKV-E2 e pFast_ZIKV-E. A: Restrição enzimática do pFast_CHIKV-E2 com as enzimas *BamHI* e *HindIII*. B: PCR utilizando iniciadores CHIKV-E2(F) e SV40 polyA(R) e o pFast_CHIKV-E2 como DNA molde. C: Restrição enzimática do pFast_ZIKV-E com a enzima *EcoRV*. Clones testados 1 a 5, ND: não digerido, D: digerido.

4.2 CONSTRUÇÃO DOS BACMÍDEOS RECOMBINANTES CONTENDO OS GENES ZIKV-E E CHIKV-E2

Bactérias da linhagem DH10Bac foram transformadas com os vetores pFastBac Gus (controle da transposição), pFast_CHIKV-E2 e pFast_ZIKV-E e crescidas em placas contendo Xgal. A Figura 34 mostra a análise por eletroforese da PCR utilizando iniciadores pUC/M13 e os bacmídeos recombinantes purificados como DNA alvo. As bandas referentes as reações com os bacmídeos CHIKV-E2 e ZIKV-E condizem com o esperado (2500 pb + tamanho do inserto), sendo de 3592 pb e 3844

pb respectivamente. O fragmento referente ao bacmídeo gerado a partir do pGUS (C+) também apresentou banda de tamanho esperado no gel (4200 pb).

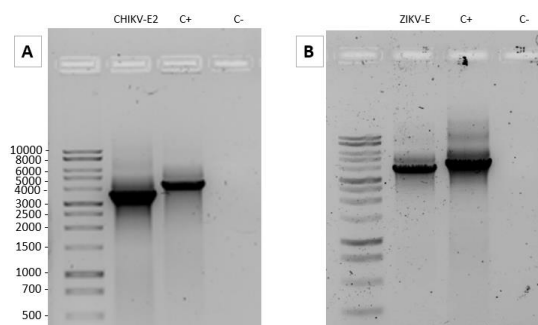


Figura 34- Análise eletroforética por gel de agarose da PCR de confirmação da transposição dos genes de interesse para formação dos bacmídeos recombinantes. (C+): controle positivo da transposição, reação feita com bacmídeo obtido após transformação de bactérias DH10Bac com pGUS, (C-): controle negativo da PCR, feito com todos os reagentes exceto DNA.

4.3 PRODUÇÃO DE ZIKV-E EM SF9

Após a confirmação da transposição dos genes de interesse na sequência do bacmídeo, estes foram purificados e utilizados para transfectar células da linhagem SF9. A Figura 35 ilustra alguns dos efeitos citopáticos observados após 96 h de transfecção das células com o bacmídeo de ZIKV-E. Foi possível observar a lise das células e, conseqüentemente, diminuição da densidade celular e aumento no diâmetro do núcleo, quando comparado ao controle de células não infectado (CC). Para CHIKV-E2 também foram observados efeitos citopáticos, porém menos evidentes.

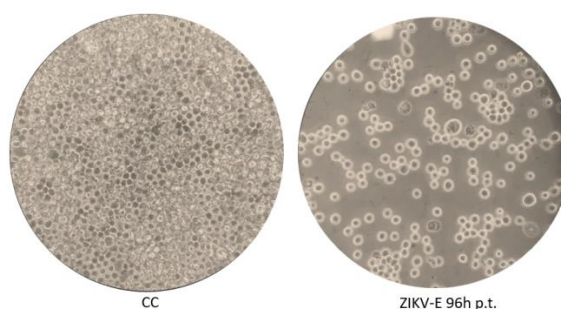


Figura 35- Foto representativa dos efeitos citopáticos observados em células SF9 após transfecção com o bacmídeo recombinante. Comparação entre controle de células não infectado (CC) e cultura 96 h após a transfecção com o bacmídeo, sendo possível observar a diminuição da densidade celular e aumento no diâmetro do núcleo. Exemplo observado para a cultura transfectada com o bacmídeo recombinante de ZIKV-E.

Após 96 h da transfecção, o vírus foi purificado do sobrenadante da cultura infectada e utilizado para infectar novas células SF9. Esse passo foi repetido por mais

2 vezes, com intuito de aumentar o título viral e em seguida foi realizado o primeiro teste de expressão da proteína ZIKV-E em 40 mL de cultura de SF9, em suspensão. Após 72 h da infecção, a cultura foi centrifugada e o sobrenadante submetido a purificação por afinidade em coluna Histrap. A Figura 36 mostra a análise por gel de poliacrilamida desta etapa contendo o sedimento (*pellet*, P) e sobrenadante (S) de ambas as culturas (CC e Infectada com BVE- ZIKV-E), assim como uma fração da purificação da proteína ZIKV-E após concentração em coluna Amicon. É possível perceber uma banda de 56 kDa no sobrenadante da cultura infectada e um pouco mais proeminente na porção purificada e concentrada. A confirmação de que se tratava da proteína de interesse foi possível pelo *Western blot* com anticorpo anti-His. O rendimento aproximado deste teste de expressão foi de 0,5 ug/L cultura.

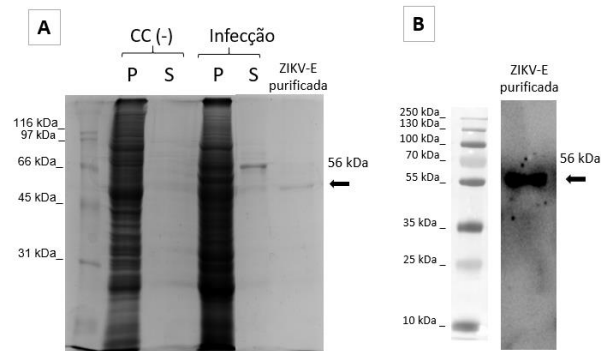


Figura 36- Análise da produção da proteína ZIKV-E em BVE. A: gel de poliacrilamida mostrando as frações do sedimento (P) e sobrenadante (S) de ambas as culturas (CC e Infectada com BVE- ZIKV-E), assim como uma fração da purificação da proteína ZIKV-E após concentração em coluna Amicon. B: *Western blot* da proteína purificada utilizando anti-His.

4.3.1 ELISA da proteína ZIKV-E produzida em sistema baculovírus

O primeiro teste utilizando a proteína ZIKV-E em ELISA foi uma titulação do antígeno a partir de dois *pools* de soro (um positivo e um negativo) diluídos 1:100 (Figura 37 A) para detecção de IgG. Foi estabelecido o uso de 200 ng de antígeno/poço como o título mínimo ideal de antígeno com base na distinção satisfatória (Razão=5,6) entre absorvâncias positivas e negativas das amostras (Figura 37 B). A partir dos ensaios de titulação das amostras, ficou estabelecida a diluição de soro 1:200 como a diluição ideal para discriminar amostras positivas de negativas, pois mostrava uma razão de 7,9 vezes e um baixo *background* para

amostras negativas. A partir desta padronização, foi feito um ensaio com amostras individuais (sendo oito amostras positivas para ZIKV pelo teste realizado na FUNED: 331, 339, 368, 374, 385, 388, 393, 398, e sete amostras negativas: 449, 457, 470, 474, 535, 579) (Figura 37 C). Este ensaio demonstrou que a proteína ZIKV-E produzida em sistema baculovírus possui grande potencial para diferenciar amostras positivas de negativas em plataforma ELISA, resultado bem diferente da mesma proteína expressa em *E.coli*, como demonstrado no Capítulo 1. A correlação entre os índices obtidos pelo teste comercial e os testes *in house* não foi possível uma vez que as amostras de ZIKV foram pré-caracterizadas pela FUNED (definidas apenas por caráter qualitativo) e não foram re-testadas no CT-Vacinas.

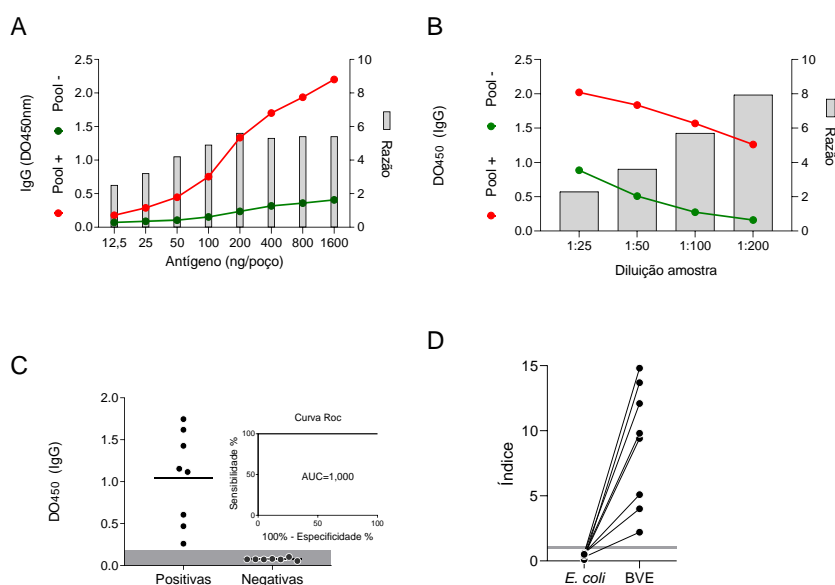


Figura 37-Análise de desempenho da proteína ZIKV-E produzida em sistema baculovírus em plataforma ELISA IgG. A: Titulação do antígeno frente a um *pool* de soros negativo (verde) e um *pool* positivo (vermelho) para ZIKV. B: Análise da diluição ideal da amostra. C: Desempenho da proteína ZIKV-E utilizando amostras individuais após as padronizações mostradas em A e B e sua curva ROC gerada a partir dos dados. D: Comparativo entre os índices obtidos ao se testar as mesmas amostras positivas com as duas proteínas ZIKV-E, a produzida em *E.coli* e a produzida em BVE.⁷

4.4 PRODUÇÃO DE CHIKV-E2 EM SF9 E HIGH-FIVE

Assim como para ZIKV-E, também foi realizado um teste de expressão para CHIKV-E2 em 40 mL de cultura de SF9 em suspensão. Após 96 h a cultura foi centrifugada e o sobrenadante submetido a purificação por afinidade em coluna

⁷ Para as amostras de ZIKV-E não havia dados quantitativos por kit comercial. Amostras positivas: 331,339,368,374,385,388,393,398; amostras negativas: 449,457,470,474,535,579.

Histrap. A Figura 38 A mostra a análise da fração referente ao pico de purificação de CHIKV-E2 após concentração em coluna Amicon. O rendimento desse teste foi de 0,4ug/L de cultura. Apesar de pouco proeminente em gel de poli-acrilamida, foi possível constatar a expressão da proteína de interesse por meio de western blot (Figura 38 B) com anticorpo policlonal específico anti-CHIKV-E2 (produção descrita no Capítulo 1), sendo que a banda possui tamanho esperado de 43 kDa.

Um teste de expressão para CHIKV-E2 foi realizado em células High-five aderentes, em 15 mL de cultura. Após a análise por SDS page, não foi possível observar presença da proteína de interesse na fração secretada da cultura. Foi feito então um teste com o sedimento de células e, após a lise do mesmo por sonificador, constatou-se que a proteína de interesse estava dentro da célula e, em sua maioria, insolúvel. A Figura 38C e D mostra os resultados deste teste de expressão por gel de poli-acrilamida e Western blot feito com anticorpo policlonal anti-CHIKV-E2.

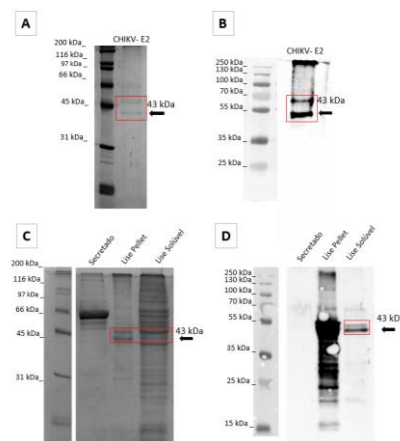


Figura 38 - Análise da produção da proteína CHIKV-E2 em BVE. Foi observado um padrão de banda dupla (caixa vermelha) para esta proteína com uma banda acima do tamanho esperado (peso molecular teórico: 43 kDa). A: gel de poli-acrilamida da fração purificada e B: *Western blot* deste gel utilizando anticorpo policlonal anti-CHIKV-E2, ambos da produção em célula *SF9*. C: gel de poli-acrilamida das frações secretada, sedimento após lise e fração solúvel após lise da cultura *High-Five* expressando a proteína CHIKV-E2. D: *Western blot* do gel C, utilizando anticorpo policlonal anti-CHIKV-E2.

4.4.1 ELISA da proteína CHIKV-E2 produzida em sistema baculovírus

A proteína CHIKV-E2 produzida e purificada a partir de células *SF9* foi utilizada para sensibilizar placas de ELISA para detecção de anticorpos do tipo IgG. Com base na padronização da proteína CHIKV-E2 produzida em *E.coli*, foi feito um ensaio deste

antígeno produzido em baculovírus utilizando amostras individuais (oito positivas para CHIKV por kit comercial: 4700,4781, 4801, 4810, 5021,5026, 5095,4908e oito de doadores saudáveis, negativos para CHIKV: FFB, AFC, M11S, VGB,B5S, GMF,R22,L8P). A correlação entre as absorbâncias foi feita utilizando-se as mesmas amostras testadas por kit comercial e ELISA com a proteína E2 de *E.coli* (Capítulo I)(Figura 38 A). A área sobre a curva ROC (AUC=0,967) demonstra que o teste teve um desempenho aceitável, porém, as absorbâncias das amostras positivas ficaram mais baixas quando comparadas ao observado para o mesmo antígeno expresso em sistema procaríoto e testado com as mesmas amostras. Isso pode ter ocorrido devido a quantificação inexata do antígeno de BVE, uma vez que ele se encontrava em concentração muito baixa (inferior a 100 ng/uL após a concentração em coluna de gel filtração). Conseqüentemente, este valor pode ter sido superestimado e a quantidade de antígeno utilizada para sensibilizar a placa foi menor do que o esperado. A comparação entre as absorbâncias das mesmas amostras diante das duas proteínas CHIKV-E2 (de *E. coli* e de BVE) revelou um alto grau de correlação ($r=0,8536$), e com o kit comercial essa correlação foi dada por um índice de $r=0,2619$.

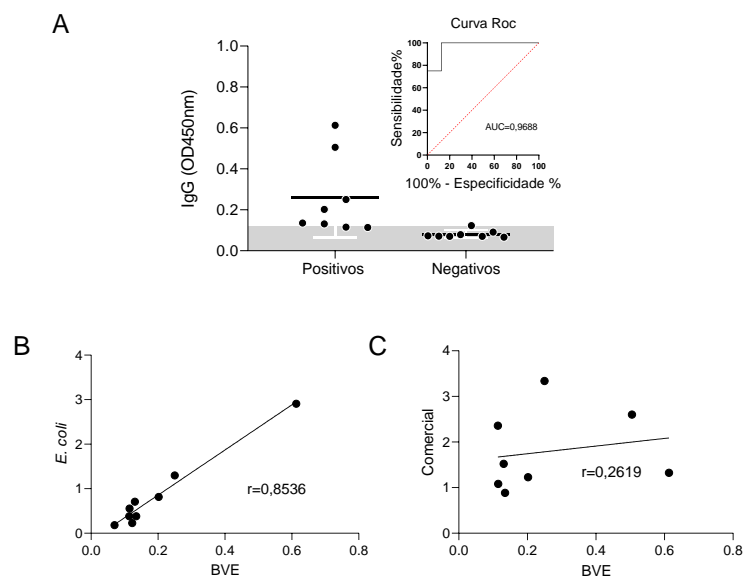


Figura 39- Análise de desempenho da proteína CHIKV-E2 produzida em sistema baculovírus em plataforma ELISA IgG. A:Ensaio de sensibilidade e especificidade com sua respectiva curva ROC a direita. B: Correlação comparando os resultados de ELISA para as proteínas CHIKV-E2 produzidas a partir de dois sistemas heterólogos diferentes: *E. coli* e BVE. C: Correlação comparando os resultados de ELISA para o Kit comercial e para a proteína produzida em BVE.

5 DISCUSSÃO

A expressão de proteínas de arbovírus em sistema baculovírus é uma estratégia que vem sendo utilizada por empresas desenvolvedoras de sistemas diagnósticos por gerar antígenos solúveis e conformacionais. Além disso, muitos fabricantes de proteínas recombinantes optam pela expressão de proteínas de arbovírus em células de inseto, pelo padrão de glicosilação mais próximo do padrão original da proteína alvo.

Os sistemas eucariotos, geralmente produzem proteínas em sua conformação nativa, preservando modificações pós-traducionais, como a glicosilação (NIGI; FAIRALL; SCHWABE, 2017). De fato, cada sistema de expressão possui um ambiente bioquímico específico, que afeta a produção e a conformação de proteínas. A disponibilidade de cofatores e enzimas que introduzem modificações pós-traducionais são importantes para a atividade biológica da proteína desejada. Portanto, ferramentas de diagnóstico que incluem antígenos virais contendo glicanos (quando o antígeno original é naturalmente glicosilado) geralmente apresentam sensibilidades e especificidades mais altas, considerando que uma proporção substancial de anticorpos em pacientes infectados é direcionada contra epítomos virais de glicano (BANERJEE; MUKHOPADHYAY, 2016).

Este capítulo descreveu a expressão de duas proteínas de interesse em sistema baculovírus. Ambas apresentaram potencial de diferenciar amostras positivas de negativas em plataforma ELISA IgG. No entanto, o rendimento ficou muito abaixo do necessário para realização de todos os testes propostos. O fato de que, mesmo com o sinal de secreção, uma pequena fração dessas proteínas terem sido secretadas, sendo sua maioria expressas de forma insolúvel foi algo bastante inesperado e levanta dúvidas acerca da padronização dessa expressão. A titulação viral é um passo essencial, mas que não foi realizado pois não houve formação de placas em células *SF9*. De fato, as células ideais para esta etapa não estavam disponíveis no laboratório. Trata-se da linhagem *Sf-9ET* (*Sf-9Easy Titer*) que possui o gene da proteína verde fluorescente (eGFP) sob o controle do promotor da poliedrina do baculovírus (HOPKINS; ESPOSITO, 2009).

Uma parceria com o professor Bergmann Ribeiro da Universidade de Brasília foi firmada para aquisição das células *Sf-9ET* e treinamento necessário para a

melhoria na expressão de proteínas em sistema baculovírus. Por conta da pandemia do SARS-CoV-2 este treinamento teve que ser postergado.

6 CONCLUSÃO

Ainda que com um rendimento baixo, foi possível produzir as proteínas CHIKV-E2 e ZIKV-E em sistema baculovírus e as mesmas apresentaram potencial antigênico satisfatório em plataforma ELISA IgG.

CAPÍTULO V

Desenvolvimento e validação de um Kit de ELISA para o diagnóstico do SARS-CoV-2 e avaliação da resposta sorológica em pacientes com COVID-19

“Todo mundo é culpado de alguma coisa e todo mundo ainda guarda uma memória da inocência da infância, não importa quantas camadas de vida a cubram.

A humanidade é inocente.

A humanidade é culpada.

Ambas as afirmações são inegavelmente verdadeiras.”

Neal Shusterman, O Ceifador (2017).

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 COVID-19

A COVID-19 provoca uma síndrome respiratória aguda que pode variar entre casos leves -cerca de 80% -a casos muito graves com insuficiência respiratória -entre 5% e 10%. Neste último caso, o paciente necessita de tratamento especializado em unidades de terapia intensiva (UTI) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Dentre as características clínicas principais da doença foram relatadas febre (88,7%), tosse (57,6%) e dispneia (45,6%). Dentre os 20,3% dos pacientes que necessitaram de UTI, 32,8% apresentaram Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), 13,0% apresentaram lesão cardíaca, 7,9 % apresentaram lesão renal e 13,9% vêm a óbito(RODRIGUEZ-MORALES *et al.*, 2020).

Gotículas de saliva e contato próximo são as rotas mais comuns de transmissão do SARS-CoV-2, podendo também ocorrer por aerossol (HAQUE *et al.*, 2020). Pesquisas detectaram o SARS-CoV-2 em amostras do trato gastrointestinal, saliva, urina, fezes, lágrimas e secreções conjuntivais de pacientes com COVID-19 (CHENG *et al.*, 2007; XIA *et al.*, 2020; XIAO *et al.*, 2020).

O tempo de incubação do vírus pode variar de 2 a 14 dias (ADHIKARI *et al.*, 2020). No entanto, o período máximo de incubação, aferido, foi de 24 dias, o que pode aumentar ainda mais o risco de transmissão do vírus (WANG *et al.*, 2020).

1.2 ESTRUTURA E GENOMA DO SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 é um vírus envelopado, esférico, com cerca de 120 nm de diâmetro, de genoma linear, possuindo RNA de fita simples e orientação positiva. Membros da família *Coronaviridae* possuem os maiores genomas dentre os vírus de RNA, apresentando de 27 a 32 kb. O genoma de RNA é associado à proteína N formando o nucleocapsídeo (CORMAN, V. M.; MUTH, D.; NIEMEYER, D.; DROSTEN, 2018).

A análise genômica de SARS-CoV-2 revelou que a similaridade da sequência nucleotídica com os genomas de SARS-CoV e do coronavírus de morcego (SARSr-CoV-RaTG13) são de 79,5% e 96%, respectivamente (CHENG *et al.*, 2007).

O RNA genômico codifica para ORF1a e ORF1b, que dão origem às proteínas não-estruturais, a partir das poliproteínas pp1a e pp1ab que são processadas pela polimerase viral (RdRp) e outras proteínas não-estruturais (NSPs) envolvidas na

síntese de RNA (NSP1-NSP16). NSP3 e NSP5 codificam para protease semelhante a papaína (PLP) e 3CL-protease, respectivamente. Ambas atuam na clivagem de polipeptídeos e bloqueiam a resposta imune inata do hospedeiro. NSP12 codifica para a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) enquanto NSP15 codifica para RNA helicase.

Já as proteínas estruturais, expressas a partir do RNAs subgenômico, são denominadas *Spike* (S), envelope (E), membrana (M), e Nucleocapsídeo (N). A proteína S interage com os receptores celulares, participando da penetração viral sendo um alvo do sistema imunológico e importante para testes de diagnóstico e desenvolvimento de vacinas (XIONG *et al.*, 2020). Ela se projetada superfície viral, como espículas, dando um aspecto de coroa, o que originou o nome “coronavírus” (Figura 40).

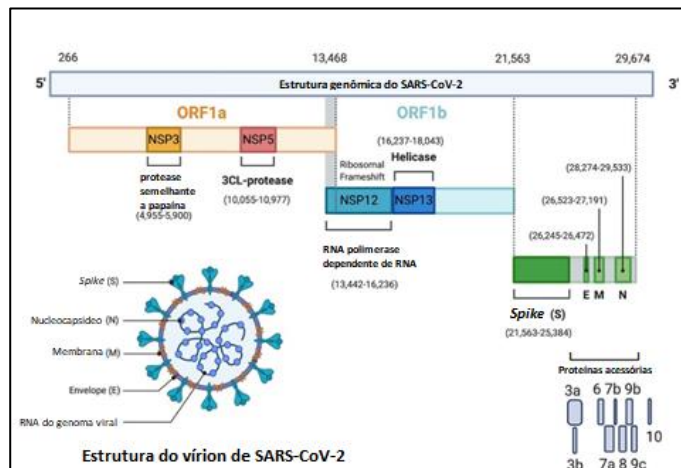


Figura 40 - Organização genômica e estrutura do SARS-CoV-2. O genoma do SARS-CoV-2 codifica duas ORFs: ORF1a (amarelo) e ORF1b (azul), que por sua vez, codificam 16 proteínas não estruturais (NSP1- NSP16). Essas NSPs são processadas para formar um complexo de replicação-transcrição (RTC) envolvido na transcrição e replicação do genoma. NSP3 e NSP5 codificam para protease semelhante a papaína (PLP) e 3CL-protease, respectivamente. Ambas atuam na clivagem de polipeptídeos e bloqueiam a resposta imune inata do hospedeiro. NSP12 codifica para a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) enquanto NSP15 codifica para RNA helicase. Os genes estruturais codificam as proteínas estruturais: *spike* (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N), destacados em verde. As proteínas acessórias (tons de cinza) são exclusivas do SARS-CoV-2 em termos de número, organização genômica, sequência e função (ALANAGREH *et al.*, 2020).

A porção S1 contém o domínio de ligação ao receptor (*receptor binding domain* - RBD) e a subunidade S2 é clivada em S2' para formar o peptídeo de fusão (ZHANG *et al.*, 2020b). Estudos anteriores demonstraram que a proteína S dos coronavírus é trimérica e possui dois estados estruturais -denominados pré-fusão e

pós-fusão sendo que o reconhecimento pelo sistema imunológico do estado de pré-fusão exibido na superfície viral é crucial para montar uma resposta imune eficaz (LI, 2016).

1.3 RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA AO SARS-CoV-2

Estudos demonstraram que pacientes com SARS-CoV-2 desenvolvem resposta de anticorpos neutralizantes específicos e de alto título contra a porção S1 da proteína S (LV *et al.*, 2020), além de respostas celulares robustas (THEVARAJAN *et al.*, 2020). Entretanto, a magnitude das respostas de anticorpos parece relacionada à gravidade clínica da doença. Em um estudo com 175 pacientes confirmadamente infectados, 10 não desenvolveram anticorpos neutralizantes específico para SARS-CoV-2, mas anticorpos específicos não-neutralizantes ainda foram detectados (por ELISA) (WU *et al.*, 2020). Há relatos de diminuição de anticorpos anti-S1 neutralizantes na infecção por SARS-CoV após dois meses de infecção (CHANNAPPANAVAR *et al.*, 2014).

Ainda não está claro por quanto tempo dura a imunidade ao SARS-CoV-2 após a recuperação da infecção. Estudos revelando que os anticorpos para o vírus são mantidos por apenas dois meses levantaram questões acerca da longevidade da imunidade contra o vírus. Entretanto, é importante ressaltar que células B e T de memória podem ser mantidas, mesmo se não houver níveis mensuráveis de anticorpos séricos (COX; BROKSTAD, 2020).

Hachim e colaboradores avaliaram os perfis de anticorpos anti-SARS-CoV-2 contra 15 antígenos do vírus (estruturais e não estruturais). Este estudo foi realizado com amostras de plasma de pacientes com COVID-19, a partir de um ensaio de imunoprecipitação, e revelou que anticorpos anti-N dominaram a resposta humoral detectada pela técnica (HACHIM *et al.*, 2020).

1.4 Antígenos de SARS-CoV-2 com potencial para o diagnóstico sorológico

No início da pandemia do novo coronavírus, o que se tinha descrito na literatura para o SARS-CoV foi de grande auxílio para as abordagens estratégicas de diagnóstico do SARS-CoV-2, uma vez que estes dois vírus apresentam 70% de similaridade genômica (CHEN *et al.*, 2020).

A princípio, este estudo foi baseado em publicações do SARS-CoV que descreveram a glicoproteína de superfície (S) com grande potencial antigênico, fazendo parte do primeiro contato do vírus com receptores celulares (CHEN *et al.*, 2005; CHENG *et al.*, 2007). Além disso, estudos para o SARS-CoV também demonstraram que proteína no nucleocapsídeo (N) é altamente expressa durante a infecção, aparentando ser imunodominante durante a montagem da resposta do hospedeiro (CARATTOLI *et al.*, 2005; DUTTA *et al.*, 2008; SAIJO *et al.*, 2005). Um ELISA indireto utilizando a proteína N de SARS-CoV, apresentou especificidade para detecção de IgG e IgM de 95,3 e 96,6%, respectivamente, com sensibilidades correspondentes de 94,3 e 59,4% (WOO *et al.*, 2004). Dessa forma, a mesma possui um potencial sorodiagnóstico considerável, razão pela qual também foi selecionada para esse projeto.

Estudos mais recentes para o SARS-CoV-2 reafirmaram que a proteína N é, de fato, imunodominante (GUO *et al.*, 2020; HACHIM *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2020). Em comparação com S1, ELISA utilizando como antígeno a proteína N apresentaram maior sensibilidade na detecção de anticorpos em pacientes levemente infectados e maior correlação com testes de neutralização por redução de placa. No entanto, esta observação requer uma confirmação utilizando uma coorte maior de pacientes com diferentes níveis de gravidade da doença (TOUMA, 2020).

Um estudo para SARS-CoV-2 expressou os resíduos 319–591 aa da proteína S em células FreeStyle 293 e testou sua reatividade contra três anticorpos monoclonais de SARS-CoV (WRAPP *et al.*, 2020). Neste estudo, nenhuma reação cruzada foi detectada, indicando ser uma região antigênica específica para SARS-CoV-2. Okba e colaboradores demonstraram que a subunidade S2 é mais conservada entre os coronavírus e, portanto, desempenha um papel na reatividade cruzada

observada quando a proteína S inteira é usado como antígeno em ensaios sorológicos. Dessa forma, S1 é mais específica do que S para o diagnóstico sorológico de SARS-CoV-2 (OKBA *et al.*, 2020).

1.4.1 ELISAs comerciais para detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2

Dentre os imunoenaios para COVID-19 disponíveis, aqueles que detectam anticorpos IgA parecem mostrar alta sensibilidade, enquanto os anticorpos IgG têm uma duração mais longa e melhor especificidade, sendo mais apropriados para estudos de sorovigilância (OKBA *et al.*, 2020).

Os estudos de validação envolvendo ELISA comerciais para a detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 são controversos, provavelmente devido a análise relacionada ao tempo após infecção e número de amostras testadas.

Um estudo comparativo analisou três ELISA comerciais para detecção de IgG anti SARS-CoV-2, sendo eles: *anti SARS-CoV-2 ELISA* (IgG) (Euroimmun, Alemanha S: 86,4%, E: 96,2%), *EDI New Coronavirus COVID-19 IgG ELISA*, (Epitope diagnostics (EDI), EUA, S: 100%, E: 82,7%), o *recomWell SARS-CoV-2 IgG ELISA* (Mikrogen, Alemanha, S: 86,4%, E: 100%). Eles consideraram 22 soros positivos (qPCR positivo para SARS-CoV-2 coletados 11,9 ±5,0 dias após o aparecimento dos sintomas) e 53 negativos. Os soros foram considerados positivos para IgG anti-SARS-CoV-2 se pelo menos dois dos ensaios testados apresentassem resultados positivos (KRÜTTGEN *et al.*, 2020).

Lassaunière e colaboradores avaliaram o desempenho de três ELISA para COVID-19 em amostras de soro obtidas de pacientes com COVID-19 (confirmação por qPCR, sem descrição do tempo pós infecção) internados em unidade de terapia intensiva (n = 30). Os resultados mostraram 100% de especificidade para o produto ELISA *Wantai SARS-CoV-2 Total Antibody*(China), 93% para o da Euroimmun IgA e 96% para IgG, com sensibilidades de 90%, 90% e 65%, respectivamente (LASSAUNIÈRE *et al.*, 2020).

Já num outro estudo, o ELISA *Wantai SARS-CoV-2 Total Antibody* apresentou sensibilidade de 62% (59/95) e especificidade de 98% (125/128). A sensibilidade

aumentou para 79% (38/48) em pacientes com pelo menos 7 dias de sintomas (ONG *et al.*, 2020).

Charlton e colaboradores (2020) avaliaram seis produtos comerciais sendo dois imunoenaios de quimioluminescência: CMIA / CLIA SARS-CoV-2 IgG (Abbott, EUA); e SARS-CoV-2 S1 / S2 IgG (DiaSorin, EUA), três ELISAs: EDI Novel coronavirus COVID-19-IgM e -IgG (Epitope Diagnostics, Canadá); Novel Coronavirus COVID-19 IgM e IgG (DRG International por BioRad, EUA); e de anti-SARS-CoV-2 ELISA - IgA e -IgG (Euroimmun, Alemanha), além de um imunoensaio de eletroquimioluminescência, ou ECLIA: Anti-SARS-CoV-2 (Roche Diagnostics, EUA). As amostras utilizadas foram coletadas de pacientes hospitalizados confirmados como positivos para SARS-CoV-2 por qPCR (CHARLTON *et al.*, 2020). Foram utilizadas 46 amostras de 28 pacientes com teste positivo para SARS-CoV-2 por qPCR e 50 amostras negativas (coletadas antes de 1º de novembro de 2019). A sensibilidade dos imunoenaios enzimáticos (EIA, do inglês *enzyme immunoassays*) variou de 50-100%, sendo que apenas quatro ensaios (Abbot, Affinity, Biorad e Euroimmun) apresentaram sensibilidade maior que 95% para IgG considerando amostras com mais de 21 dias após o início dos sintomas (n=8). A especificidade geral para os EIAs foi de 92-100%. Testes do tipo POC apresentaram sensibilidade variada (0-100%) considerando amostras com mais de 21 dias após o início dos sintomas, e especificidade de 96-100%.

Um sumário desses estudos está disponível na Tabela 8.

Tabela 8: Revisão de algumas publicações envolvendo kits comerciais para detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2.

Tipo	Teste	Antígeno	Sensibilidade	Especificidade	Referência
ELISA	Euroimmun <i>anti SARS-CoV-2 ELISA (IgG)</i>	S1	63% ¹ -100% ³	100%	Charlton <i>et al.</i> (2020)
			86,4% ¹ 65% ¹	96,2% 96%	Krüttgen <i>et al.</i> (2020) Lassaunière <i>et al.</i> (2020)
	Euroimmun <i>anti SARS-CoV-2 ELISA (IgA)</i>	S1	78-88% ³	100%	Charlton <i>et al.</i> , (2020)
			90% ¹	93%	Lassaunière <i>et al.</i> (2020)
	<i>EDI New Coronavirus COVID-19 IgG ELISA</i>	N	100% ¹ 82% ² - 100% ³	82,7% 98%	Krüttgen <i>et al.</i> (2020) Bundschuh, <i>et al.</i> (2020)
			Mikrogen <i>recomWell SARS-CoV-2 IgG ELISA</i>	N/S	86,4% ¹
	<i>Wantai SARS-CoV-2 Total Antibody</i>	RBD	96% ¹ 62% ³ -79% ²	100% 98%	Lassaunière <i>et al.</i> (2020) Ong <i>et al.</i> (2020)
	<i>Affinity IgG</i>	S	70 ¹ -88% ⁴	100%	Charlton <i>et al.</i> (2020)
	<i>Biorad IgG</i>	N	57 ¹ -100% ⁴	100%	Charlton <i>et al.</i> (2020)
<i>Roche Total antibody</i>	N	71 ¹ -80% ⁴	100%	Charlton <i>et al.</i> (2020)	
CMIA	<i>Abbot IgG</i>	N	81% ¹ -100% ⁴	98%	Charlton <i>et al.</i> (2020)
CLIA	<i>Diasorin IgG</i>	S1/S2	64 ¹ -90% ⁴	98%	Charlton <i>et al.</i> (2020)

¹ Sensibilidade geral do teste.

²Considerando amostras testadas a mais de sete dias após a infecção.

³Considerando amostras testadas a mais de 15 dias após a infecção.

⁴Considerando amostras testadas a mais de 21 dias após a infecção.

Apesar do bom desempenho de alguns testes avaliados e descritos anteriormente, é importante ressaltar que são produtos importados e de alto valor agregado, sendo muitas vezes inacessíveis e inviáveis de serem adquiridos para atender a toda população, principalmente num cenário pandêmico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um kit de ELISA para o diagnóstico sorológico da COVID-19.

2.2 Objetivos específicos

- i. Expressar e purificar as proteínas S e N de (SARS-CoV-2) em *Escherichia coli*.
- ii. Testar o potencial antigênico das proteínas produzidas em ELISA.
- iii. Avaliar a resposta de anticorpos anti-S e anti-N em soro pacientes com COVID-19.
- iv. Validar um ELISA para o diagnóstico sorológico da COVID-19.

3 METODOLOGIA

3.1 CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS CONTENDO OS GENES DE INTERESSE

Sequências genômicas completas do SARS-CoV-2 depositadas no banco de dados GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/SARS-CoV-2-seqs/>) (até 10 de março de 2020) foram alinhados no software MEGA7. A partir do alinhamento foi gerada uma sequência consenso e esta foi comparada pelo software BlastN com uma sequência brasileira depositada até o momento da busca (GenBank: MT126808.1), apresentando 100% de identidade.

Com base na literatura e análises de bioinformática, foram selecionadas as proteínas *spike* (S1, 250-667aa) e Nucleocapsídeo (N, 1-419 aa). Além disso, foram feitas análises pelo software BlastP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando as sequências selecionadas e as sequências dos demais coronavírus humanos circulantes no país (HKU1, OC43, NL63, 229E). As sequências nucleotídicas foram obtidas comercialmente, códon otimizadas para expressão em *E. coli* e inseridas em vetor pET-24a-(+).

3.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES EM *E. coli*

Bactérias da linhagem BL21(DE3) quimicamente competentes foram transformadas por choque térmico com 10 µg de plasmídeos contendo os genes das proteínas de interesse. Os clones bacterianos selecionados após a transformação foram crescidos em meio LB suplementado com antibiótico (Canamicina, 50 µg/mL) sob agitação (200 rpm, agitador orbital, 37°C) até atingir DO₆₀₀ = 0,6. Posteriormente, foi adicionado o IPTG (0,5 mM) e a cultura foi incubada em agitador sob duas condições: por 3 horas a 37°C, ou *overnight* a 20°C. Após a indução de cada cultura, as mesmas foram centrifugadas (20 min, 8000 x g, 4°C) e armazenadas a -20° C. Ressuspendeu-se cada sedimento em tampão de lise (TRIS-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, DDT 5 mM, PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*) 1 mM e Benzamidina 5 mM,

pH 8,0, 10% do volume de cultura inicial) e as amostras foram submetidas ao homogeneizador da alta pressão (Emulsiflex, Avestin, Canadá), nas condições de 7.000 a 10.000 psi, repetindo-se o processo por três vezes. As frações solúveis e insolúveis foram separadas por centrifugação (40.000 g, 30 min, 4°C) e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE), conforme descrito no item 3.3, do Capítulo I. Os lisados bacterianos foram purificados por cromatografia de afinidade, pelo kit HisTrap HP System (GE Healthcare Life Sciences) no aparelho ÄKTAprime plus (GE Healthcare Life Sciences). As proteínas purificadas foram quantificadas por kit comercial (Randox) de acordo com as recomendações do fabricante.

3.3 DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-SARS-CoV-2 UTILIZANDO PROTEÍNAS DERIVADAS DA *SPIKE*

Além das proteínas cuja construção foi feita no CT-Vacinas, também foi possível testar outros dois potenciais antígenos baseados na proteína *Spike* do SARS-CoV-2 produzidos em sistema HEK:

- S (inteira) - 200 kDa- Produção UFRJ em sistema HEK-293 (Gentilmente cedida pela Prof. Leda Castilho, UFRJ);
- S1- 35 kDa- Fapon (Comercial) Ref.: FPZ0537- Denominada nesta tese S1(F) para distinguir da S1 de produção interna em procaríoto.

3.4 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SOROTECA HUMANA

O projeto envolvendo o uso de amostra biológicas denominado “Ciência e inovação para enfrentamento da pandemia de Covid-19 por meio de ações vinculadas ao diagnóstico de SARS-CoV-2” foi submetido à Plataforma Brasil e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (CAAE: 1686320.0.0000.5149, ANEXO D).

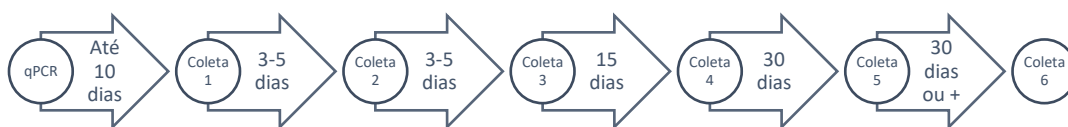
Foram obtidas coortes denominadas “controles negativos”, “indivíduos positivos” e “indivíduos suspeitos” conforme descrito a seguir”.

Controles negativos: amostras biológicas de indivíduos negativos para COVID19 obtidas por meio de doadores saudáveis (n=173) que testaram negativo para o teste de pesquisa de RNA viral qRT-PCR (n=42), ou do banco de amostras pré-pandemia (antes de 2020) (n=131).

Indivíduos positivos: amostras biológicas de indivíduos positivos para COVID19 confirmadas por pesquisa de RNA viral qRT-PCR.

Dentre as amostras positivas, há algumas de indivíduos hospitalizados e não hospitalizados, como descrito:

- i. Pacientes hospitalizados: amostras (n=21) obtidas por doação do Hospital Madre Teresa em Belo Horizonte. Os pacientes (11 indivíduos) apresentaram sintomatologia clínica para SARS-CoV-2 e tiveram confirmação clínica e laboratorial (qRT-PCR).
- ii. Estudo de soroconversão⁸: Indivíduos positivos para COVID-19 (43 indivíduos) com confirmação por qRT-PCR de *swab* nasal, não-hospitalizados, foram acompanhados por no mínimo 30 dias. Amostras de soro (total de n=166 amostras) foram coletadas de acordo com o seguinte esquema:



⁸ É importante ressaltar que este banco de amostras foi construído durante a realização dos experimentos descritos nesta tese, incluindo a validação do kit EIE-COVID-19 IgG. No início da pandemia as amostras eram uma limitação e muitos dos experimentos contaram com um número menor de amostras.

Essa coorte foi caracterizada como: 64% de pacientes do sexo feminino e 36% do sexo masculino, sendo 68% (IC: 64,7-71,3) entre 18-30 anos, 20% (IC:16,7-23,3) entre 31-40 anos e 12% (IC:8,7 -15,2) entre 41-55 anos. O tempo médio de sintomas foi de 8 a 14 dias para 60% (IC:57,8-62,1) dos indivíduos analisados, sendo que 40% (IC: 37,8-42,1) apresentaram sintomas durante menos de 7 dias, 28% (IC:25,8-30,1) apresentaram sintomas de 15-21 dias e 4% (IC:1,8-6,1) apresentaram mais de 21 dias de sintomas.

- iii. Casos suspeitos: indivíduos que não realizaram a qPCR, mas que tiveram contato com pacientes confirmados por qPCR e/ou que apresentaram sintomas de COVID-19. Todos eles foram ensaiados pelo teste rápido DPP IgM e IgG (Bio-Manguinhos, Fiocruz, Brasil) e pelo ELISA COVID-19 IgG (n=43 amostras).

Uma total de 230 amostras (controles negativos qPCR pós-pandemia, n=21; amostras de indivíduos positivos por qPCR n=166; e suspeitos, n=43) foram caracterizadas pelo kit TR DPP COVID-19 IgM/IgG Bio-Manguinhos (gentilmente doados pelos pesquisadores do Laboratório de Tecnologia Diagnóstica, Dr. Edmilson da Silva e Dr. Antônio Ferreira). O produto DPP possui um dispositivo que permite realizar uma leitura eletrônica do resultado (variando de 0-300, sendo um resultado não reagente quando < 24 e reagente em casos de ≥ 25).

Tabelas com os soros utilizados neste estudo se encontram no Apêndice (H-K).

3.5 ELISA

Proteínas recombinantes do SARS-CoV-2 foram testadas quanto ao seu potencial antigênico em ELISA. As formulações das soluções utilizadas estão descritas no Apêndice C. Placas de poliestireno (Costar, EUA) foram sensibilizadas *overnight* a 4°C com o antígeno diluído em tampão carbonato (pH 9,6). A solução foi descartada e os poços foram bloqueados (350 µL por 2 h). A solução de bloqueio foi descartada e as placas foram secas por 4 horas, à temperatura ambiente e então armazenadas em bolsas herméticas com dessecante. Para cada ensaio, 100µl de soro diluído (1:100 em diluente de amostra, formulação CT-Vacinas, disponível no

apêndice C) foram adicionados à placa e incubados a 37 °C por 30 minutos. Após as lavagens (350 µl/poço, cinco lavagens), adicionou-se 100µl do anticorpo secundário (anti-human IgG, Fapon, BEEIGGI201, ou anti-human IgM, Sigma, A0420, ambos conjugados à enzima peroxidase) diluído em diluente (Moss, Ref. HRPD1000, 1:5.000 para IgG, e diluente de amostra CT-Vacinas, 1:40.000 para IgM), sendo incubado a 37°C por 30 minutos. As placas foram lavadas novamente e incubadas com 100µl de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) por poço, ao abrigo de luz (TMBUS, Moss por 15 minutos ou Scienco 30 minutos). A reação foi interrompida com 100 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 0,5 M) e a absorbância medida em espectrofotômetro Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific) em um comprimento de onda igual a 450 nm. A concentração ideal do antígeno recombinante e da diluição de soros a ser empregada em cada teste foram determinados com base em uma distinção clara entre amostras positivas e negativas.

O cálculo do *cut-off* em ensaios com amostras individuais, foi avaliado de acordo com as equações:

$$cut - off = M_{neg} + 2xDP_{neg} \text{Equação 1}$$

$$cut - off = M_{neg} + 3xDP_{neg} \text{Equação 2}$$

A partir do *cut-off* determinou-se um índice de classificação dos resultados (*I*), baseando-se na absorbância de cada amostra Abs_{450nm} , dividida pelo valor do *cut-off* de acordo com a Equação 3:

$$I = \frac{Abs_{450nm}}{cut-off} \text{Equação 3}$$

Os resultados foram classificados como:

$I < 0.8$: amostra não reagente (negativa)

$0.8 \leq I < 1.1$: amostra indeterminada

$I \geq 1.1$: amostra reagente (positiva)

3.5.1 Validação para obtenção de protótipo adequado à comercialização⁹

3.5.1.1 Validação interna inicial do ELISA COVID-19 IgG

Amostras de antes da pandemia (n=88) foram utilizadas para o cálculo de um *cut-off* (Apêndice I) com base nas Equações 1 e 2. Para avaliar a capacidade de detecção de anticorpos em soros individuais foram testadas 53 amostras negativas (de antes de 2020) e 36 amostras positivas (PCR+ para *swab* nasal).

3.5.1.2 Padronização dos controles do ELISA COVID-19 IgG

Os controles foram trabalhados a partir de uma amostra humana positiva (SPF06, *pool* das coletas A-F), inativada (56°C, 30 min) e diluída em estabilizante. Testou-se diferentes diluições dessa amostra (1:8, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640) em dois diluentes de anticorpos comerciais, *HRPD Stabilizing diluent for HRP conjugates* (Ref.: HRPD-1000, Moss, EUA) e *BioStab Antibody Stabilizer* (Ref.: 55514, Sigma, EUA). Essas diluições foram mantidas em duas condições (2-8°C e 37°C) durante 28 dias, sendo feitos testes nos dias 0, 3, 14, 21 e 28, diluindo-se estes controles 1:101 (assim como as demais amostras e seguindo-se o protocolo padrão do ELISA previamente estabelecido- primeiro parágrafo do item 3.5 deste capítulo).

Um controle positivo escolhido foi selecionado dentro do intervalo de valores estabelecido entre os resultados das equações 1 e 2 (validação inicial). Para que o mesmo pudesse atuar como um calibrador do *cut-off* durante os ensaios posteriores, foi estabelecida a equação 4.

$$cut - off = C^+ \times DP_{neg} + M_{neg} \text{ Equação 4}$$

⁹Estes experimentos tratam-se do desenvolvimento de um EIE indireto para detecção de IgG anti-SARS-CoV-2 utilizando a proteína N produzida no CT-Vacinas.

3.5.1.3 Precisão

A repetitividade do ELISA COVID-19 IgG foi avaliada mantendo-se o máximo de fatores constantes (laboratório, técnico, instrumento, lote dos reagentes) num mesmo dia e num único ensaio, com três amostras diferentes (sendo 08 repetições cada). Para precisão intermediária, essas mesmas amostras foram avaliadas, da mesma forma, em três dias diferentes.

Como medidas de imprecisão, foi calculado o Desvio Padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV%) para cada condição (repetitividade e precisão intermediária) (ANDREASSON *et al.*, 2015), sendo desejável um CV <20% (FDA, 2018b).

Além disso, foi feito um estudo para avaliar a precisão entre lotes. Três lotes diferentes do produto foram preparados em dias diferentes e testados simultaneamente, avaliando-se oito amostras (quatro positivas e quatro negativas). Os resultados foram comparados pelo teste Kruskal-Wallis, com $p > 0.05$ considerado não significativo (KRUSKAL *et al.*, 2012).

3.5.1.4 Especificidade analítica / Interferentes

Para estas medidas foi feita uma validação interna com 40 amostras, caracterizadas como descrito abaixo.

- Amostras negativas para SARS-CoV-2 por qPCR de indivíduos vacinados contra a Gripe em 2020 (n=8).
- Amostras positivas para Febre Chikungunya (soros coletados em 2018/2019) (n=8).
- Amostras positivas para Dengue (soros coletados em 2018/2019) (n=8).
- Amostras positivas para Febre Zika (soros coletados em 2018/2019) (n=8).
- Amostras com níveis aumentados de fator reumatoide (soros coletados em 2018). (n=8).

Uma validação externa utilizando outros vírus de trato respiratório, detalhada no item 3.5.1.6, permitiu uma complementação deste ensaio. A reatividade cruzada e os interferentes foram avaliadas pelo índice (I) das amostras.

3.5.1.5 Estabilidade

Um ensaio de estabilidade acelerada foi realizado a 37°C para avaliar a degradação química e/ou física dos reagentes que compõem o kit. As placas sensibilizadas e demais reagentes foram mantidos a 37°C por 21 dias (equivalente a 2,3 anos entre 2-8°C) (MATEJTSCHUK AND PHILLIPS, 2007). Os ensaios foram realizados conforme padronizado previamente em três momentos (dias: 0, 7 e 21) e o índice (I) foi avaliado.

Além disso, um teste de estabilidade em tempo real, após aberto, foi realizado usando um lote previamente preparado e testado no dia 0 e três meses após seu armazenamento entre 2-8°C.

O produto foi considerado estável até o momento em que a recuperação média compreendeu o intervalo entre 80-120%, o que significa uma taxa de variação de $\pm 20\%$ comparado a referência inicial (Dia 0) (FDA, 2018b).

3.5.1.6 Validação externa e análises de interferentes

Placas sensibilizadas e demais reagentes foram preparados e enviados a três laboratórios de referência para validação externa.

- i. No Laboratório de Vírus respiratórios e Sarampo (responsável: Dra. Marilda Siqueira, Fiocruz RJ) foram testadas as seguintes amostras:
 - SARS-CoV-2 qPCR positivas (n=28) amostras de 2020;
 - SARS-CoV-2 qPCR negativas (n=30) amostras de 2020;
 - Influenza IgG positivas (n=19) amostras de 2018;
 - Sarampo IgG positivas (n=15) amostras de 2019.

- ii. No Laboratório de Virologia Clínica e Molecular (responsável Dr. Edison Durigon - USP) foram testadas as seguintes amostras:
 - SARS-CoV-2 qPCR positivas (n=52) amostras de 2020;
 - Zika qPCR positivas (n=6) amostras de 2014-2018;
 - Sarampo qPCR positivas (n=10) amostras de 2019;
 - Parvovírus qPCR positivas (n=6) amostras de 2014-2019;

- Febre Amarela IgG qPCR positivas (n=13) amostras de 2019.

iii. No Laboratório de Tecnologia Diagnóstica - LATED (responsável: Dr. Antônio Ferreira, Fiocruz-RJ) foram testadas:

-SARS-CoV-2 positivas (RT-PCR/Sintomas/DPP): (n=128) amostras de 2020;

- SARS-CoV-2 negativas (n=48): amostras de antes de 2020.

Os dados brutos compartilhados pelo Dr. Edison Durigon (USP) e Dra. Marilda Siqueira (Fiocruz RJ) foram analisados na sessão resultados. O LATED retornou sua avaliação em forma de relatório elaborado pelo Dr. Edimilson da Silva (ANEXO D).

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DE SIMILARIDADE ENTRE AS PROTEÍNAS SELECIONADAS PARA O DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2 E AS PROTEÍNAS DE OUTROS CORONAVÍRUS

Análises pelo programa BlastP retornaram porcentagens de homologia entre as sequências de aminoácidos das proteínas selecionadas neste estudo e as proteínas equivalentes à de outros coronavírus humanos circulantes no país (HKU1, HCoV-E229, HCoV-NL63, HCoV-OC43). Dentre todas as análises, o percentual de identidade entre as sequências SARS-CoV-2 e as dos outros coronavírus foi de até 31,0% para a proteína S1 e 48,3% para a proteína N (Tabela 9).

Tabela 9. Homologia entre as sequências das proteínas selecionadas neste estudo *versus* outros coronavírus humanos circulantes no país.

SARS-CoV-2	HKU1	HCoV-E229	HCoV-NL63	HCoV-OC43
N	36,7%	28,8%	48,3%	38,4%
S1	30,1%	28,2%	29,2%	31,0%

4.2 PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS DE SARS-CoV-2 EM BL21(DE3)

Os plasmídeos sintéticos (obtidos comercialmente) contendo as sequências codificadoras de S1 e N foram utilizados para transformar bactérias BL21(DE3), sendo avaliada a expressão e solubilidade das proteínas de interesse. Os testes de solubilidade revelaram que S1 é bastante insolúvel sendo necessária a adição de 8 M de ureia para sua obtenção (Figura 41 A e B) ao passo que a proteína N apresentou boa expressão e solubilidade na fração solúvel (Figura 42 A). Tais proteínas foram purificadas (Figura 41 C e Figura 42B/C) e quantificadas, com rendimento aproximado de 25 mg/L de cultura no caso da proteína S1 e 63 mg/L no caso da proteína N. Por ser uma proteína solúvel, após a reunião das frações, o antígeno N purificado foi diluído em tampão contendo 10% de glicerol, a fim de manter sua estabilidade (Figura 42 C).

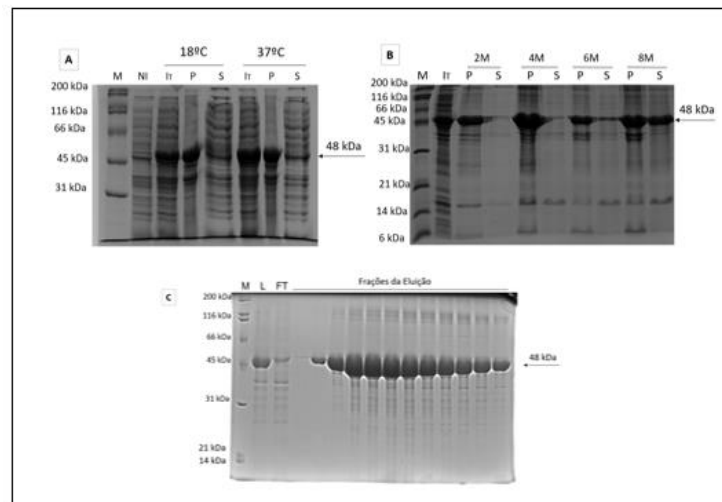


Figura 41- Expressão e purificação da proteína SARS-CoV-2-S1 em BL21(DE3). **A:** Teste de solubilidade da proteína S1 em 18°C e 37°C. NI: não induzido, I_T: Fração induzida total, e frações após a lise P: sedimento (*pellet*, fração insolúvel), S: sobrenadante (fração solúvel). **B:** Teste de solubilidade em diferentes concentrações de ureia (2, 4, 6 e 8M) realizado a 37°C. **C:** Purificação por afinidade. M: marcador de peso molecular, L= extrato celular após lise (pré-coluna), FT= eluato (*flow-through*).

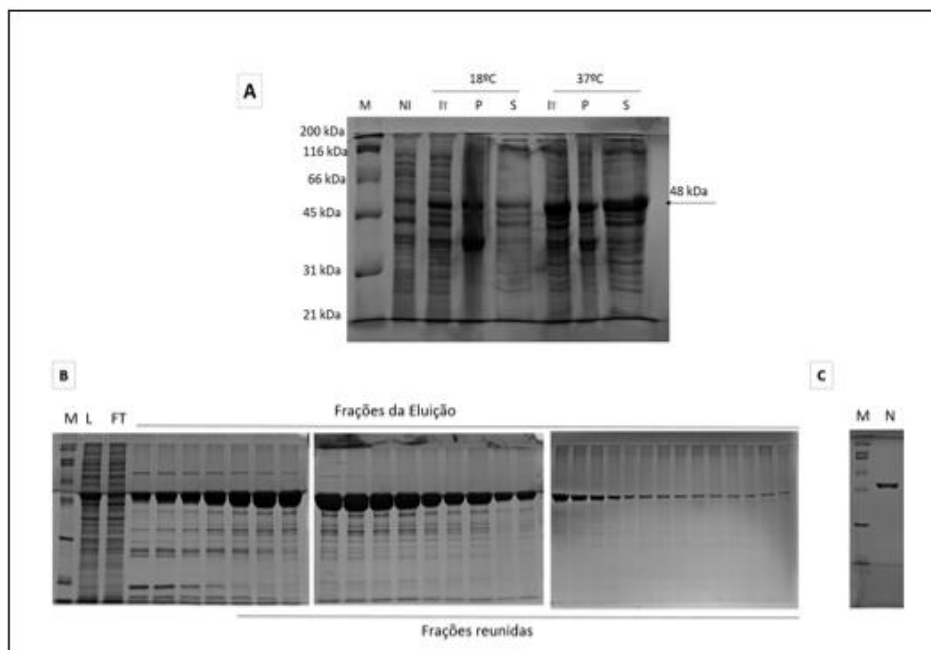


Figura 42- Expressão e purificação da proteína SARS-CoV-2-N em BL21(DE3). **A:** Teste de solubilidade da proteína N em 18°C e 37 °C. NI: não induzido, I_T: Fração induzida total, e frações após a lise P: sedimento (*pellet*, fração insolúvel), S: sobrenadante (fração solúvel). **B** Purificação por afinidade. M: marcador de peso molecular, L: extrato celular após lise (pré-coluna), FT= eluato (*flow-through*). **C:** Frações reunidas após diluição em tampão de armazenamento.

Com as frações purificadas das proteínas S1 e N foi feito um *Western blot* utilizando anticorpo anti-his (Figura 43). Neste ensaio foi possível confirmar a obtenção das proteínas de interesse, obtendo-se um fragmento de S1 e N próximos a 48 kDa, condizentes com o peso molecular teórico (47,9 e 48,4 kDa, respectivamente).

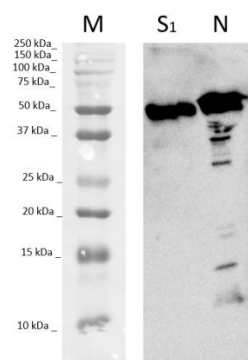


Figura 43- Western blot das proteínas de SARS-CoV 2 purificadas. Experimento feito com proteínas S1 e N e incubação com anticorpo anti-histidina.

4.3 AVALIAÇÃO INICIAL DO POTENCIAL ANTIGÊNICO DAS PROTEÍNAS PRODUZIDAS

As proteínas recombinantes S₁ e N foram tituladas em ensaio de ELISA variando-se a concentração de 25 a 1600 ng/poço, incubando-se com *pool* de soros seguido da adição de conjugados anti-IgG e anti-IgM. A razão entre a absorbância do *pool* de soros positivos e a absorbância do *pool* de soros negativos para cada condição foi calculada a fim de se avaliar o potencial antigênico das proteínas produzidas. Para S₁, não foi observada boa capacidade de diferenciação do *pool* positivo para o negativo (Figura 44. A e B). Em contrapartida, as absorbâncias do *pool* positivo foram superiores as do *pool* negativo para todas as condições testadas utilizando a proteína N (Figura 44 C e D).

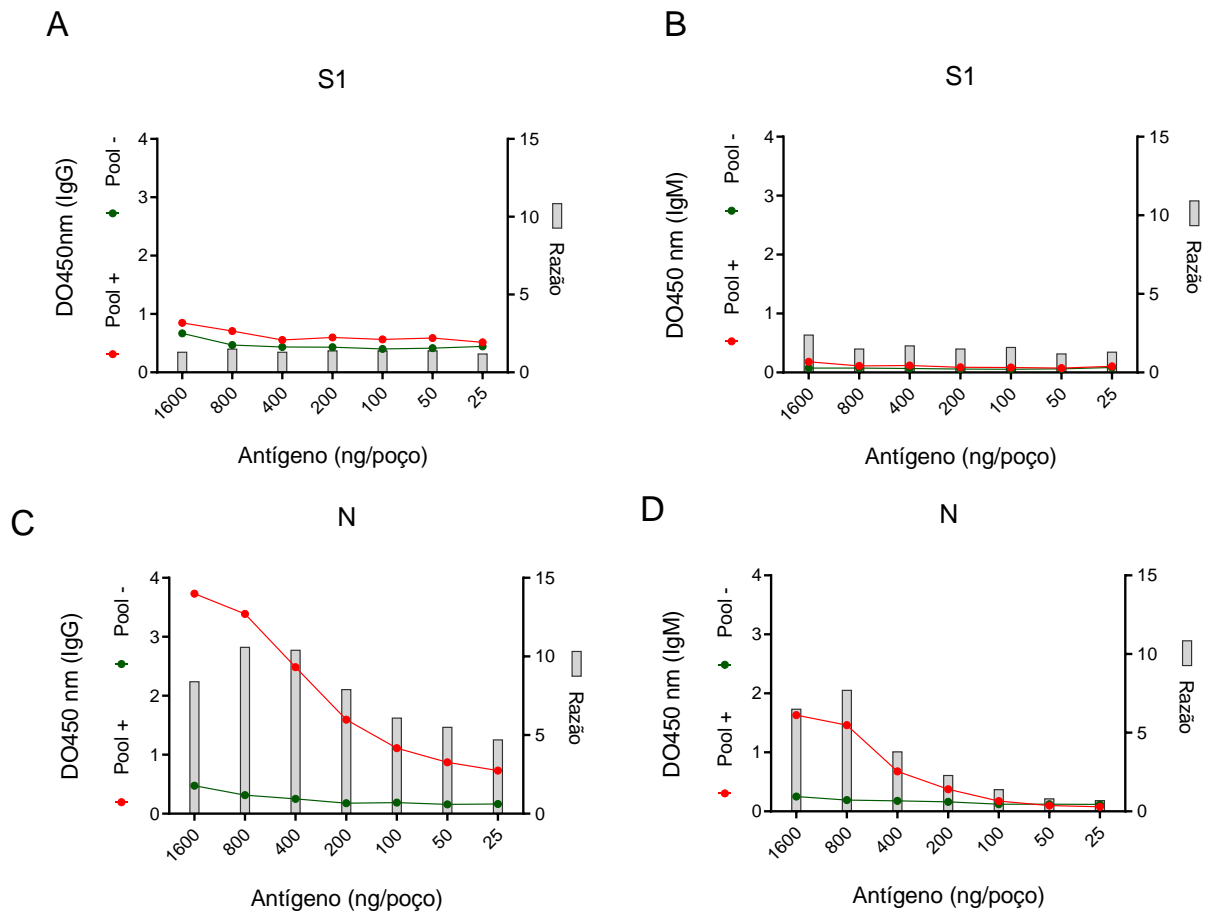


Figura 44- Avaliação do potencial antigênico de proteínas recombinantes produzidas. [A]: antígeno S1, detecção de IgG; [B]: antígeno S1, detecção de IgM; [C]: antígeno N, detecção de IgG; [D]: antígeno N, detecção de IgM. Em vermelho é representada a absorbância do *pool* positivo e em verde a absorbância do *pool* negativo (eixo Y à esquerda). A razão calculada para cada condição é expressa como barras cinzas (eixo Y à direita).

A concentração ideal do antígeno N para ensaios do tipo IgG foi estabelecida como 400ng/poço, pois apresentou razão de 10,4 sem grande ganho de distinção na próxima condição mais alta testada (800 ng/poço, razão 10,6). No caso de IgM, foi considerada uma nova titulação abrindo-se o intervalo entre 200-800 ng/poço, sendo determinado o valor de 600 ng/poço (Razão 4,9, dados não mostrados na figura).

4.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIGÊNICO DE PROTEÍNAS PRODUZIDAS EM SISTEMA EUCARIOTO DERIVADAS DA SPIKE DO SARS-CoV-2

Uma vez que a proteína S1, produzida em *E. coli* não apresentou potencial antigênico como ferramenta diagnóstica em plataforma ELISA, foi trabalhado o

potencial de duas proteínas derivadas da *Spike* produzidas em sistema eucarioto: S inteira, denominada S e S1 comercial, denominada S1(F). Como demonstrado no item 4.3 para as proteínas produzidas no CT-Vacinas, esses antígenos foram inicialmente titulados utilizando *pool* de soros e o potencial dos mesmos foi avaliado com base da razão obtida entre a absorbância do *pool* positivo e do *pool* negativo (Figura 45).

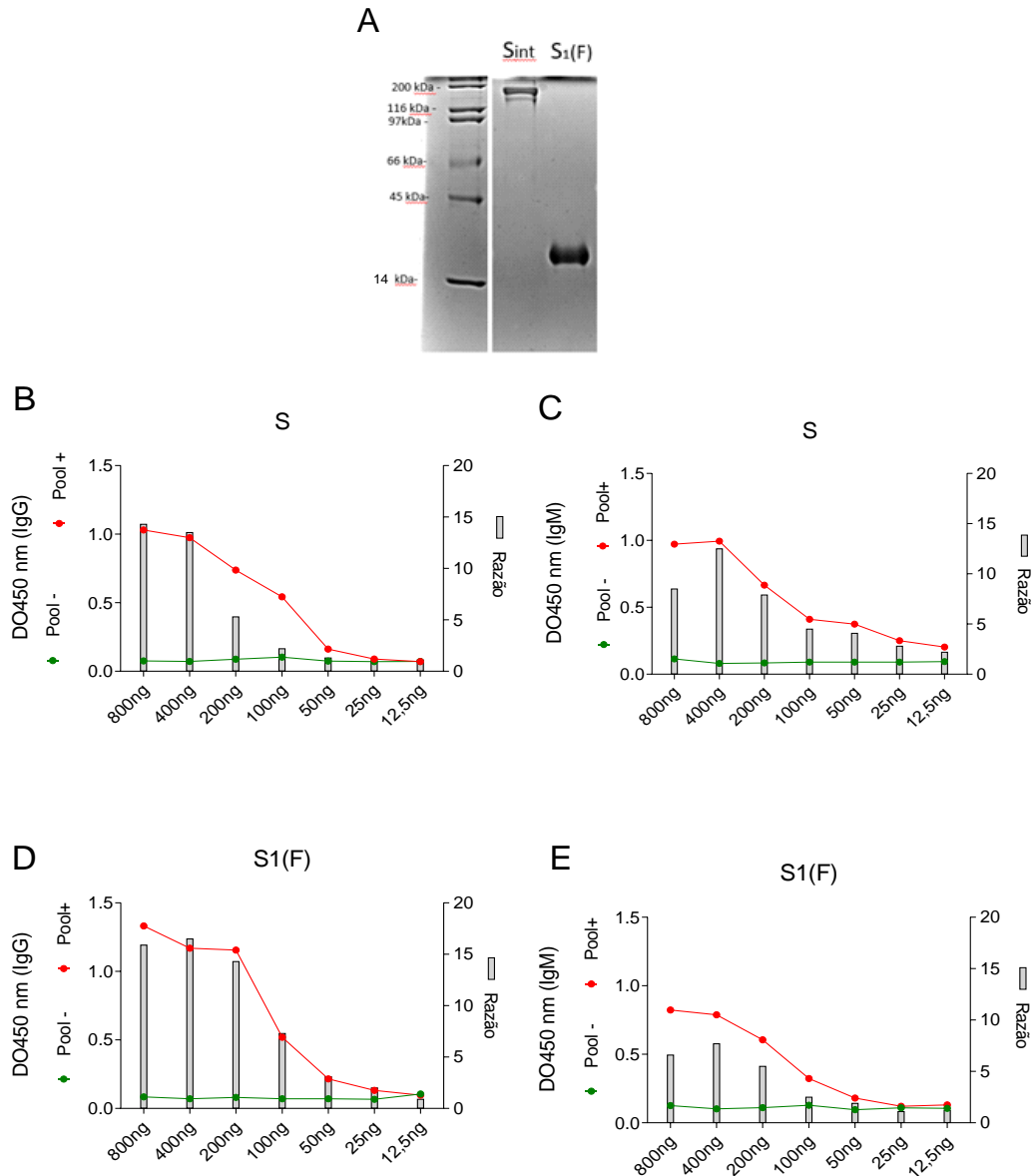


Figura 45- Avaliação do potencial antigênico de proteínas recombinantes baseadas na Spike do SARS-CoV-2 produzidas em sistema eucarioto. [A]: Gel das proteínas adquiridas para confirmação da integridade Sint= proteína S inteira, produção UFRJ, S1(F): S1 antígeno comercial (Fapon). [B] antígeno S, detecção de IgG; [C]: antígeno S, detecção de IgM; [D]:antígeno S1(F), detecção de IgG; [E]: antígeno S1(F), detecção de IgM. Em vermelho é representada a absorbância do *pool* positivo e em verde a absorbância do *pool* negativo (eixo Y à esquerda). A razão calculada para cada condição é expressa como barras cinzas (eixo Y à direita).

Ambas as proteínas apresentaram potencial de diferenciação entre os *pool/s* positivos e negativos. Com base na razão, foi definido o uso de 400 ng/poço tanto para detecção de IgG quanto para IgM (S: Razão 13,5 IgG, 12,5 IgM; S1(F): Razão 16,5 IgG, 7,7 IgM).

4.4.1 Avaliação da soroconversão em indivíduos com COVID 19 pelo DPP e ELISA com a proteína N

Quarenta e três indivíduos que testaram positivo pela pesquisa de RNA viral (qRT-PCR de *swab* nasal) foram acompanhados e avaliados por sorologia pelo teste rápido DPP e pelo ELISA COVID-19 IgG utilizando a proteína N. Dentre eles, foi possível acompanhar a soroconversão de vinte e três pacientes que eram inicialmente negativos para ambos os testes sorológicos. Três padrões distintos de soroconversão foram observados: soroconversão de IgM anterior à de IgG ($n = 4$, 17%), soroconversão de IgG anterior à de IgM ($n = 9$, 39%), soroconversão síncrona de IgM e IgG ($n = 10$, 43%). Dentre todos os indivíduos testados, 36% ($n=15$) não apresentaram sorologia positiva para IgM pelo DPP no período investigado. O tempo médio de soroconversão para IgG após a confirmação por qRT-PCR foi de 10,9 dias ($\pm 0,5$) para o ELISA e 11,8 ($\pm 0,6$) para o DPP (Figura 46).

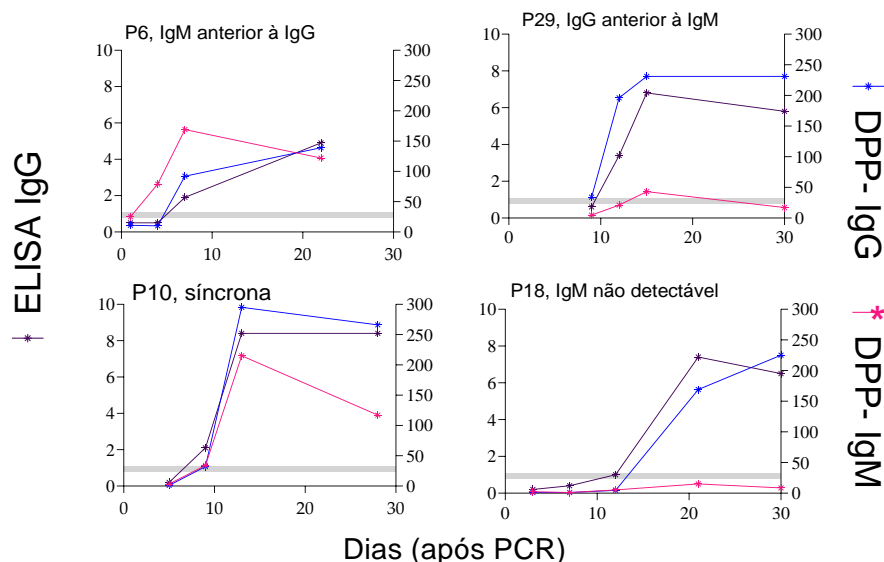


Figura 46- Soroconversão em pacientes com COVID-19. Exemplos representativos (pacientes individuais) dos tipos de soroconversão observados: (P6) IgM anterior à IgG, (P29) IgG anterior a de IgM, (P10) soroconversão síncrona de IgG e IgM e (P18) não-deteção de IgM pelo teste rápido DPP. Azul: ELISA IgG, rosa: DPP-IgM, roxo: DPP-IgG.

4.5 COMPARATIVO ENTRE AS PROTEÍNAS N E S

4.5.1 Experimentos comparando N e S1(F)¹⁰

4.5.1.1 Avaliação da resposta anti-N e anti-S1 em amostras individuais

Uma análise permitiu comparar amostras individuais testadas simultaneamente para as proteínas N e S1(F).O protocolo do teste foi o mesmo descrito no item 3.5.

Amostras de 40 indivíduos saudáveis (qPCR negativo, doadores saudáveis) foram utilizadas para o cálculo do *cut-off* do teste) e 40 amostras de pacientes individuais, confirmados anteriormente por qPCR (média de $12,4 \pm 2,0$ dias após o exame molecular), foram testadas sob as seguintes condições:

a. Condições para detecção de IgG:

- Placa sensibilizada com o antígeno N (400 ng/poço, produzido no CT-Vacinas)*cut-off* obtido: 0,389
- Placa sensibilizada com o antígeno S1(F) (400 ng/poço, antígeno comercial, Fapon, Ref.:FPZ0537)*cut-off* obtido: 0,423

b. Condições para detecção de IgM:

- Placa sensibilizada com o antígeno N (600 ng/poço, produzido no CT-Vacinas) *cut-off* obtido: 0,438
- Placa sensibilizada com o antígeno S1(F) (400 ng/poço, antígeno comercial, Fapon, Ref.:FPZ0537)*cut-off* obtido: 0,336

A Figura 47 permite a comparação da detecção de anticorpos do tipo IgM e IgG, pelas proteínas N e S1(F) em cada paciente, em função do tempo após a confirmação por qPCR. Considerando as amostras com até 7 dias após a confirmação molecular, 100 % (n=8) dos pacientes responderam melhor para N. Entre 8-15 dias (n=18), 12 pacientes responderam melhor para N, três melhor para S1(F) e três pareceram responder igualmente para as duas. Acima de 15 dias, cinco responderam melhor para N, três melhor para S1(F) e três responderam igualmente para as duas. Já no caso de IgM, a proteína S1(F) apresentou índices iguais ou maiores que N para todos os pacientes.

¹⁰ No momento que este estudo foi realizado, a proteína S (inteira) não estava disponível.

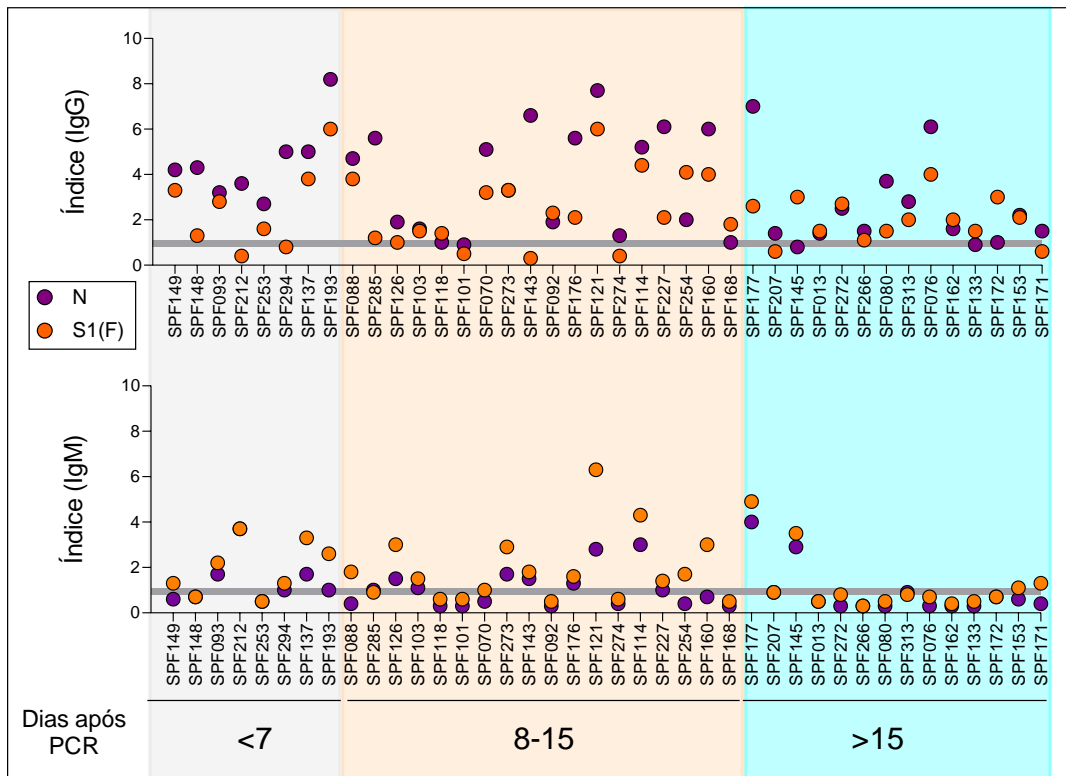


Figura 47- Comparação dos índices de detecção entre a proteína N(roxo) de produção interna (CT-Vacinas) e S1(F) (laranja, comercial). Experimento feito com 40 amostras de indivíduos distintos (eixo X) para detecção de IgG (superior) e IgM (inferior). Tempo após PCR separados por área: cinza (menos que 7 dias), laranja (8-15 dias) e azul (mais que 15 dias). Linha cinza representa zona de indeterminação (<0,8: não reagente, 0,8-1,1: indeterminado, $\geq 1,1$ reagente).

4.5.1.2 Acompanhamento da soroconversão e da longevidade de anticorpos do tipo IgG utilizando as proteínas N e S1(F)

Com intuito de analisar os níveis de anticorpos do tipo IgG ao longo do tempo e ou/capacidade de detecção da proteína N em relação a *spike*, doze pacientes do estudo de soroconversão (com quatro ou mais coletas até o momento da realização deste experimento) tiveram suas amostras (n=63 amostras no total) testadas simultaneamente, sob as duas condições descritas no item anterior, para IgG.

Dentre os pacientes analisados neste experimento, três deles apresentaram soroconversão ($I \geq 1,1$) para N primeiro (P5, P18 E P29) enquanto três apresentaram soroconversão para S1 primeiro (P13, P32 E P41). O Paciente P29, apresentou um nível consideravelmente maior de anticorpos contra a proteína N em relação a S1(F). Isso também foi observado para os pacientes P22, P18, P10 e P7, ainda que a cinética

das duas proteínas tenha sido parecida. Em contrapartida, os pacientes P26, P32 e P41 responderam significativamente melhor contra o antígeno S1 (Figura 48).

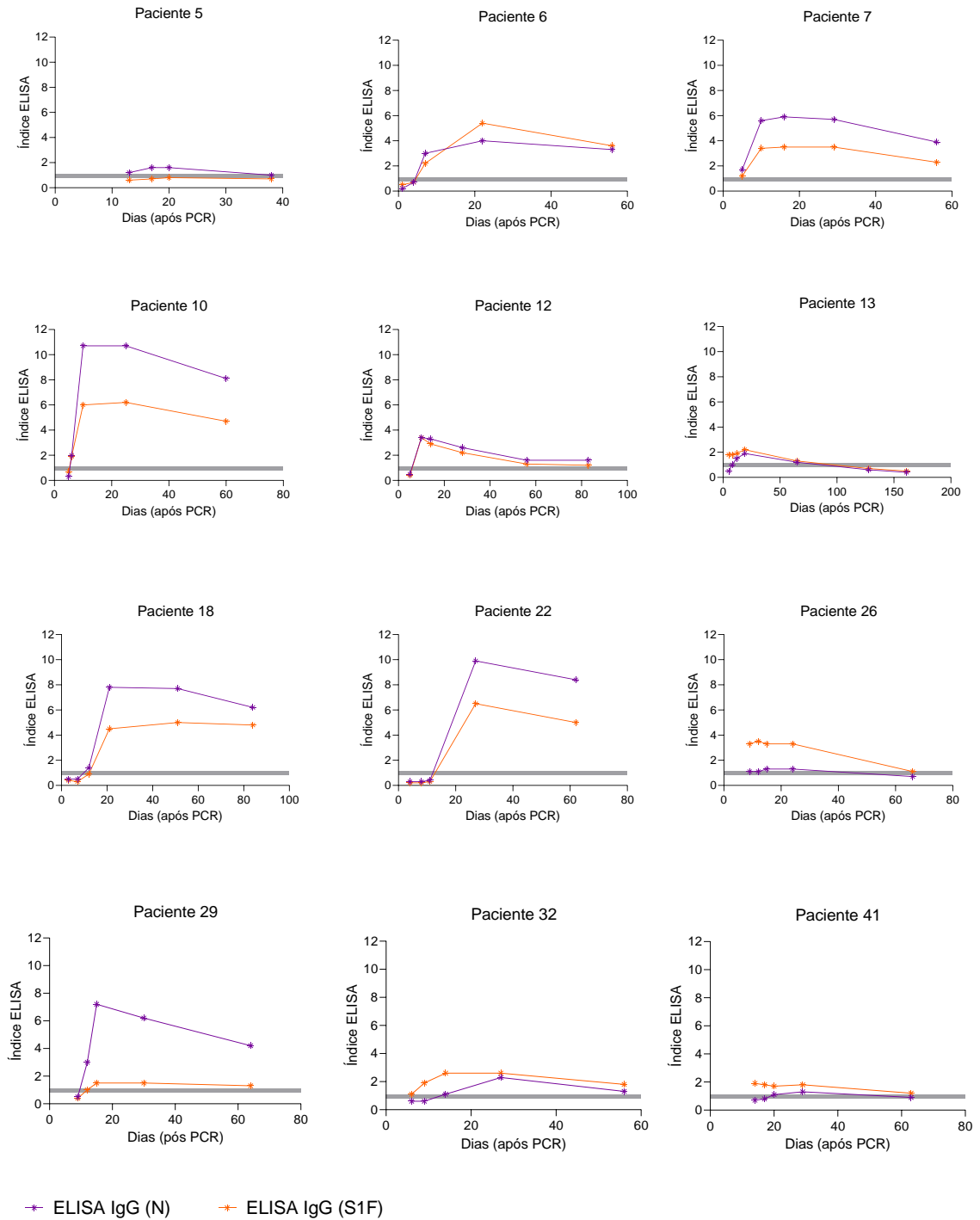


Figura 48- Comparação da detecção de anticorpos do tipo IgG entre as proteínas N (CT-Vacinas) em relação a S1 (comercial). Doze pacientes individuais foram acompanhados por no mínimo 50 dias para avaliação da soroconversão e queda de anticorpos.

Ainda na Figura 48, P13 foi o paciente com o maior tempo após a confirmação molecular e, embora desde a primeira coleta já tenha sido reagente para S1(F) a queda do índice foi muito similar ao do ELISA com a proteína N, em que foi possível acompanhar toda a soroconversão e queda durante o período de análise.

4.5.2 Avaliação da resposta humoral contra as proteínas N, S e S1(F) em amostras de pacientes individuais confirmados para COVID-19

O próximo passo deste estudo foi avaliar a resposta humoral contra as proteínas N, S e S1(F) em um número maior de amostras de pacientes individuais. Um questionamento deste estudo foi se um ELISA feito a partir da associação das duas proteínas (N+S ou N+S1) poderia melhorar a sensibilidade do teste quando comparada às capacidades de detecção individuais (somente N ou somente S ou somente S1). Para responder esta questão, foram testadas as proteínas N, S1(F) e S individualmente e associadas, utilizando o protocolo descrito no item 3.5, de acordo com as seguintes condições:

Condições para detecção de IgG:

- Placa sensibilizada como antígeno N (400 ng/poço, produção CT-Vacinas)
- Placa sensibilizada com o antígeno S1(F) (400 ng/poço, Fapon).
- Placa sensibilizada como antígeno S (400 ng/poço, produção UFRJ).
- Placa sensibilizada como antígeno N (300 ng/poço)+ S1(F) (100ng/poço)¹¹
- Placa sensibilizada como antígeno N (300 ng/poço)+ S (100ng/poço)

Condições para detecção de IgM:

- Placa sensibilizada como antígeno N (600 ng/poço, produção CT-Vacinas)
- Placa sensibilizada como antígeno S1(F) (400 ng/poço, Fapon).
- Placa sensibilizada como antígeno S (400 ng/poço, produção UFRJ).
- Placa sensibilizada como antígeno N (300 ng/poço)+ S1(F) (100ng/poço)
- Placa sensibilizada como antígeno N (300 ng/poço)+ S (100ng/poço)

¹¹ A padronização dessa associação de proteínas foi feita de forma semelhante ao descrito nos itens 4.3 e 4.4. A quantidade de cada antígeno foi baseada na melhor razão entre amostras positivas e negativas utilizando o mínimo de proteína S ou S1 (adquiridas externamente). Dados não mostrados.

Foram testadas 96 amostras sob as cinco condições, para IgG e para IgM. Amostras de 40 indivíduos saudáveis (PCR negativos e assintomáticos) foram utilizadas para o cálculo do *cut-off* do teste e 56 amostras de pacientes individuais, confirmados anteriormente por um ou mais métodos comparativos, qPCR (n=40, com confirmação por qPCR, média de $12,4 \pm 2,0$ dias após a confirmação) e/ou DPP (n=16, que não realizaram a PCR, mas tiveram contato com pessoas confirmadas e tiveram sorologia positiva no DPP) foram consideradas positivas. Os dados individuais se encontram no Apêndice H.

Para cada amostra positiva, foi feita uma análise de correlação entre os índices de IgM e IgG, sob as cinco condições testadas (Figura 49).

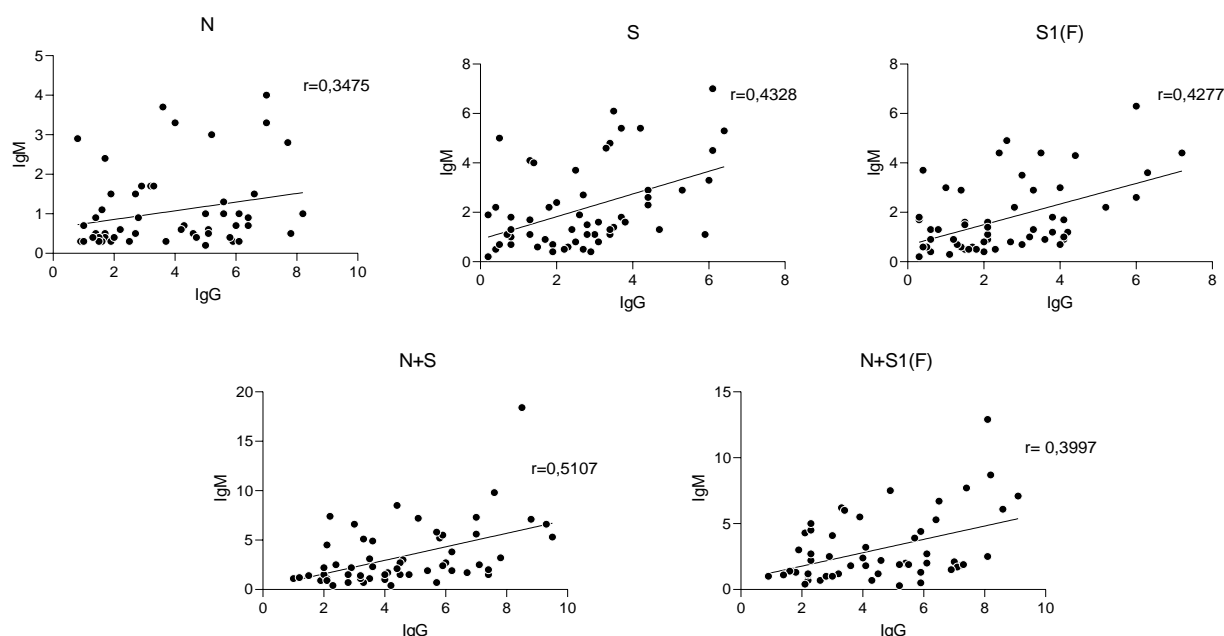


Figura 49- Avaliação da correlação entre os índices obtidos para anticorpos do tipo IgM e IgG por ELISA em amostras individuais utilizando as proteínas N, S, S1(F), N+S e N+S1(F). Um total de 56 pacientes positivos para SARS-CoV-2 (qPCR e/ou DPP) foram testados em ELISA para detecção de IgM e IgG anti-SARS-CoV-2, sob as cinco condições mencionadas. O coeficiente de correlação (r) foi gerado pelo programa GraphPadPrism em cada caso. Os valores de índice para cada amostra estão disponíveis no apêndice H.

Para todas as condições testadas o coeficiente de correlação de Pearson (r) foi positivo. Dentre elas, a melhor correlação obtida entre os índices de IgM e IgG foi a partir da associação das proteínas N+S ($r=0,5107$), seguida das proteínas S e S1(F)

individuais ($r=0,4338$ e $0,4277$), associação N+S1($0,3997$) e por fim apenas N ($r=0,3475$).

4.5.2.1 Análise de desempenho das proteínas, N, S, S1(F) isoladas e associadas em plataforma ELISA

Uma avaliação do desempenho das proteínas N, S, S1(F), N+S e N+S1(F) em ELISA como descrito no item 4.5 e suas respectivas curvas ROC estão representados na Figura 50.

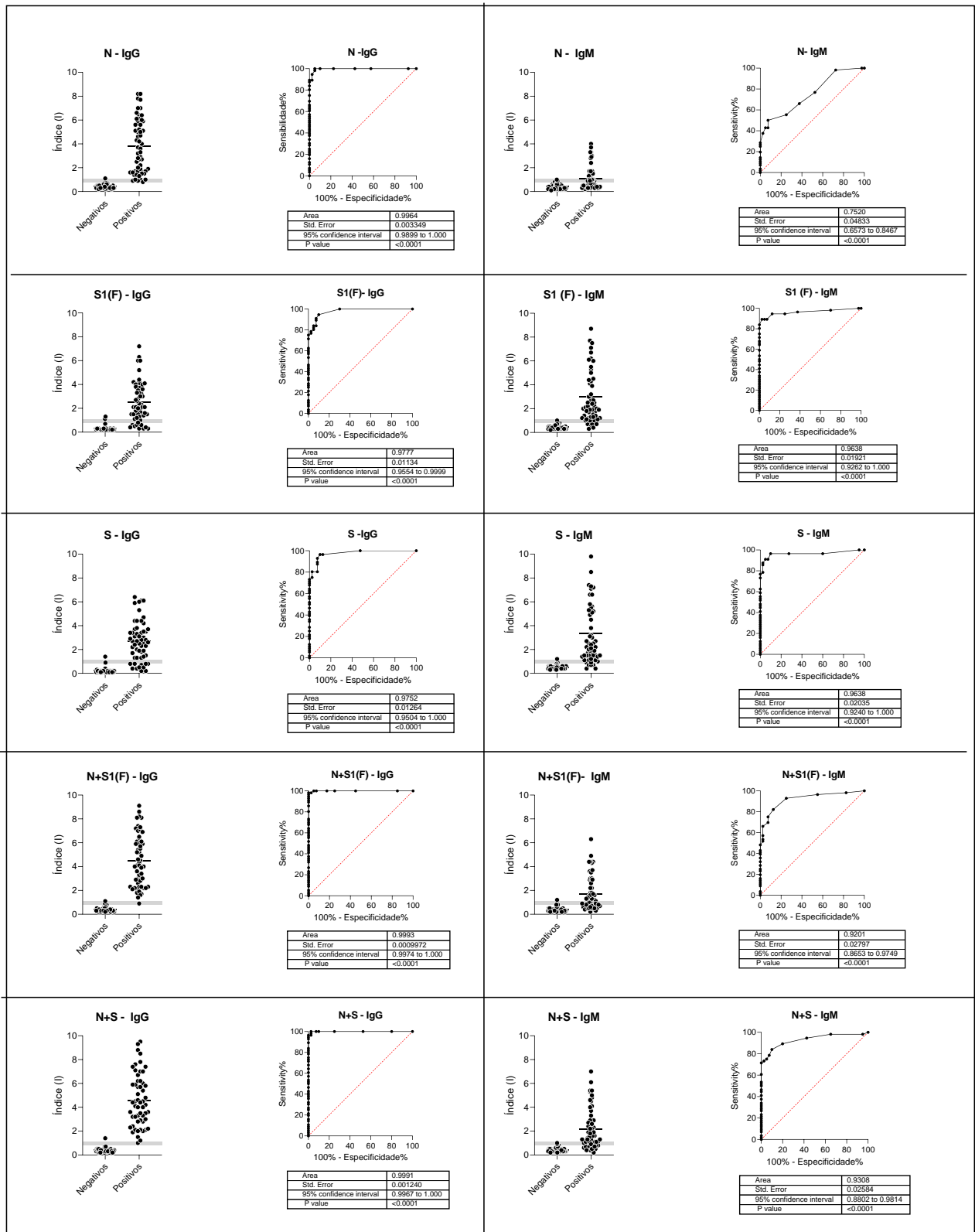


Figura 50- ELISAs utilizando as proteínas N, S1(F),S, N+S1(F) e N+S. Os gráficos de dispersão são seguidos de suas respectivas curvas ROC.

Para cada condição foram analisados os parâmetros de especificidade, sensibilidade e taxa de positividade com relação a qPCR. Os dois primeiros parâmetros desconsideram as amostras indeterminadas (contabilizando apenas amostras reagentes ou não-reagentes), enquanto o último considera amostras indeterminadas como negativas, uma vez que contabiliza todas as amostras testadas. Para IgG, a proteína N apresentou a maior taxa de positividade dentre os antígenos testados individualmente, mas a associação da mesma tanto com S1(F) como com S fez com que essa proporção aumentasse de 89 para 98%. Entretanto, ao analisar a sensibilidade do teste a diferença é de 2% de acréscimo (98-100%) (Tabela 10).

Tabela 10: Avaliação das proteínas N, S1(F) e S individuais e associadas em plataforma ELISA para detecção de IgG

	RESULTADO	CONDIÇÃO				
		N	S1(F)	S	N+S1(F)	N+S
Indivíduos Negativos (n=40)	Não reagente	38	38	37	37	39
	Indeterminado	1	0	2	2	0
	Reagente	1	2	1	1	1
	ESPECIFICIDADE	97%	95%	95%	97%	98%
	Média (M)	0,168	0,118	0,114	0,146	0,139
	Desvio Padrão (DP)	0,074	0,102	0,129	0,073	0,070
	Cut-off (M+3DP)	0,389	0,423	0,501	0,364	0,350
Indivíduos Positivos (n=56)	Não reagente	1	10	8	0	0
	Indeterminado	5	2	3	1	1
	Reagente	50	44	45	55	55
	POSITIVIDADE*	89%	79%	80%	98%	98%
	SENSIBILIDADE**	98%	81%	85%	100%	100%

* Comparativo com qPCR (Amostras totais).

**Desconsidera resultado indeterminados.

Para IgM, a proteína S apresentou a maior taxa de positividade (68%) dentre os antígenos testados individualmente, e diferentemente do resultado para IgG a proteína N apresentou baixa capacidade de detecção (27% de positividade, 32% de sensibilidade). A associação da proteína N com alguma das *spikes*, aumentou as taxas de positividade e sensibilidade quando comparada ao uso individual dos antígenos (Tabela 11).

Tabela 11: Avaliação das proteínas N, S1(F) e S individuais e associadas em plataforma ELISA para detecção de IgM.

	RESULTADO	CONDIÇÃO				
		N	S1(F)	S	N+S1(F)	N+S
Indivíduos Negativos (n=40)	Não reagente	38	37	37	37	38
	Indeterminado	2	2	3	3	1
	Reagente	0	1	0	0	1
	ESPECIFICIDADE	100%	97%	100%	100%	97%
	Média	0,179	0,134	0,124	0,095	0,078
	DP	0,086	0,067	0,050	0,036	0,024
	<i>Cut-off</i>	0,438	0,336	0,274	0,204	0,151
Indivíduos Positivos	Não reagente	32	17	13	6	5
	Indeterminado	9	10	5	4	5
	Reagente	15	29	38	46	46
	POSITIVIDADE*	27%	52%	68%	82%	82%
	SENSIBILIDADE**	32%	63%	75%	88%	90%

* Comparativo com qPCR (Amostras totais).

**Desconsidera resultado indeterminados.

Os parâmetros encontrados para cada condição foram avaliados pelo teste *Chi-square* (Prism Graphpad). Para IgG, os cinco testes propostos não apresentaram diferença significativa ($p=0,9767$), enquanto para IgM, essa diferença estatística foi significante ($p<0,0001$).

4.6 ESTUDO LONGITUDINAL DA COVID-19

Pacientes do estudo de soroconversão (n=43) foram acompanhados por aproximadamente 80 dias após a confirmação por qPCR. Os mesmos foram testados em ELISA (248 amostras, de seis coletas) sob as seguintes condições¹²:

- IgG: N 400ng/poço
- IgM: N 300ng+100 ng S

¹² Essas foram as condições adotadas pela Fiocruz Biomanguinhos (parceira de transferência de tecnologia do CT-Vacinas) para constituir os kits em desenvolvimento. Para a produção desses kits foram considerados principalmente a acurácia e o custo-benefício de cada teste.

Uma avaliação global da produção de anticorpos foi realizada com base nos índices de IgM e IgG. Uma normalização foi feita em função do pico individual de cada paciente, sendo o maior índice daquele indivíduo o ponto considerado 100% e os demais índices daquele indivíduo determinados em função da porcentagem correspondente ao índice máximo (Figura 51 A).

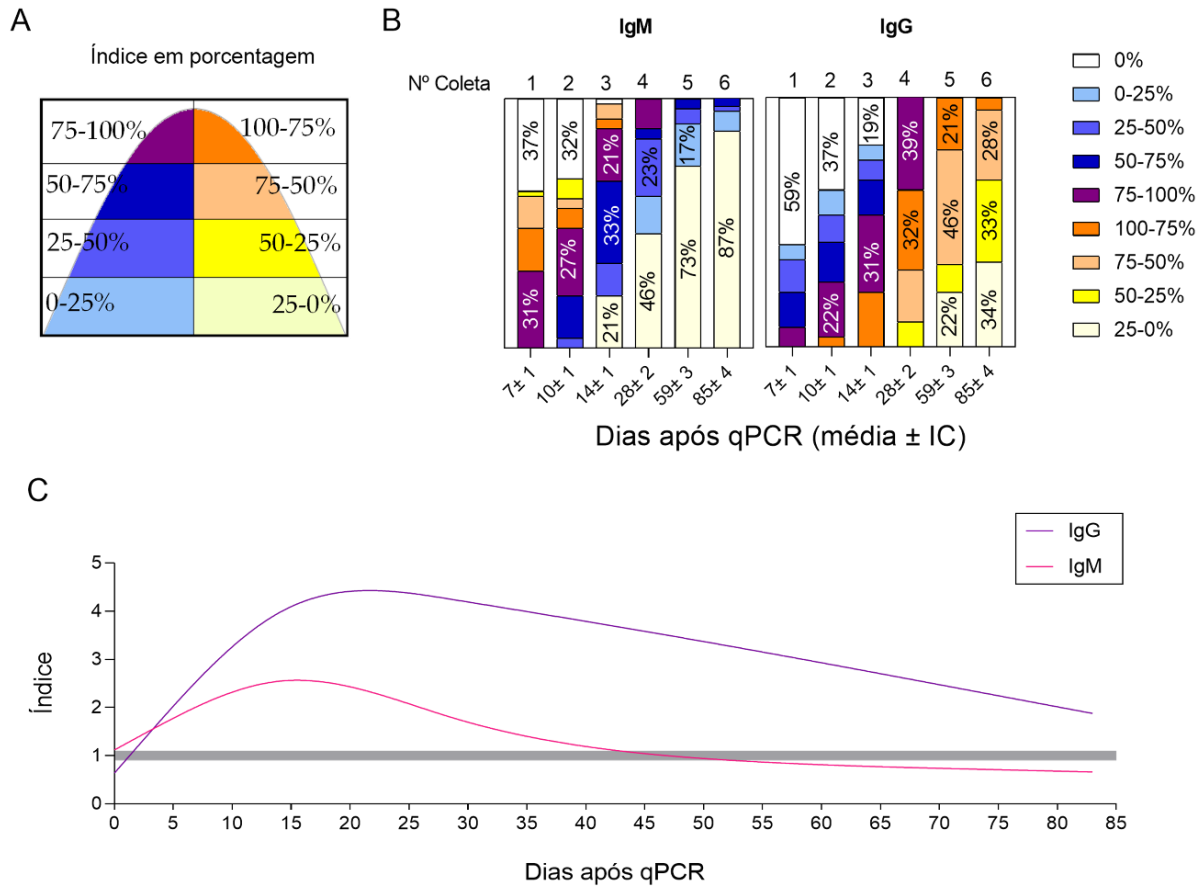


Figura 51-Estudo longitudinal da COVID-19. Pacientes (n=43) confirmados para COVID-19 pela pesquisa do RNA viral de SARS-CoV-2(qPCR) foram acompanhados por sorologia por 85(±4) dias. As análises foram feitas em termos de porcentagem do índice e avaliados por coleta (A e B) e índice bruto em função do tempo (C).A: Esquema representativo das categorias de níveis de anticorpos (crescente: 0-25%, 25-50%, 50-75%, 75-100% e decrescente: 100-75%, 75-50%, 50-25% 25-0 %) determinado para cada paciente. B: Nível de anticorpos considerando a coorte estudada de acordo com o tempo médio das coletas. As porcentagens mais significativas são exibidas dentro das barras sendo baseada no número de pacientes incluídos em cada categoria. C: As curvas de IgM (rosa) e IgG (roxo) foram construídas com base nos resultados individuais (248 amostras) pela opção “Fit spline” do GraphPad Prism que mostra a média dos índices brutos em função do tempo (eixo X).

Dentre todos os pacientes avaliados, os maiores índices para IgM foram identificados nas coletas 1 (média de 7±1dia após PCR) e 2(média de 10±1dia após PCR). Para IgG, os

maiores índices foram identificados nas coletas³ (média de 14±1dia após PCR) e 4 (média de 28±2 dias após a PCR)(Figura 51 B). Ao final do período avaliado (Coleta 6, 85±4dias após PCR) 87% dos pacientes não reagiram mais para IgM e 34% não reagiram mais para IgG. Pela Figura 51C (construída a partir dos dados de índice bruto) é possível perceber que o pico de anticorpos do tipo IgM ficou em torno de 15 dias e do tipo IgG em torno de 20 dias. A partir de 43 dias após a PCR, o índice de IgM atinge a zona cinza (resultados indeterminados) e após 80 dias, a taxa de queda do índice de IgG foi de 57% (índice médio de 1,9) em relação ao pico médio (índice médio de 4,4).

Uma vez que a proteína N, de produção própria do CT-Vacinas, demonstrou grande potencial antigênico em ELISA para detecção de IgG, ela foi selecionada para as etapas seguintes de construção de um kit de diagnóstico sorológico da COVID-19.¹³

4.7 VALIDAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE PROTÓTIPO ADEQUADO À COMERCIALIZAÇÃO

Amostras de antes da pandemia (n=88) foram utilizadas para o cálculo de um *cut-off* com base na média somada de três vezes o desvio padrão das mesmas (APÊNDICE I).

Para avaliar a capacidade de detecção de anticorpos anti-N do tipo IgG em soros individuais foram testadas 53 amostras negativas (de antes de 2020) e 43 amostras positivas de pacientes individuais (histórico de qPCR positivo para *swab* nasal)¹⁴.

Dentre as amostras negativas testadas, 52 apresentaram resultado negativo por ELISA, e uma apresentou resultado indeterminado, o que corresponde a uma especificidade de 100%. Das amostras positivas, 43 apresentaram resultado positivo, 13 apresentaram resultado negativo e uma apresentou resultado indeterminado, o que

¹³Até o momento em que este trabalho foi escrito, não foi produzido no CT vacinas um antígeno derivado da Spike que apresentasse acurácia equivalente às proteínas S e S1(F) quando associadas a N. Em termos de custo-benefício, a utilização do antígeno N é extremamente vantajoso, uma vez que ele foi produzido em um sistema simples e apresentou alto rendimento, podendo ser facilmente empregado em kits de ELISA para atender a demanda nacional.

¹⁴No momento em que este experimento foi realizado, a soroteca ainda estava sendo construída (pré-estudo de soroconversão), havendo apenas a confirmação por PCR e um número reduzido de amostras positivas. Mais tarde, houve a possibilidade de caracterização das amostras positivas pelo DPP. Este experimento foi importante principalmente para o estabelecimento do *cut-off* com um número maior de amostras negativas (n=88).

corresponde a uma sensibilidade de 75%. Considerando apenas amostras PCR+ com sorologia positiva para DPP (n=35) a sensibilidade sobe para 100% (Figura 52).

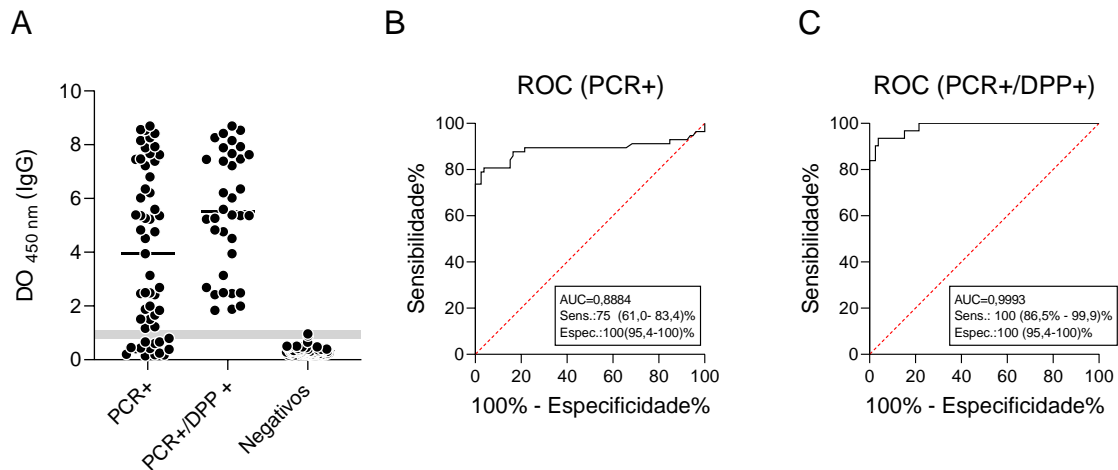


Figura 52: Avaliação da sensibilidade e especificidade do ELISA anti-SARS-CoV-2. (A) A sensibilidade e especificidade do antígeno N foram calculadas de acordo com o índice. A área cinza (índice variando de 0,8-1,09) indica resultados indeterminados. (b) Curva ROC considerando todos os resultados positivos de PCR, incluindo casos não detectados pelo DPP. (c) Análise considerando pacientes positivos para PCR com sorologia confirmada pelo DPP (teste sorológico de referência).

Ainda durante essa validação interna, foram testadas amostras positivas para Chikungunya (n=8), Dengue (n=8), Zika (n=8), amostras com níveis de fator reumatoide elevados (n=8), hemolisadas (n=11) e ictericas (n=11) e de indivíduos vacinados contra a gripe em 2020 (n=8) com qPCR negativa para SARS-CoV-2. Nenhuma dessas amostras apresentou resultado positivo no teste (Tabela 12).

Tabela 12: Painel de amostras testadas para avaliação da reatividade cruzada e interferentes durante a validação interna do ELISA-COVID-19 IgG¹⁵

PAINEL DE AMOSTRAS	ELISA COVID-19 IGG		
	n	Negativas	% Negativas
PCR NEGATIVAS VACINADOS CONTRA INFLUENZA (2020)	8	8	100%
SOROLOGIA POSITIVA PARA CHIKUNGUNYA (ANTES DE 2020)	8	8	100%
SOROLOGIA POSITIVA PARA DENGUE (ANTES DE 2020)	8	8	100%
SOROLOGIA POSITIVA PARA ZIKA (ANTES DE 2020)	8	8	100%
FATOR REUMATOIDE ELEVADO (ANTES DE 2020)	8	8	100%
HEMOLISADAS (2020, SOROLOGIA NEGATIVA PARA SARS-COV-2)*	11	11	100%
ICTÉRICAS (2020, SOROLOGIA NEGATIVA PARA SARS-COV-2)*	11	11	100%

*Testadas com o teste rápido DPP/Bio-Manguinhos

4.7.1 Determinação dos controles

Foram testadas diferentes diluições de um *pool* de amostras (1:8, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, Quadro 8, coluna 1) em dois diluentes de anticorpos comerciais, Moss e BioStab, e submetidos a condições de temperatura 2-8 e 37°C. Essas mesmas diluições foram testadas nos dias D 0, 3, 7, 14 e 21, conforme o protocolo de diluição da amostra (Quadro 8, Coluna 2, 1:101, em diluente de amostra, formulação no apêndice C).

Os seguintes valores foram encontrados na validação inicial: $M_{neg} = 0,195$ $DP_{neg} = 0,096$, de forma que para satisfazer a equação 4, era necessário obter um controle positivo de absorbância (OD450 nm) entre 2,000 ($M_{neg} + 2DP$, cut-off=0,387) e 3,000 ($M_{neg} + 3DP$, cut-off =0,483). Ao final do período de armazenamento as amostras diluídas em BioStab apresentaram maior estabilidade que em Moss, sendo escolhida a diluição de 1:10 para o controle positivo (absorbância 2,396 no Dia 0 e 2,272 no Dia 21/37°C, variação -5%) e 1:640 para o controle negativo (absorbância 0,135 no Dia 0 e 0,147 no Dia 21/37°C, variação +8%), sendo que para ambos a variação ficou inferior a 20% (Figura 53).

¹⁵ Mais amostras do estudo de reatividade cruzada foram testadas em laboratórios externos (item 4.7.6). Não foi possível avaliar a reatividade cruzada com outros coronavírus por ausência de amostras caracterizadas desse tipo no CT-Vacinas e em laboratórios parceiros.

Quadro 8: Etapa de padronização dos controles do teste. Resultados obtidos com o BioStab, que foi o estabilizante selecionado.

Coluna 1	Coluna 2	Coluna 3	Leitura dia 0			
Diluição inicial	Teste	Diluição Final	DO 450nm	Índice (M+3DP)	Índice (M+2DP)	Resultado
1:8	Diluição 1:10 ¹	(1:808)	2,780	6,3	7,2	Reagente
1:10 ¹		(1:1010)	2,396	5,4	6,2	Reagente
1:20		(1:2020)	1,702	3,9	4,4	Reagente
1:40		(1:4040)	1,023	2,3	2,6	Reagente
1:80		(1:8080)	0,622	1,4	1,6	Reagente
1:160		(1:16160)	0,342	0,8	0,9	Indeterminado
1:320		(1:32320)	0,215	0,5	0,6	Não reagente
1:640 ²		(1:64640)	0,135	0,3	0,3	Não reagente
Bioestab		Diluyente de amostra				

¹ Diluição determinada para o controle positivo

² Diluição determinada para o controle negativo

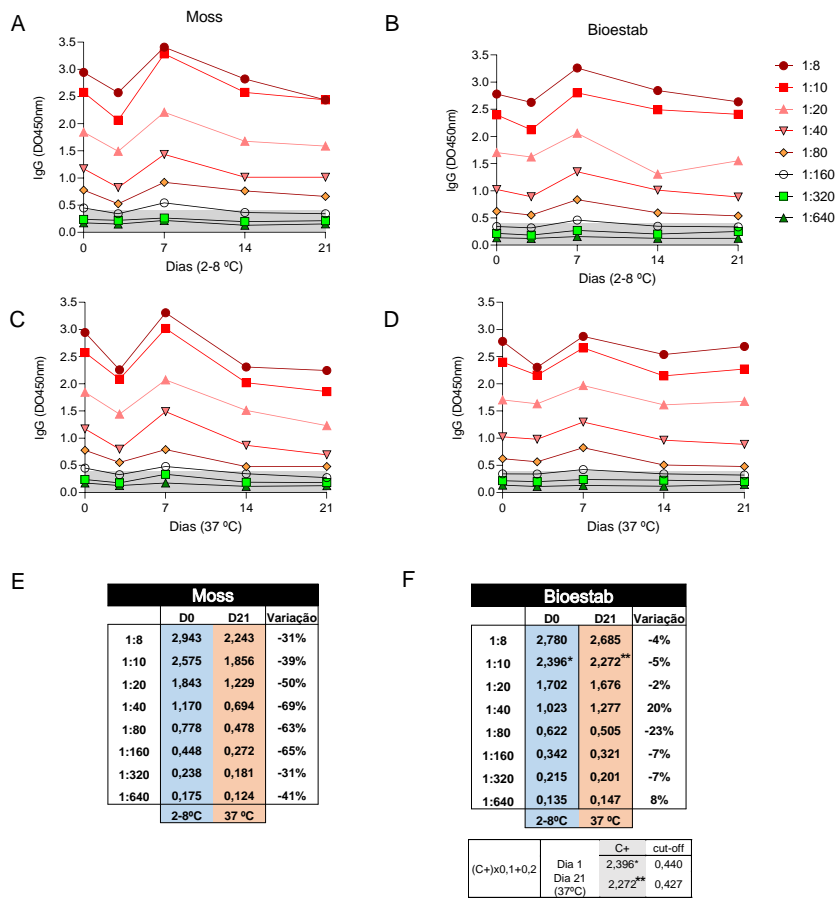


Figura 53-Avaliação da estabilidade dos controles do kit IIE COVID-19. Um pool positivo foi diluído (1:8 a 1 :640) em dois diluentes comerciais: Moss (A e C) e Bioestab (B e D), e submetido a condições de temperatura 2-8 (A e B) e 37°C (C e D). Essas diluições foram testadas nos dias D0,3,7,14 e 21, conforme o protocolo de diluição da amostra. Símbolos em vermelho: resultado reagente, branco: indeterminado e verde: não reagente. E e F mostram os quadros comparativos entre o Dia 0 (D0) a 2-8°C e Dia 21 (D21) a 37°C, e as taxas de variação de cada condição. Ao final, foi determinada a diluição de 1:10 e 1:640 em Bioestab, para os controles positivo e negativo, respectivamente. Em F, abaixo do quadro é exibido o cálculo do cut-off nos dias iniciais e finais do experimento.

4.7.1 Precisão

Para a avaliação da precisão entre as amostras testadas com um mesmo lote, foram realizadas oito repetições, durante três dias consecutivos de quatro amostras diferentes. Os resultados estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 13: Análise de precisão do kit de ELISA COVID-19 IgG.

	A ₁ (SCT02)*		A ₂ (SCT19)*		A ₃ (SPF05)**		A ₄ (SCT16)**	
DO_{450nm} Média	0.125		0.219		0.496		2.015	
Resultado geral	negativa		negativa		bord./positiva		positiva	
% positivas	0%		0%		25%		100%	
% indeterminadas	0%		0%		75%		0%	
% negativa	100%		100%		0%		0%	
	DP	%CV	DP	%CV	DP	%CV	DP	%CV
Repetibilidade (r)	0,01	5,3	0,01	3,6	0,03	5,3	0,11	5,7
Precisão intermediária (Rw)	0,01	10,3	0,02	9,9	0,04	8,8	0,15	7,3

* Soros negativos para SARS-CoV-2; ** Soros positivos para SARS-CoV-2. DP: Desvio padrão de oito medições de absorbância para cada amostra. %CV: Coeficiente de variação (%) de oito medições para cada amostra.

Os CVs das quatro amostras testadas foram todos abaixo de 20%, demonstrando boa repetibilidade numa mesma corrida e entre corridas, utilizando um único lote do produto. Durante a avaliação da precisão entre lotes, cinco amostras (três positivas e duas negativas), além de controles positivos e negativos, foram testadas usando três lotes diferentes do kit ELISA COVID-19 IgG (Tabela 14).

Tabela 14: Análise da precisão entre lotes do kit de ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-COVID19.

	DO450nm			Índice								
	Lote 1	Lote 2	Lote3	Média	DP	%CV	Lote 1	Lote 2	Lote3	Média	DP	%CV
<i>Cut-off</i>	0,448	0,432	0,429	0,436	0,01	2%						
Controle Negativo	0,128	0,136	0,135	0,133	0,00	3%	0,3	0,3	0,3	0,3	0,0	6%
Controle positivo	2,482	2,317	2,288	2,362	0,10	4%	5,5	5,4	5,3	5,4	0,1	2%
Amostra 1*	0,080	0,089	0,082	0,084	0,00	6%	0,2	0,2	0,2	0,2	0,0	7%
Amostra 2*	0,205	0,191	0,180	0,192	0,01	7%	0,5	0,4	0,4	0,4	0,0	4%
Amostra 3**	3,481	3,351	3,461	3,431	0,07	2%	7,8	7,8	8,1	7,9	0,2	2%
Amostra 4**	1,320	1,208	1,175	1,234	0,08	6%	2,9	2,8	2,7	2,8	0,1	4%
Amostra5**	0,971	0,831	0,916	0,906	0,07	8%	2,2	1,9	2,1	2,1	0,1	6%

* Soros negativos para SARS-CoV-2; ** Soros positivos para SARS-CoV-2.

Índice= Absorbância/*cut-off* do teste, vermelho $\geq 1,1$ (reagente), verde $< 0,8$ (não reagente)

Não houve diferença significativa entre os índices amostrais considerando os três lotes testados, conforme demonstrado pela análise de significância ($p = 0,9700$,

teste de Kruskal-Wallis), o que confirmou a boa precisão entre diferentes lotes do produto.

4.7.2 Estabilidade

4.7.2.1 Estabilidade por agressão acelerada

Para avaliar a estabilidade do kit de ELISA COVID-19 IgG, placas revestidas com a proteína recombinante e todos os reagentes necessários para execução do ELISA foram armazenados a 37°C. Ao final do período de armazenamento (21 dias), as amostras não apresentaram alteração significativa em relação à classificação inicial (D0) (Tabela 15).

Tabela 15: Variação do índice durante o ensaio de estabilidade acelerada.

AMOSTRA	ÍNDICE			VARIAÇÃO	
	Dia 0	Dia 7	Dia 21	Dia 7	DIA 21
MSPF*	0.4	0.3	0.3	-13%	-26%
CLBACC*	0.6	0.4	0.4	-27%	-31%
A15*	0.6	0.5	0.4	-25%	-38%
AFC*	0.6	0.5	0.4	-25%	-36%
WAV25**	5.3	5.1	4.3	-3%	-18%
SPF14**	4.5	3.6	3.1	-20%	-32%
SPF10B**	2.6	1.8	1.7	-29%	-33%
SPF09A**	1.5	1.2	1.1	-17%	-24%
CUT-OFF	0.422	0.412	0.360	-2%	-15%
GLOBAL				-20% (IC 95%: 14-26%)	-30% (IC 95%: 25-34%)

* SOROS NEGATIVOS PARA SARS-COV-2 (PRÉ PANDEMIA); ** SOROS DPP POSITIVOS PARA SARS-COV-2.
 ÍNDICE= OD/CUT-OFF DO TESTE, VERMELHO $\geq 1,1$ (REAGENTE), VERDE $< 0,8$ (NÃO REAGENTE).
 CUT-OFF= $OD(C+) \times 0,1 + 0,2$

A taxa de queda geral do kit a 37°C foi de 20% (IC 95%: 14-26%) em 7 dias, e 30% (IC 95%: 25-34%) em 21 dias (equivalente a 9 e 27 meses entre 2-8°C, respectivamente) (MATEJTCHUK; PHILLIPS, 2007). Considerando o uso do produto de ELISA COVID-19 IgG para fins comerciais, o prazo de validade do kit foi estabelecida como de nove meses (80% de recuperação) (FDA, 2018).

4.7.2.2 Estabilidade em tempo real

O ensaio de estabilidade em tempo real após aberto foi realizado comparando-se um lote produzido e validado (Dia 0). Este mesmo lote foi armazenado em geladeira sendo posteriormente testado após três meses. Foram utilizadas quatro amostras negativas e quatro positivas, sendo que não houve alteração na classificação das amostras testadas, com uma variação média do índice de 11% (2-20%) indicando que o protótipo foi estável por 3 meses após aberto (Tabela 16).

Tabela 16: Variação do índice durante o ensaio de estabilidade em tempo real após aberto.

	Dia 0 <i>Cut-off</i> = 0,426		Dia 90 <i>Cut-off</i> = 0,393		Variação do índice (%)
	Do (450nm)	Índice	Do (450nm)	Índice	
SCT01*	0,203	0,5	0,147	0,4	-27%
SCT02*	0,166	0,4	0,127	0,3	-21%
SCT03*	0,165	0,4	0,140	0,4	-9%
SCT04*	0,152	0,4	0,115	0,3	-22%
SPF13 **	0,673	1,6	0,540	1,4	-15%
SPF14 **	1,942	4,6	1,974	5,0	9%
SCT16**	2,242	5,3	1,929	4,9	-7%
SPF10B**	1,160	2,7	1,102	2,8	3%
Global					-11% (IC: 2-20%)

*Soros negativos para SARS-CoV-2(qPCR); **Soros positivos para SARS-CoV-2 pelo DPP. OD= densidade ótica 450nm. *Cut-off*= OD(C+) x 0,1 + 0,2

4.7.1 Concordância Positiva em relação a PCR

A concordância positiva em relação a PCR foi avaliada utilizando o painel de amostras do estudo de soroconversão (item 3.4ii , sendo 146 amostras de 43 indivíduos), coletadas em diferentes momentos após a confirmação pela pesquisa de RNA viral em amostras de *swab*. Considerando os resultados indeterminados como negativos (uma vez que se trata de uma análise de concordância positiva), o kit de ELISA COVID-19 IgG apresentou uma concordância de 38% de positividade em amostras coletadas em até 10 dias após a confirmação por qPCR, de 67% entre 11-20 dias e 100% acima de 21 dias (Tabela 17).

Tabela 17: Concordância Positiva do ELISA COVID-19 IgG em relação a qPCR

ELISA COVID-19 IgG					
Dias após a qPCR	n	Neg	Pos	Ind.*	Positividade (%) (95% CI)
≤10	40	23	15	2	38% (27.61 - 50.12%)
(11-20)	67	14	45	8	67% (55.26 - 77.21%)
≥21	39	0	39	0	100% (83.18 - 100.0%)

*Amostras indeterminadas foram contadas como negativas.

Essas amostras também foram testadas com o DPP (método sorológico de referência). Esta plataforma apresentou 35% (14/40) de positividade em amostras coletadas em até 10 dias após a confirmação por qPCR, de 11-20 dias após a confirmação molecular a taxa de positividade foi de 64% (43/67) e após 21 dias, a positividade foi de 85% (33/39).

4.7.2 Comparação com método sorológico de referência (DPP)

Um total de 230 amostras foram utilizadas para avaliar a concordância entre os kits ELISA e DPP (referência sorológica, gentilmente doados pelo instituto Bio-Manguinhos) na detecção de anticorpos IgG contra SARS-CoV-2. Neste caso, foram incluídas as amostras do estudo de soroconversão (n=166), casos suspeitos (pessoas que não realizaram a qPCR, mas que tiveram contato com casos confirmados pelo teste molecular, sendo sintomáticos ou não, n=43) além de amostras de doadores saudáveis com resultado da qPCR de *swab* nasal negativo (n = 21). Considerando as amostras com resultado positivo no DPP, o ELISA apresentou sensibilidade de 93% (92/99) e especificidade de 100% (21/21). Não foram detectados casos de doador saudável, com PCR negativo, e sorologia positiva para IgG, mas três deles apresentaram resultado de IgM positivo no DPP (Apêndice K). O comparativo DPP x ELISA para detecção de IgG indicou uma boa correlação (sendo considerada alta para indivíduos não hospitalizados, $r=0,8915$, e moderada para indivíduos hospitalizados $r=0,6631$) e retornou um índice kappa $K = 0,73320$ (IC 95%: 0,64204 - 0,82436) Figura

54A e B, respectivamente, indicando uma boa concordância entre os dois testes. Os resultados indeterminados pelo ELISA (n=21) não foram incluídos nesta última análise (Figura 54 C). A taxa de sensibilidade do DPP e ELISA foram avaliadas ao longo do tempo, sendo crescente nos primeiros 30 dias após a PCR. Após este período, houve uma tendência a queda para ambos os testes. A sensibilidade do ELISA foi superior a do DPP por todo o período investigado.

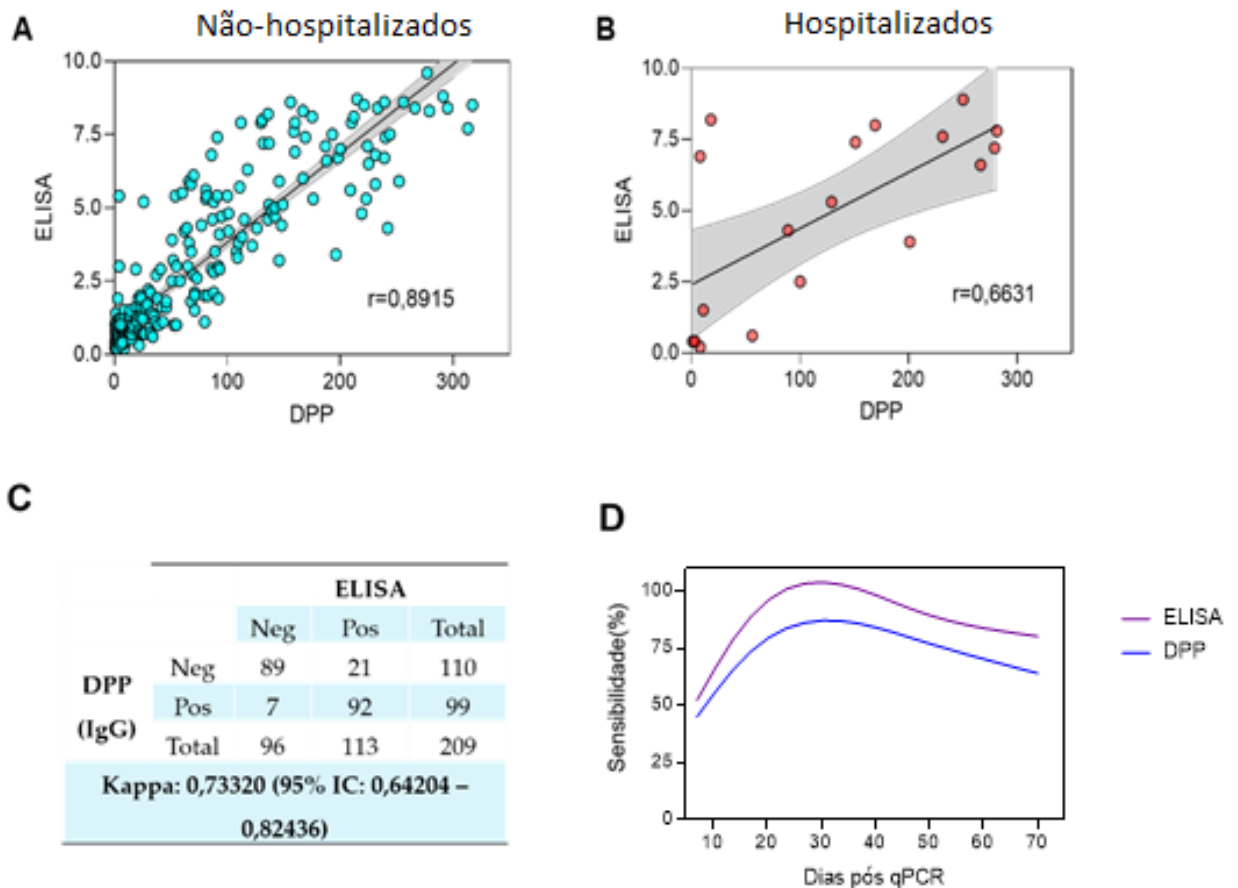


Figura 54- Comparação entre ELISA e DPP (referência sorológica). Correlação entre DPP e ELISA utilizando amostras após confirmação de qPCR de indivíduos não hospitalizados (A) e hospitalizados (B). A concordância entre ELISA e DPP foi avaliada pelo coeficiente Kappa (C). A taxa de sensibilidade em comparação com a qPCR foi avaliada ao longo do tempo para ambos os testes (D). As curvas DPP (azul) e ELISA (roxo) foram construídas com base nas coletas dos pacientes não-hospitalizados (que tinham dados de tempo após a qPCR, eixo X) pela opção "Fit spline" do GraphPad Prism.

4.7.3 Validação externa e análise de interferentes

Os testes feitos no Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo (Fiocruz retornou os seguintes resultados:

- Das 28 amostras positivas testadas (SARS-CoV-2 qPCR +), 21 apresentaram resultado reagente, cinco não reagente e duas indeterminadas
- Das 30 amostras negativas testadas (SARS-CoV-2 qPCR -), 30 apresentaram resultado não reagente.
- Das 15 amostras positivas para Sarampo, 14 apresentaram resultado não reagente e uma apresentou-se como indeterminada.
- Das 19 amostras positivas para Influenza, 17 apresentaram resultado não reagente, uma apresentou resultado reagente¹⁶ e uma apresentou-se como indeterminada.

Considerando as amostras classificadas como qPCR- e interferentes (Sarampo e Influenza), o teste apresentou 97% (IC: 89-99%) de especificidade e 81% (CI: 75-92%) de sensibilidade para as amostras SARS-CoV-2 qPCR +.

Os testes feitos no Laboratório de Virologia (USP) retornaram os seguintes resultados:

- Das 52 amostras positivas testadas (SARS-CoV-2 qPCR +), 41 apresentaram resultado reagente, sete não reagente e quatro indeterminadas.
- As amostras positivas para Sarampo (n=10) apresentaram resultado não reagente.
- As amostras positivas para Parvovirose (n=6) apresentaram resultado não reagente.
- Das amostras positivas para Zika (n=6), cinco apresentaram resultado não reagente e uma apresentou resultado indeterminado.

¹⁶ Acredita-se que este tipo de reação inespecífica pode estar relacionado a qualidade da amostra, já que a taxa de positividade foi de 5%. Amostras congeladas há mais tempo e que passaram por etapas de congelamento e descongelamento tendem a apresentar absorvância mais elevada. Além disso, como demonstrado na validação interna, amostras frescas de indivíduos vacinados contra Influenza não interferiram no teste (100% de especificidade).

- Das amostras positivas para Febre amarela (n=13), 11 apresentaram resultado não reagente, e duas apresentaram resultado indeterminado.

Considerando as amostras de Sarampo, Parvovirose, Zika e Febre Amarela (coletadas antes de 2020) o teste apresentou 100% (CI: 90-100%) de especificidade e 85% (CI: 76-91%) de sensibilidade para as amostras SARS-CoV-2 qPCR+.

Os gráficos de dispersão das amostras bem como a curvas ROC geradas são apresentados na Figura 55.

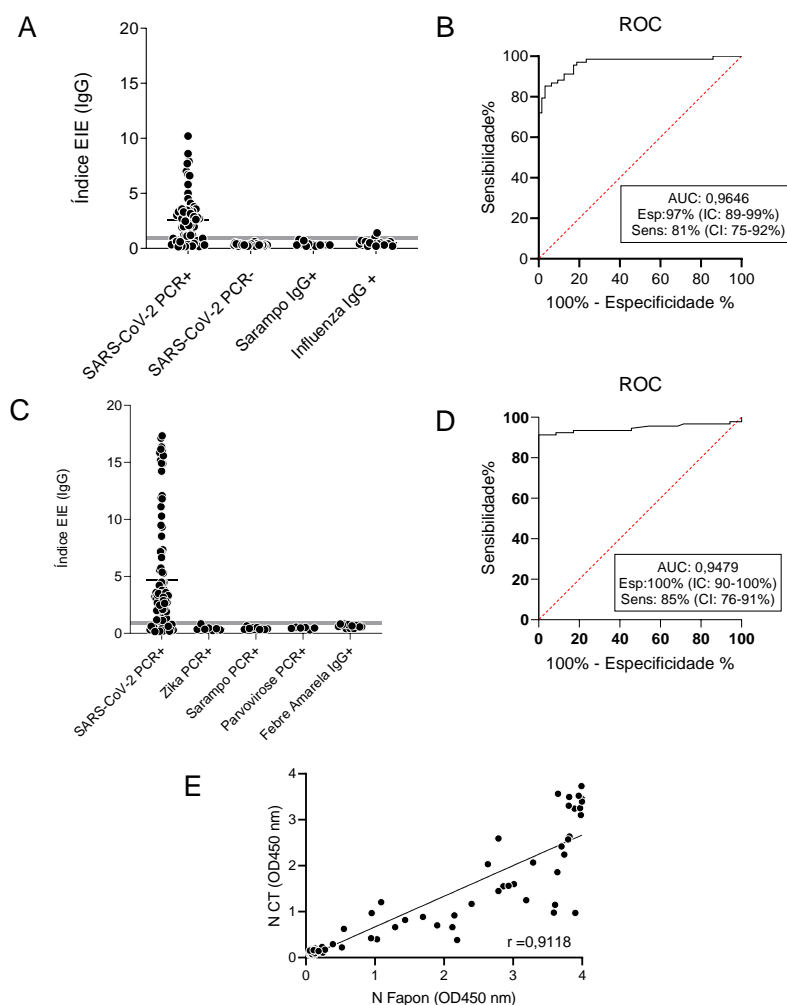


Figura 55. Resultados das avaliações externas do kit de ELISA COVID-19 IgG. [A]: Validação realizada no Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo (Fiocruz-RJ) e [B] curva ROC do mesmo; [C] Validação realizada no Laboratório de Virologia (USP) e [D] curva ROC do mesmo; [E]: análise por regressão linear comparando o desempenho da proteína N produzida no CT-Vacinas com uma proteína comercial (Fapon).

A área sobre a curva ROC foi de $AUC=0,9646$ para o teste realizado na Fiocruz-RJ e $AUC= 0,9472$ para o teste realizado na USP, indicando uma alta acurácia de ambos os ensaios. Ainda no laboratório do Dr. Durigon, as mesmas amostras foram testadas em paralelo com uma placa sensibilizada com uma proteína N comercial (Ref.: FPZ0537, Fapon, China). A correlação entre os resultados comparando-se as proteínas N CT-Vacinas e N-Fapon foi considerada alta pelo coeficiente de Pearson ($r=0,9118$, 95% IC: 0,8678 - 0,9416) (Figura 55.E).

Outro ensaio de validação foi executado no Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (Fiocruz-RJ). Neste ensaio, a sensibilidade do teste foi de 95,73% (85,75% a 99,49) e a especificidade de 97,66% (93,3% - 99,51%). O relatório gerado pelo Dr. Edimilson Domingos da Silva encontra-se no Anexo B.

Após as validações externas e comprovação de que o kit de ELISA era uma proposta de produto específico, sensível e estável, a tecnologia do mesmo foi transferida para o Laboratório de Tecnologia Diagnóstica, onde foi desenvolvido um lote protótipo experimental para expandir as avaliações já na formatação de produto comercial, denominado EIE COVID-19 IgG (Figura 56). Essa transferência para o laboratório de Bio-Manguinhos foi realizada no contexto da parceria com o Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) por meio da Rede Vírus. O EIE COVID-19 IgG encontra-se em processo de registro na ANVISA.



Figura 56: Kit EIE COVID-19 IgG. Lote protótipo experimental produzido no Instituto Bio-Manguinhos após a transferência de tecnologia do CT-Vacinas.

5 DISCUSSÃO

Este capítulo apresentou o processo de desenvolvimento de um ensaio sorológico para detectar anticorpos contra a infecção por SARS-CoV-2. Embora a maioria dos kits sorológicos para SARS-CoV-2 atuais sejam baseados em antígenos produzidos em sistemas eucarióticos, o EIE COVID-19 IgG teve desempenhos semelhantes aos de fabricantes conhecidos (CASTRO *et al.*, 2020).

A maioria dos ensaios comerciais usa a proteína *Spike* como antígeno para a detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 (LV *et al.*, 2020; PERERA *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020a). Pesquisas com SARS-CoV já haviam apresentado dificuldade em expressar a proteína *Spike* inteira em sistema procarioto (WOO *et al.*, 2004). Por isso, foram desenhados genes baseados em fragmentos menores da *Spike* do SARS-CoV-2. Ainda que tenha sido possível expressar parte da porção S1 (contendo o domínio RBD) em *E. coli*, esta proteína se mostrou insolúvel e apresentou baixa capacidade de diferenciar soros de indivíduos negativos de pacientes com COVID-19. Além desta proteína, outras cinco versões da proteína *Spike* também foram produzidas em *E. coli* e não demonstraram potencial como insumo diagnóstico em ELISA (dados não mostrados), diferentemente da proteína do nucleocapsídeo. Esses fatores provavelmente estão atrelados ao nível de complexidade e bioquímica dessas moléculas. Como publicado mais recentemente, a adição de porções de glicano pode ter um papel relevante no processo de dobramento das proteínas *in vivo*, na dinâmica e imunogenicidade da porção RBD. Apesar de seu tamanho médio, este é um domínio desafiador para se expressar em sistemas heterólogos devido à sua topologia complexa. Embora *E. coli* seja um sistema de baixo custo para a expressão de muitas proteínas, é improvável para produção da RBD devido à sua necessidade de formação de ligações dissulfeto e glicosilação para sua expressão e dobramento apropriados. Por esta razão, a RBD é geralmente expresso em células de mamíferos e também de insetos (CONSORTIUM, 2020).

Já a proteína N foi obtida *in house* de forma solúvel (e provavelmente em sua conformação nativa), apresentando alto rendimento em *E. coli*. Esse antígeno teve seu desempenho comparado em ELISA a duas proteínas S, uma inteira e uma derivada da porção S1, ambas produzidas em outros laboratórios, expressas em células de

mamíferos (HEK293). Ainda que alguns pacientes respondam melhor para um antígeno que para outro (Figura 48), a proteína N demonstrou, de maneira geral, uma maior sensibilidade na detecção de anticorpos do tipo IgG em relação as versões da *Spike* testadas. Nessa época (maio de 2020), um estudo sobre a imunogenicidade superior de N sobre S (ambos produzidos em células de mamífero, COS1) também foi divulgado (HACHIM *et al.*, 2020). Em alguns trabalhos, ELISA empregando N como antígeno demonstraram maior sensibilidade na detecção de anticorpos em pacientes levemente infectados, além de melhor correlação com testes de neutralização por redução de placa em comparação com ELISA utilizando a proteína S1 produzida em sistema eucariotos (PERERA *et al.*, 2020).

Ao comparar o desempenho das proteínas neste capítulo e, analisando cada caso individualmente, foi possível perceber que alguns pacientes respondem melhor para determinado antígeno do que para outro. Para alguns casos, ainda que a cinética de resposta contra as duas proteínas pareça similar, uma pequena diminuição no índice pode alterar o resultado de forma que a amostra seja considerada indeterminada ou até negativa, o que não descarta o uso das duas proteínas associadas para uma maior chance de detecção.

Na análise de desempenho das proteínas N, S1(F) e S (Apêndice H) foi possível obter uma taxa de sensibilidade de N sozinha (98%) muito próxima de um ELISA com esta proteína associada a uma das outras duas versões da *Spike* (100%), o que não aconteceu com as proteínas *Spike* testadas de forma isolada (81% de sensibilidade para S1F e 85% para S). Amostras de oito pacientes apresentaram resultado não reagente para ambas versões das *Spikes* testadas de forma isolada e resultado reagente para N (sozinha ou associada), sendo dois pacientes hospitalizados (SPF10B, SPF11) e seis não hospitalizados (SCT16, SPF143, SPF207, SPF212, SPF274 e SPF294), demonstrando que a proteína N foi imunodominante entre as amostras analisadas. Somente uma amostra confirmada por qPCR apresentou resultado não reagente ($I < 0,8$) para N sozinha e reagente para as outras condições (SPF145), e quatro amostras qPCR positivas apresentaram resultado indeterminado para N sozinha e reagente para as outras condições (SPF118, SPF133, SPF168 e SPF172), o que justificaria a associação das proteínas para uma maior taxa de positividade.

É importante ressaltar que o procedimento que é adotado quando uma amostra apresenta resultado indeterminado é de repetir o teste com uma nova amostra colhida após 7 a 14 dias (RODRIGUEZ-MORALES *et al.*, 2020), o que justifica a diferença entre a taxa de positividade do teste e a sensibilidade do mesmo. Além disso, em termos de custo-benefício, a utilização do antígeno N por si só é um ganho significativo, uma vez que ele foi produzido em um sistema simples e apresentou alto rendimento, podendo ser facilmente empregado em ELISA para atender a demanda nacional. De fato, um lote da proteína N foi produzido em biorreator de bancada no CT-Vacinas e, a partir de uma cultura de quatro litros, rendeu o equivalente a um grama de proteína (dados realizados posteriormente a execução deste trabalho, não mostrados), sendo o suficiente para 22,7 mil placas, o que significa mais de dois milhões de testes. Além disso, existe a possibilidade de produção em outros locais. Um primeiro lote externo da proteína N já foi produzido pela FUNED-MG após a transferência de tecnologia do CT-Vacinas e já foi validado.

Ao se considerar qualquer produto por metodologia ELISA, é importante destacar que um resultado negativo pode ocorrer se a quantidade de anticorpos para o vírus presente na amostra estiver abaixo do limite de detecção do ensaio e isso pode ser afetado pelo tempo de coleta da amostra após a infecção. O índice máximo (pico de anticorpos) detectado pelo EIE COVID-19 IgG proposto neste trabalho, foi avaliado para cada paciente (n=43) do estudo de soroconversão (Figura 46B), e é possível perceber que o pico global de anticorpos foi observado entre as coletas 3 e 4 (entre 15 e 28 dias após a PCR), representando uma média de 21,5 dias, tempo necessário para o produto atingir uma taxa de 100% de positividade em relação ao método molecular original (Tabela 17). É interessante comparar as correlações IgM x IgG realizadas neste capítulo (todas positivas) com as realizadas para CHIKV, no capítulo I (todas negativas). Isso pode indicar uma tendência maior à cinética clássica apresentada para Chikungunya e que é menos comum em casos de COVID-19, com também visto no item 4.4.1, para o DPP, que apresentou mais comumente a soroconversão do tipo síncrona (43% dos pacientes avaliados) e que também foi descrito pela literatura (SETHURAMAN; JEREMIAH; RYO, 2020).

Conforme solicitado pelas regulamentações internacionais, para validação visando a obtenção de protótipo adequado à comercialização, foram avaliados

aspectos de precisão e estabilidade. As análises de repetitividade intra e inter-ensaio foram satisfatórias, com CV <20% para ambos os testes e sem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre os três lotes do produto. Considerando a grande variabilidade inerente aos métodos baseados em imunoenaios, esses resultados indicam características de alta qualidade do produto desenvolvido.

Um estudo de degradação acelerada demonstrou que o produto foi estável (20% de queda) por 7 dias a 37°C, o equivalente a nove meses a 2-8°C, (MATEJTCHUK AND PHILLIPS, 2007). Conforme demonstrado, os valores de índice dos soros testados permaneceram estáveis ao longo do tempo, o que permite a obtenção de resultados confiáveis ao longo do período de validade estabelecido para o kit. A diminuição observada nos valores de absorvância está dentro de níveis aceitáveis de variação para um teste de degradação acelerada (FDA, 2018b). Além disso, o ensaio em tempo real comprovou que o produto é estável por pelo menos três meses após aberto.

O EIE COVID-19 IgG revelou-se uma ferramenta eficiente para avaliar a soroconversão de pacientes após a infecção pelo SARS-CoV-2 e apresentou maior sensibilidade do que um teste comercialmente disponível (DPP COVID-19 IgM / IgG, de Bio-Manguinhos, Fiocruz, Brasil). Este produto representa um acréscimo importante aos testes imunológicos atualmente disponíveis para diagnóstico e estudos epidemiológicos sobre o SARS-CoV-2.

6 CONCLUSÃO

O produto EIE COVID-19 IgG apresentado é um produto nacional, de baixo custo, e que possui ampla perspectiva de aplicação clínica e em estudos de sorovigilância envolvendo o SARS-CoV-2.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ainda há muito o que aprender... E ainda há muito o que ser feito.

Mesmo assim, eu já me sinto completa e realizada. Acompanhar um projeto que surgiu na Universidade Pública ser produzido em larga escala, em um dos maiores complexos biotecnológicos na América Latina, para então ser distribuído por todo o Brasil é, para mim, a realização de um sonho. Ele representa uma conquista não só da equipe do CT-Vacinas, mas da ciência brasileira como um todo e reflete a seriedade das pesquisas realizadas nas universidades. Eu sigo com a consciência tranquila, e com a sensação de que o meu papel perante a sociedade foi significativo.

Reitero que a nacionalização de produtos biotecnológicos é extremamente estratégica para o país. A nacionalização de produtos de diagnóstico sorológicos conforme apresentado neste trabalho, é um passo importante para a gestão de recursos voltadas à saúde pública e para o controle dos desafios atuais e que ainda virão.

REFERÊNCIAS

- ALCON, S. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 2, p. 376–381, fev. 2002.
- ALEXANDER KRÜTTGEN, CHRISTIAN G. CORNELISSEN, MICHAEL DREHER, M. H.; MATTHIAS IMÖHLA, M. K. Comparison of four new commercial serologic assays for determination of SARS-CoV-2 IgG. **Journal of Clinical Virology**, v. 128, n. April, p. 337–339, 2020.
- ANDRADE, D. V.; HARRIS, E. Recent advances in understanding the adaptive immune response to Zika virus and the effect of previous flavivirus exposure. **Virus research**, v. 254, p. 27–33, ago. 2018.
- ANDREASSON, U. et al. A practical guide to immunoassay method validation. **Frontiers in Neurology**, v. 6, n. Aug, p. 1–8, 2015.
- ANDREATA-SANTOS, R. et al. Specificity of NS1-based immunochromatographic tests for dengue virus with regard to the Zika virus protein. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 95, p. 276–278, 2020.
- ANVISA. **Consultas-Produtos Irregulares**. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/dossie/25351093131201991/?processo=25351093131201991>>. Acesso em: 1 mar. 2021.
- ANVISA. **Consultas: Produtos para Saúde**. Disponível em: <[https://consultas.anvisa.gov.br/#/saude/q/? nome Produto=Chikungunya](https://consultas.anvisa.gov.br/#/saude/q/?nomeProduto=Chikungunya)>. Acesso em: 30 dez. 2020.
- ATIF, M. et al. Zika virus disease: a current review of the literature. **Infection**, 2016.
- BAGNO, F. F. **Produção heteróloga, em sistema procarioto, de proteínas estruturais dos vírus Zika e Chikungunya e avaliação de seu potencial para o uso em ferramentas diagnósticas**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, 2018.
- BAHADIR, E. B.; SEZGINTÜRK, M. K. Lateral flow assays: Principles, designs and labels. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, p. 286–306, 2016.
- BANERJEE, N.; MUKHOPADHYAY, S. Viral glycoproteins: biological role and application in diagnosis. **VirusDisease**, v. 27, n. 1, p. 1–11, 2016.
- BAO, L. ET AL. Lack of Reinfection in 1 Rhesus Macaques Infected with SARS-CoV-2. **bioRxiv preprint**, v. 5, n. 1, p. 55, 2020.
- BESNARD, M. et al. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 13, p. 20751, 2014.
- BLISSARD, G. W.; THEILMANN, D. A. Baculovirus entry and egress from insect cells. **Annual Review of Virology**, v. 5, p. 113–139, 2018.
- BORMAN, P.; ELDER, D. Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: An Implementation Guide. In: [s.l.: s.n.]. p. 127–166.
- BRASIL, P. et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 24, p. 2321–2334, 2016.
- BURT, F. J. et al. Chikungunya: A re-emerging virus. **The Lancet**, v. 379, n. 9816, p. 662–671, 2012.
- CALVET, G. et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses

- with microcephaly in Brazil: A case study. **The Lancet Infectious Diseases**, p. 653–660, 2016.
- CAMPBELL, M. J., MACHIN, D., WALTERS, S. J. **Medical statistics: a textbook for the health sciences**. 4th editio ed. Chichester: [s.n.].
- CAO-LORMEAU, V. M. et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. **The Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, 2016.
- CARATTOLI, A. et al. Recombinant protein-based ELISA and immuno-cytochemical assay for the diagnosis of SARS. **Journal of Medical Virology**, v. 76, n. 2, p. 137–142, 2005.
- CARDONA-OSPINA, J. A. et al. Estimating the burden of disease and the economic cost attributable to chikungunya, Colombia, 2014. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 109, n. 12, p. 793–802, 1 dez. 2015.
- CASTRO, R. et al. COVID-19: a meta-analysis of diagnostic test accuracy of commercial assays registered in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 24, n. 2, p. 180–187, 2020.
- CHAIYARATANA, W. et al. Evaluation of dengue nonstructural protein 1 antigen strip for the rapid diagnosis of patients with dengue infection. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 64, n. 1, p. 83–84, maio 2009.
- CHAMBERS, A. C. et al. Overview of the Baculovirus Expression System. **Current Protocols in Protein Science**, v. 91, n. 1, p. 5.4.1-5.4.6, 2018.
- CHANG, C. et al. The Zika outbreak of the 21st century. **Journal of Autoimmunity**, v. 68, p. 1–13, 2016.
- CHANNAPPANAVAR, R.; ZHAO, J.; PERLMAN, S. T cell-mediated immune response to respiratory coronaviruses. **Immunologic Research**, v. 59, n. 1–3, p. 118–128, 2014.
- CHARLTON, C. L. et al. Evaluation of six commercial mid to high volume antibody and six point of care lateral flow assays for detection of SARS-CoV-2 antibodies. **Journal of clinical microbiology**, n. July, p. 1–38, 2020.
- CHEN, J. et al. Receptor-binding domain of SARS-Cov spike protein: Soluble expression in E.coli, purification and functional characterization. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, n. 39, p. 6159–6164, 2005.
- CHEN, Y.; LIU, Q.; GUO, D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 4, p. 418–423, 2020.
- CHENG, V. C. C. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 4, p. 660–694, 2007.
- CHO, B. et al. Expression and evaluation of Chikungunya virus E1 and E2 envelope proteins for serodiagnosis of chikungunya virus infection. **Yonsei Medical Journal**, v. 49, n. 5, p. 828–835, 2008.
- CHUN, P. **Colloidal Gold and Other Labels for Lateral Flow Immunoassays**. 2009
- CIFUENTES-MUÑOZ, N.; SALAZAR-QUIROZ, N., & TISCHLER, N. D. Hantavirus Gn and Gc envelope glycoproteins: key structural units for virus cell entry and virus assembly. **Viruses**, v. 6, n. 4, p. 1801–1822, abr. 2014.
- CONSORTIUM, A. A. Structural and functional comparison of SARS - CoV - 2 - spike receptor binding domain produced in *Pichia pastoris* and mammalian cells. p. 1–

- 18, 2020.
- CORMAN, V. M.; MUTH, D.; NIEMEYER, D.; DROSTEN, C. Hosts and Sources of Endemic Human Coronaviruses. **Advances in Virus Research**, v. 100, n. 5, p. 2112–2120, 2018.
- COX, M. M. J. Recombinant protein vaccines produced in insect cells. **Vaccine**, v. 30, n. 10, p. 1759–1766, fev. 2012.
- COX, R. J.; BROKSTAD, K. A. Not just antibodies: B cells and T cells mediate immunity to COVID-19. **Nature Reviews Immunology**, p. 1–2, 2020.
- CRODA, J. et al. Covid-19 in Brazil: Advantages of a socialized unified health system and preparation to contain cases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, n. April, p. 2–7, 2020.
- DAI, L. et al. Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. **Cell Host & Microbe**, v. 19, n. 5, p. 696–704, 2016.
- DANIEL, E. et al. ATGme: Open-source web application for rare codon identification and custom DNA sequence optimization. **BMC Bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 303, 2015.
- DAVIS, T. R. et al. Baculovirus Expression of Alkaline Phosphatase as a Reporter Gene for Evaluation of Production, Glycosylation and Secretion. **Bio/Technology**, v. 10, n. 10, p. 1148–1150, 1992.
- DE ALMEIDA, J. F. P.; ALVES, W. A. Descriptive profile of the occurrence of arboviruses in Governador Valadares, Minas Gerais, Brazil. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 8, n. 1, p. 1, 2020.
- DE CARVALHO, A. R. V. S. et al. Epidemiology, diagnosis, treatment, and future perspectives concerning SARS-COV-2: A review article. **Revista da Associação Medica Brasileira**, v. 66, n. 3, p. 370–374, 2020.
- DE SALAZAR, P. M. et al. Evaluation of three commercially-available chikungunya virus immunoglobulin G immunoassays. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 41, p. 1, 2017.
- DE SOUZA, W. M. et al. Epidemiological and clinical characteristics of the COVID-19 epidemic in Brazil. **Nature Human Behaviour**, v. 4, n. 8, p. 856–865, 2020.
- DESCHUYTENEER, M. et al. Molecular and structural characterization of the L1 virus-like particles that are used as vaccine antigens in Cervarix™, the AS04-adjuvanted HPV-16 and -18 cervical cancer vaccine. **Human vaccines**, v. 6, n. 5, p. 407–419, maio 2010.
- DEUTLER, T. Grubbs-Type Estimators for Reproducibility Variances in an Interlaboratory Test Study. **Journal of Quality Technology**, v. 23, n. 4, p. 324–335, 1 out. 1991.
- DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1 set. 1952.
- DIRLIKOV, E. et al. Acute Zika Virus Infection as a Risk Factor for Guillain-Barré Syndrome in Puerto Rico. **JAMA**, v. 318, n. 15, p. 1498–1500, 17 out. 2017.
- DO ROSÁRIO, M. S. et al. Case report: Guillain-barré syndrome after zika virus infection in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 5, p. 1157–1160, 2016.
- DOS SANTOS, A. R. R. et al. Evaluation of three recombinant proteins for the

- development of ELISA and immunochromatographic tests for visceral leishmaniasis serodiagnosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, n. 1, p. 1–11, 2019.
- DOS SANTOS, T. et al. Zika Virus and the Guillain–Barré Syndrome — Case Series from Seven Countries. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 16, p. 1598–1601, 31 ago. 2016.
- DUFFY, M. R. et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 2009.
- DUTTA, N. K. et al. Detection of Antibodies Against SARS-Coronavirus Using Recombinant Truncated Nucleocapsid Proteins by ELISA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 12, p. 2171–2175, 2008.
- ECDC, E. C. FOR DISEASE P. AND C. (. **An overview of the rapid test situation for COVID-19 diagnosis in the EU/EEA**. Disponível em: <<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/0Adocuments/Overview-rapid-test-situation-for-COVID-19-0Adiagnosis-EU-EEA>>. Acesso em: 12 ago. 2020.
- ECONOMOPOULOU, A. et al. Atypical Chikungunya virus infections: Clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005-2006 outbreak on Réunion. **Epidemiology and Infection**, v. 137, n. 4, p. 534–541, 2009.
- ERASMUS, J. H. et al. Utilization of an Eilat Virus-Based Chimera for Serological Detection of Chikungunya Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, p. 1–16, 2015.
- ESPÓSITO, D. L. A.; DA FONSECA, B. A. L. Complete Genome Sequence of Mayaro Virus (Togaviridae, Alphavirus) Strain BeAr 20290 from Brazil. **Genome Announcements**, v. 3, n. 6, p. e01372-15, 31 dez. 2015.
- FAN, H. et al. Immunogenicity of Empty Capsids of Porcine Circovirus Type 2 Produced in Insect Cells. **Veterinary research communications**, v. 31, p. 487–496, 1 jun. 2007.
- FARIA, N. R. et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**, v. 352, n. 6283, p. 345–349, 2016.
- FDA, F. AND D. A. **DPP® Zika IgM Assay System**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/media/119900/download>>. Acesso em: 1 mar. 2021a.
- FDA, F. AND D. A. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. **U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration**, n. May, p. 1–41, 2018b.
- FERNANDEZ-GARCIA, M. D. et al. Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. **Cell Host and Microbe**, v. 5, n. 4, p. 318–328, 2009.
- FRANCO, O. **História da Febre Amarela no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, DNERU, 1969.
- FUMAGALLI, M. J. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant envelope protein 2 antigen for diagnosis of Chikungunya virus. **Virology Journal**, v. 15, n. 1, p. 1–7, 2018.
- GERARDIN, P. et al. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Réunion. **PLoS Medicine**, v. 5,

- n. 3, p. 0413–0423, 2008.
- GÉRARDIN, P. et al. Neurocognitive Outcome of Children Exposed to Perinatal Mother-to-Child Chikungunya Virus Infection: The CHIMERE Cohort Study on Reunion Island. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, 2014.
- GILEADI, O. Recombinant Protein Expression in *E. coli*: A Historical Perspective. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1586, p. 3–10, 2017.
- GOODMAN, C. H. et al. Development of an algorithm for production of inactivated arbovirus antigens in cell culture. **Journal of virological methods**, v. 208, p. 66–78, nov. 2014.
- GORBALENYA, A. E. et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 536–544, 2020.
- GRANADOS, R. R. et al. A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 64, n. 3, p. 260–266, 1994.
- GRANGER, D. et al. Serologic Testing for Zika Virus: Comparison of Three Zika Virus IgM-Screening Enzyme-Linked Immunosorbent Assays and Initial Laboratory Experiences. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 7, p. 2127 LP – 2136, 1 jul. 2017.
- GRANGER, D.; THEEL, E. S. Evaluation of a Rapid Immunochromatographic Assay and Two Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of IgM-Class Antibodies to Zika Virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 3, p. e01413-18, 1 mar. 2019.
- GUBLER, D. J.; VASILAKIS, N.; MUSSO, D. History and Emergence of Zika Virus. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. December, p. S860–S867, 2017.
- GUO, H. C. et al. Foot-and-mouth disease virus-like particles produced by a SUMO fusion protein system in *Escherichia coli* induce potent protective immune responses in guinea pigs, swine and cattle. **Veterinary Research**, v. 44, n. 1, p. 1, 2013.
- GUO, L. et al. Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19). **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 15, p. 778–785, 2020.
- HACHIM, A. et al. Beyond the Spike: identification of viral targets of the antibody response to SARS-CoV-2 in COVID-19 patients. **medRxiv**, p. 2020.04.30.20085670, 2020.
- HAQUE, S. K. M. et al. A comprehensive review about SARS-CoV-2. **Future Virology**, v. 15, n. 9, p. 625–648, 2020.
- HAYES, E. B. Zika virus outside Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 9, p. 1347–1350, 2009.
- HITCHMAN, R. B.; POSSEE, R. D.; KING, L. A. Hitchman (2009) Baculovirus Expression Systems for Recombinant Protein Production in Insect cells.pdf. p. 46–54, 2009.
- HONG, E. M.; PERERA, R.; KUHN, R. J. Alphavirus Capsid Protein Helix I Controls a Checkpoint in Nucleocapsid Core Assembly. **Journal of Virology**, v. 80, n. 18, p. 8848 LP – 8855, 15 set. 2006.
- HOPKINS, R.; ESPOSITO, D. A rapid method for titrating baculovirus stocks using the Sf-9 Easy Titer cell line. **BioTechniques**, v. 47, n. 3, p. 785–788, set. 2009.
- HOSMER, D. W.; LEMESHOW, S.; STURDIVANT, R. X. **Applied Logistic**

- Regression: Third Edition.** [s.l: s.n.].
- HUANG, C.-J.; LIN, H.; YANG, X. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 39, n. 3, p. 383–399, mar. 2012.
- HUNTER, J. S. Measurement error. In: JOHNSON, S. K. AND N. J. (Ed.). **Encyclopedia of Statistical Sciences**. New York.: Wiley, 1982.
- HUZLY, D. et al. High specificity of a novel Zika virus ELISA in European patients after exposure to different flaviviruses. **Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, v. 21, n. 16, abr. 2016.
- INVITROGEN. **Bac-to-Bac® HBM TOPO® Secreted Expression System An.** Genome Biology. **Anais...**2009a
- INVITROGEN. **Bac-to-Bac TOPO™ Cloning Kit User Guide.** 2009b
- ISO 5725-1. **Accuracy (trueness and precision) Measurement Methods and Results. Part 1: General principles and definitions. Statistical methods for quality control, International Organization for Standardization.** Geneva, 1994.
- JANEWAY CA JR, TRAVERS P, WALPORT M, ET AL. The structure of a typical antibody molecule. In: **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease**. 5th. ed. New York: [s.n.].
- JESUS, J. G. DE et al. Original article. n. April, p. 1–5, 2020.
- JIN, J. et al. Neutralizing Monoclonal Antibodies Block Chikungunya Virus Entry and Release by Targeting an Epitope Critical to Viral Pathogenesis. **Cell Reports**, v. 13, n. 11, p. 2553–2564, 2015.
- JOHNSON, B. W. et al. Evaluation of commercially available Chikungunya Virus Immunoglobulin M detection assays. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 1, p. 182–192, 2016.
- KADKHODA, K.; GRETCHEN, A.; RACANO, A. Evaluation of a commercially available Zika virus IgM ELISA: specificity in focus. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 88, n. 3, p. 233–235, jul. 2017.
- KHAN, A. H. et al. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. **Journal of General Virology**, v. 83, n. 12, p. 3075–3084, 2002.
- KIKUTI, M. et al. Evaluation of two commercially available chikungunya virus IgM enzyme-linked immunoassays (ELISA) in a setting of concomitant transmission of chikungunya, dengue and Zika viruses. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 91, p. 38–43, 2020.
- KIM, Y. C. et al. Development of an E2 ELISA methodology to assess chikungunya seroprevalence in patients from an endemic region of Mexico. **Viruses**, v. 11, n. 5, 2019.
- KOLOSOVA, A. Y. et al. Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B1. Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, n. 1, p. 286–294, 2006.
- KOST, T. A.; KEMP, C. W. Fundamentals of baculovirus expression and applications. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 896, p. 187–197, 2016.
- KOSTYUCHENKO, V. A. et al. Structure of the thermally stable Zika virus. **Nature**,

- 2016.
- KOWALZIK, S. et al. Characterisation of a chikungunya virus from a German patient returning from Mauritius and development of a serological test. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 197, n. 4, p. 381–386, 2008.
- KR VERMA, A. et al. Cloning, expression and purification of Chikungunya virus E2 recombinant protein in E.coli. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. Suppl 3, p. P65, 2014.
- KROLL, M. H.; ELIN, R. J. Interference with clinical laboratory analyses. **Clinical chemistry**, v. 40, n. 11 Pt 1, p. 1996–2005, nov. 1994.
- KRUSKAL, W. H. et al. Journal of the American Statistical Analysis. v. 47, n. 260, p. 583–621, 2012.
- KUMAR, P. et al. Development and evaluation of baculovirus-expressed Chikungunya virus E1 envelope proteins for serodiagnosis of Chikungunya infection. **Journal of Virological Methods**, v. 206, p. 67–75, 2014.
- KUNO, G. et al. Phylogeny of the Genus &em>Flavivirus. **Journal of Virology**, v. 72, n. 1, p. 73 LP – 83, 1 jan. 1998.
- L'HUILLIER, A. G. et al. Evaluation of Euroimmun Anti-Zika Virus IgM and IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Zika Virus Serologic Testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 2462 LP – 2471, 1 ago. 2017.
- LAI, L. et al. Innate, T-, and B-Cell Responses in Acute Human Zika Patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 66, n. 1, p. 1–10, 2018.
- LANA, R. M. et al. The novel coronavirus (SARS-CoV-2) emergency and the role of timely and effective national health surveillance. **Cadernos de Saude Publica**, v. 36, n. 3, 2020.
- LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, 2008.
- LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159–174, 11 fev. 1977.
- LASSAUNIÈRE, R. et al. Evaluation of nine commercial SARS-CoV-2 immunoassays. p. 1–15, 2020.
- LEBRUN, G. et al. Guillain-Barré syndrome after chikungunya infection. **Emerging infectious diseases**, v. 15, n. 3, p. 495–496, mar. 2009.
- LEE, K. H.; ZENG, H. Aptamer-Based ELISA Assay for Highly Specific and Sensitive Detection of Zika NS1 Protein. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 23, p. 12743–12748, 2017.
- LEENAARS, M.; HENDRIKSEN, C. F. M. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. **ILAR journal**, v. 46, n. 3, p. 269–279, 2005.
- LEIS, A. A.; STOKIC, D. S. Zika Virus and Guillain-Barre Syndrome: Is There Sufficient Evidence for Causality? **Frontiers in neurology**, v. 7, p. 170, 30 set. 2016.
- LI, F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. **Annu Rev Virol.**, v. 29, n. 3, p. 237–261, 2016.
- LI, L. et al. Structural changes of envelope proteins during alphavirus fusion. **Nature**, v. 468, n. 7324, p. 705–708, 2010.
- LIBRATY, D. H. et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue

- hemorrhagic fever. **The Journal of infectious diseases**, v. 186, n. 8, p. 1165–1168, out. 2002.
- LIMA MARTINS, H. A. DE; BERNARDINO, S. N. Outbreak of Neuro-Chikungunya in Northeastern Brazil. **Journal of Neuroinfectious Diseases**, v. 7, n. 2, p. 2–4, 2016.
- LINDENBACH, ET AL. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds.). . **Fields Virology**. Fifth Edit ed. Philadelphia: [s.n.]. p. 1101–1152.
- LIU, L. et al. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. **Nature**, v. 584, n. 7821, p. 450–456, 2020.
- LONG, Q. X. et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. **Nature Medicine**, v. 26, n. 6, p. 845–848, 2020.
- LÓPEZ-CAMACHO, C. et al. Assessment of immunogenicity and neutralisation efficacy of viral-vectored vaccines against chikungunya virus. **Viruses**, v. 11, n. 4, p. 1–17, 2019.
- LUO, D. et al. Baculovirus Surface Display of Zika Virus Envelope Protein Protects against Virus Challenge in Mouse Model. **Virologica Sinica**, v. 35, n. 5, p. 637–650, 2020.
- LV, H. et al. Cross-reactive Antibody Response between SARS-CoV-2 and SARS-CoV Infections. **Cell Reports**, v. 31, n. 9, p. 107725, 2020.
- MACNAMARA, F. N. Zika virus: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 2, p. 139–145, 1954.
- MAGARI, R. T.; MURPHY, K. P.; FERNANDEZ, T. Accelerated stability model for predicting shelf-life. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 16, n. 5, p. 221–226, 2002.
- MAGDELDIN, S. Affinity Chromatography: Principles and Applications. In: MAGDELDIN, A. M. E.-S. (Ed.). . Rijeka: IntechOpen, 2012. p. Ch. 1.
- MARTI-CARVAJAL, A. et al. Interventions for treating patients with chikungunya virus infection-related rheumatic and musculoskeletal disorders: A systematic review. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, p. 1–15, 2017.
- MATEJTCHUK, P.; PHILLIPS, P. Product Stability and Accelerated Degradation Studie. **Medicines from Animal Cell Culture**, 2007.
- MEI, L. et al. Development and application of an antigen capture ELISA assay for diagnosis of Japanese encephalitis virus in swine, human and mosquito. **Virology Journal**, v. 9, n. 1, p. 4, 2012.
- MELO, A. S. D. O. et al. Congenital Zika virus infection: Beyond neonatal microcephaly. **JAMA Neurology**, v. 73, n. 12, p. 1407–1416, 2016.
- MENDOZA, E. J. et al. Combining anti-IgM and IgG immunoassays for comprehensive chikungunya virus diagnostic testing. **Zoonoses and Public Health**, v. 66, n. 8, p. 909–917, 2019.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Secretaria de Atenção Básica Chikungunya: Manejo Clínico**. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/25/chikungunya-novo-protocolo.pdf>>. Acesso em: 29 dez. 2020.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, B. **Protocolo de Manejo Clínico da Covid-19 na Atenção Especializada**. [s.l: s.n.].
- MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of

- the flavivirus life cycle. **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 13–22, 2005.
- MULLER, D. A.; YOUNG, P. R. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. **Antiviral research**, v. 98, n. 2, p. 192–208, maio 2013.
- MUNOZ-JORDAN, J. L. Diagnosis of Zika Virus Infections: Challenges and Opportunities. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. December, p. S951–S956, 2017.
- MURUGAN, S. B.; SATHISHKUMAR, R. Chikungunya infection: A potential re-emerging global threat. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, n. August, p. 1–5, 2016.
- MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika Virus. **Clinical microbiology reviews**, v. 29, n. 3, p. 487–524, jul. 2016.
- NAVECA, F. G. et al. Genomic, epidemiological and digital surveillance of Chikungunya virus in the Brazilian Amazon. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, p. 1–21, 2018.
- NAYAK, K. et al. Antibody response patterns in chikungunya febrile phase predict protection versus progression to chronic arthritis. **JCI Insight**, v. 5, n. 7, 2020.
- NG, L. F. P. Immunopathology of Chikungunya Virus Infection: Lessons Learned from Patients and Animal Models. **Annual Review of Virology**, v. 4, p. 413–427, 2017.
- NIGI, I.; FAIRALL, L.; SCHWABE, J. W. R. Expression and Purification of Protein Complexes Suitable for Structural Studies Using Mammalian HEK 293F Cells. **Current Protocols in Protein Science**, v. 90, n. 1, p. 5.28.1-5.28.16, 2017.
- NUNES, M. R. T. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, 2015.
- O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; AND LUCKOW, V. A. **Baculovirus Expression Vectors — A Laboratory Manual**. New York.: Oxford University Press, 1992.
- OEHLER, E. et al. Increase in cases of guillain-barré syndrome during a chikungunya outbreak, French Polynesia, 2014 to 2015. **Eurosurveillance**, v. 20, n. 48, p. 5–6, 2015.
- OKBA, N. M. A. et al. SARS-CoV-2 specific antibody responses in COVID-19 patients. **medRxiv**, p. 1–18, 2020.
- OLIVEIRA MELO, A. S. et al. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology**, v. 47, n. 1, p. 6–7, 1 jan. 2016.
- ONG, D. S. Y. et al. Comparison of diagnostic accuracies of rapid serological tests and ELISA to molecular diagnostics in patients with suspected coronavirus disease 2019 presenting to the hospital. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 8, p. 1094.e7-1094.e10, 2020.
- PAHO/WHO, P. A. H. O. / W. H. O. (). **Countries and territories where chikungunya cases have been reported**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html>>. Acesso em: 29 dez. 2020.
- PAIXÃO, E. S.; TEIXEIRA, M. G.; RODRIGUES, L. C. Zika, chikungunya and dengue: The causes and threats of new and reemerging arboviral diseases. **BMJ Global Health**, v. 3, p. 1–6, 2018.
- PERERA, R. A. P. M. et al. Serological assays for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), March 2020. **Eurosurveillance**, v. 25, n. 16, 2020.

- POSEN, H. J. et al. Epidemiology of Zika virus, 1947-2007. **BMJ Global Health**, v. 1, n. 2, p. 1–11, 2016.
- POWERS, A. M.; LOGUE, C. H. Changing patterns of chikunya virus: Re-emergence of a zoonotic arbovirus. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 9, p. 2363–2377, 2007.
- PRIYAMVADA, L. et al. Humoral Immune Responses Against Zika Virus Infection and the Importance of Preexisting Flavivirus Immunity. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. Suppl 10, p. S906–S911, 2017.
- QUEYRIAUX, B. ET AL. Clinical burden of chikungunya virus infection. **The Lancet**, v. 8, n. 1, p. 68–69, 2008.
- RATHORE, A. P. S.; ST. JOHN, A. L. **Cross-Reactive Immunity Among Flaviviruses** **Frontiers in Immunology**, 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.00334>>
- ROBIANI, D. F. et al. Recurrent Potent Human Neutralizing Antibodies to Zika Virus in Brazil and Mexico. **Cell**, v. 169, n. 4, p. 597- 609.e11, 4 maio 2017.
- RODRIGUES, A. M. et al. Genomic surveillance of the chikungunya virus (CHIKV) in Northeast Brazil after the first outbreak in 2014. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, n. December 2019, p. 1–6, 2020.
- RODRIGUEZ-MORALES, A. J. et al. Clinical, laboratory and imaging features of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 34, n. January, 2020.
- ROHRMANN, G. The baculovirus replication cycle: Effects on cells and insects. **Baculovirus Molecular Biology**, n. Figure 3, p. 1–32, 2013.
- ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. APR, p. 1–17, 2014.
- ROUGERON, V. et al. Chikungunya, a paradigm of neglected tropical disease that emerged to be a new health global risk. **Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 64, p. 144–52, 2015.
- SAFRONETZ, D. et al. Evaluation of 5 Commercially Available Zika Virus Immunoassays. **Emerging infectious diseases**, v. 23, n. 9, p. 1577–1580, set. 2017.
- SAIJO, M. et al. Recombinant nucleocapsid protein-based IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of SARS. **Journal of Virological Methods**, v. 125, n. 2, p. 181–186, 2005.
- SAJID, M.; KAWDE, A. N.; DAUD, M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 19, n. 6, p. 689–705, 2015.
- SCHIETTECATTE, J.; ANCKAERT, E.; SMITZ, J. Interferences in Immunoassays. In: CHIU, N. H. L. (Ed.). **Advances in Immunoassay Technology**. London: IntechOpen, 2012. p. 180.
- SCHWARTZ, O.; ALBERT, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 491–500, 2010.
- SCREATON, G. et al. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. **Nature reviews. Immunology**, v. 15, n. 12, p. 745–759, dez. 2015.

- SETHURAMAN, N.; JEREMIAH, S. S.; RYO, A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 323, n. 22, p. 2249–2251, 2020.
- SHANKAR, A.; PATIL, A. A.; SKARIYACHAN, S. Recent perspectives on genome, transmission, clinical manifestation, diagnosis, therapeutic strategies, vaccine developments, and challenges of zika virus research. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. SEP, p. 1–14, 2017.
- SHARP, J. S. et al. Structural characterization of the E2 glycoprotein from Sindbis by lysine biotinylation and LC-MS/MS. **Virology**, v. 348, n. 1, p. 216–223, 2006.
- SHUMAN, S. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 51, p. 32678–32684, dez. 1994.
- SILVA, I. B. B. et al. Zika virus serological diagnosis: commercial tests and monoclonal antibodies as tools. **The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 26, p. e20200019, nov. 2020.
- SILVA, L. A.; DERMODY, T. S. Chikungunya virus: Epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 737–749, 2017.
- SINGH, J.; SHARMA, S.; NARA, S. Evaluation of gold nanoparticle based lateral flow assays for diagnosis of enterobacteriaceae members in food and water. **Food Chemistry**, v. 170, p. 470–483, 2015.
- SIPS, G. J.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Neuroinvasive flavivirus infections. **Reviews in Medical Virology**, v. 22, n. 2, p. 69–87, 1 mar. 2012.
- SIROHI, D. et al. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. **Science (New York, N.Y.)**, v. 352, n. 6284, p. 467–70, 2016.
- SOLIGNAT, M. et al. **Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus** Virology Academic Press, , 25 out. 2009.
- SOUMAHORO, M. K. et al. Impact of Chikungunya virus infection on health status and quality of life: A retrospective cohort study. **PLoS ONE**, v. 4, n. 11, p. 1–6, 2009.
- STAPLES, J. E.; BREIMAN, R. F.; POWERS, A. M. Chikungunya Fever: An Epidemiological Review of a Re-Emerging Infectious Disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 6, p. 942–948, 2009.
- STERNER, E.; FLANAGAN, N.; GILDERSLEEVE, J. C. Perspectives on Anti-Glycan Antibodies Gleaned from Development of a Community Resource Database. **ACS Chemical Biology**, v. 11, n. 7, p. 1773–1783, 2016.
- STETTLER, K. et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. **Science**, v. 353, n. 6301, p. 823–826, 2016a.
- STETTLER, K. et al. Specificity, cross-reactivity and function of antibodies elicited by Zika virus infection. **Science**, v. 353, n. 6301, p. 823–826, 2016b.
- STOLT-BERGNER, P. et al. Baculovirus-driven protein expression in insect cells: A benchmarking study. **Journal of Structural Biology**, v. 203, n. 2, p. 71–80, 2018.
- SUN, S. et al. Structural analyses at pseudo atomic resolution of Chikungunya virus and antibodies show mechanisms of neutralization. **eLife**, v. 2013, n. 2, p. 1–27, 2013.
- TANABE, I. S. B. et al. Cellular and Molecular Immune Response to Chikungunya Virus Infection. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, n. October, p.

- 345, 2018.
- TEICH, V.; ARINELLI, R.; FAHHAM, L. *Aedes aegypti* e sociedade: o impacto econômico das arboviroses no Brasil. **Jornal Brasileiro de Economia da Saúde**, v. 9, n. 3, p. 267–276, 2017.
- TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. Epidemiological situation and. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 64, p. 53–72, 2008.
- THEEL, E. S. et al. Performance characteristics of four high-throughput immunoassays for detection of igg antibodies against sars-cov-2. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 1–11, 2020.
- THEVARAJAN, I.; BUISING, K. L.; COWIE, B. C. Clinical presentation and management of COVID-19. **Medical Journal of Australia**, v. 213, n. 3, p. 134–139, 2020.
- TO, K. K. W. et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 5, p. 565–574, 2020.
- TORRES, J. R. et al. Congenital and perinatal complications of chikungunya fever: a Latin American experience. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 51, p. 85–88, 2016.
- TOUMA, M. COVID-19: molecular diagnostics overview. **Journal of Molecular Medicine**, v. 98, n. 7, p. 947–954, 2020.
- TRIPATHI, N. K.; PRIYA, R.; SHRIVASTAVA, A. Production of recombinant Chikungunya virus envelope 2 protein in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 6, p. 2461–2471, 2014.
- TRIPATHI, N. K.; SHRIVASTAVA, A. Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, n. December, 2019.
- TSETSARKIN, K. A. et al. Multi-peaked adaptive landscape for chikungunya virus evolution predicts continued fitness optimization in *Aedes albopictus* mosquitoes. **Nature Communications**, v. 5, n. May, p. 1–14, 2014.
- VAN DEN DOEL, P. et al. Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara Expressing Glycoprotein E2 of Chikungunya Virus Protects AG129 Mice against Lethal Challenge. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, 2014.
- VAN DUIJL-RICHTER, M. K. S. et al. Early Events in Chikungunya Virus Infection-From Virus CellBinding to Membrane Fusion. **Viruses**, v. 7, n. 7, p. 3647–74, 2015.
- VAN OERS, M. M.; PIJLMAN, G. P.; VLAK, J. M. Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: From dark horse to mainstream technology. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 1, p. 6–23, 2015.
- VARKI, A.; GAGNEUX, P. Biological Functions of Glycans. In: VARKI A, CUMMINGS RD, E. J. (Ed.). . **Essentials of Glycobiology**. 3rd editio ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press., 2017.
- VERMA, P. et al. Analysis of antibody response (IgM, IgG, IgG3) to Chikungunya virus using panel of peptides derived from envelope protein for serodiagnosis. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 52, n. 2, p. 297–307, 2014.
- VOROU, R. Zika virus, vectors, reservoirs, amplifying hosts, and their potential to spread worldwide: what we know and what we should investigate urgently.

- International Journal of Infectious Diseases**, 2016.
- VOSS, J. E. et al. Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. **Nature**, v. 468, n. 7324, p. 709–712, 2010.
- WAHID, B. et al. Global expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 58, p. 69–76, 2017.
- WALDO, G. S. et al. Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. **Nat Biotech**, v. 17, n. 7, p. 691–695, jul. 1999.
- WANG, L. et al. Review of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) based on current evidence. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 55, n. 6, p. 105948, 2020.
- WHO. **World Health Organization Arboviruses and Human Disease**, 1967.
- WHO, W. H. O. **Countries and territories with current or previous Zika virus transmission**. Disponível em: <<https://www.who.int/emergencies/diseases/zika/countries-with-zika-and-vectors-table.pdf>>. Acesso em: 29 dez. 2020.
- WHO, W. H. O. **Listings of WHO's response to COVID-19**. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/29-06-2020-covid-timeline>>.
- WHO, W. H. O. **Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases**. Disponível em: <<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance-publications>>. Acesso em: 6 set. 2020b.
- WHO, W. H. O. **WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard**. Disponível em: <<https://covid19.who.int/>>.
- WOO, P. C. Y. et al. Detection of Specific Antibodies to Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Coronavirus Nucleocapsid Protein for Serodiagnosis of SARS Coronavirus Pneumonia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 2306–2309, 2004.
- WOO, P. C. Y.; ET AL. Relative rates of non-pneumonic sars coronavirus infection and SARS coronavirus pneumonia. **Infectious Diseases in Clinical Practice**, v. 12, n. 4, p. 275, 2004.
- WRAPP, D. et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. **Science**, v. 367, n. 6483, p. 1260–1263, 2020.
- WU, A. et al. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. **Cell Host and Microbe**, v. 27, n. 3, p. 325–328, 2020.
- XIA, J. et al. Evaluation of coronavirus in tears and conjunctival secretions of patients with SARS-CoV-2 infection. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 6, p. 589–594, 2020.
- XIAO, F. et al. Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. **Gastroenterology**, v. 158, n. 6, p. 1831- 1833.e3, 2020.
- XIONG, X. et al. A thermostable, closed SARS-CoV-2 spike protein trimer. **Nature Structural and Molecular Biology**, 2020.
- YANG, W. et al. A colloidal gold probe-based silver enhancement immunochromatographic assay for the rapid detection of abrin-a. **Biosensors & bioelectronics**, v. 26, n. 8, p. 3710–3713, abr. 2011.
- YATHI, K. K. et al. Recombinant CHIK virus E1 coat protein of 11KDa with antigenic domains for the detection of Chikungunya. **Journal of Immunological Methods**,

- v. 372, n. 1–2, p. 171–176, 2011.
- YU, L. et al. Delineating antibody recognition against Zika virus during natural infection. **Journal of Clinical Investigation**, v. 2, n. 12, p. 1–16, 2017.
- ZAINAH, S. et al. Performance of a commercial rapid dengue NS1 antigen immunochromatography test with reference to dengue NS1 antigen-capture ELISA. **Journal of Virological Methods**, v. 155, n. 2, p. 157–160, 2009.
- ZAMMARCHI, L. et al. Zika virus infection in a traveller returning to Europe from Brazil, March 2015. **Euro surveillance: bulletin Europ??en sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, v. 20, n. 23, p. 2014–2016, 2015.
- ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015.
- ZHANG, N. et al. Recent advances in the detection of respiratory virus infection in humans. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 4, p. 408–417, 2020a.
- ZHANG, P. et al. Evaluation of recombinant nucleocapsid and spike proteins for serological diagnosis of novel coronavirus disease 2019 (COVID-19). **medRxiv**, p. 1–28, 2020b.
- ZHAO J, YUAN Q, WANG H, ET AL. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis.* 2020;ciaa344. doi:10.1093/cid/ciaa344. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, n. 2020, p. 1–22, 2020.

RELAÇÃO DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA

❖ Artigos disponíveis

Bagno FF, Godoi LC, Figueiredo MM, Sérgio SAR, Moraes TFS, Salazar NC, Kim YC, Reyes-Sandoval A, da Fonseca FG. *Chikungunya E2 Protein Produced in E. coli and HEK293-T Cells—Comparison of Their Performances in ELISA*. **Viruses**. 2020 Aug 26;12(9):939. doi: 10.3390/v12090939. PMID: 32858804; PMCID: PMC7552038.



viruses



Article

Chikungunya E2 Protein Produced in *E. coli* and HEK293-T Cells—Comparison of Their Performances in ELISA

Flávia Fonseca Bagno ^{1,2}, Lara Carvalho Godói ^{1,3}, Maria Marta Figueiredo ¹, Sarah Aparecida Rodrigues Sérgio ¹, Thais de Fátima Silva Moraes ^{1,2}, Natália de Castro Salazar ¹, Young Chan Kim ⁴, Arturo Reyes-Sandoval ⁴ and Flávio Guimarães da Fonseca ^{1,2,*}

Bagno, FF; Godoi, LC; Salazar, N; Pereira, GC; Figueiredo, MM; Da Fonseca, FG. *Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Recombinant Protein Antigen for the Diagnosis of Chikungunya Virus*. **Data in Brief** v.25, p.104015 - 2019.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Data in brief

journal homepage: www.elsevier.com/locate/dib



Data Article

Development of an enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant protein antigen for the diagnosis of Chikungunya virus



Flávia Fonseca Bagno ^{a,b}, Lara Carvalho Godói ^{b,c}, Natália Salazar ^b, Glauco de Carvalho Pereira ^d, Maria Marta Figueiredo ^b, Flávio Guimarães da Fonseca ^{a,b,*}

Bagno, FF; Figueiredo, MM; Villarreal, J; Pereira, GC; Godoi, LC; Da Fonseca, FG. *Undetected Chikungunya virus co-infections in a Brazilian region presenting hyper-endemic circulation of dengue and Zika*. **Journal of Clinical Virology**, v.113, p.27 - 30, 2019.



Journal of Clinical Virology

Volume 113, April 2019, Pages 27-30



Short communication

Undetected Chikungunya virus co-infections in a Brazilian region presenting hyper-endemic circulation of Dengue and Zika

Flávia Fonseca Bagno ^{a, b}, Maria Marta Figueiredo ^b, Jannely Villarreal ^c, Glauco de Carvalho Pereira ^d, Lara Carvalho Godoi ^{b, e}, Flávio Guimarães da Fonseca ^{a, b}

Carvalho, A.F., Rocha, R.P., Gonçalves, A.P Silva, T.B. S. Sato, H.I, Vuitika, L. Bagno, F.F., Sérgio, S.R., Figueiredo, M.M., Martins, R.B., Souza J. Neto, E. A., Fernandes, A. P. S. M. Alves, P. A., Teixeira, M. R. S. da Fonseca, F.G. The use of denaturing solution as collection and transport media to improve SARS-CoV-2 RNA detection and reduce infection of laboratory personnel. *Braz J Microbiol.* 2021.

Brazilian Journal of Microbiology
<https://doi.org/10.1007/s42770-021-00469-4>



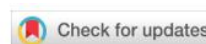
BACTERIAL, FUNGAL AND VIRUS MOLECULAR BIOLOGY - RESEARCH PAPER



The use of denaturing solution as collection and transport media to improve SARS-CoV-2 RNA detection and reduce infection of laboratory personnel








Alex F. Carvalho ¹ · Raissa P. Rocha ¹ · Andreza P. Gonçalves ^{1,2} · Thaís B. S. Silva ^{1,2} · Hugo I. Sato ¹ · Larissa Vuitika ¹ · Flavia F. Bagno ¹ · Sarah A. R. Sérgio ¹ · Maria M. Figueiredo ¹ · Ronaldo B. Martins ³ · Juliano P. Souza ³ · Eurico Arruda ³ · Ana P. S. M. Fernandes ¹ · Pedro A. Alves ^{1,2} · Santuza M. R. Teixeira ¹ · Flavio G. da Fonseca ¹

Loureiro, S; Porta, C; Maity, HK.; Perez, E; Bagno, FF; Kotecha, A; Fry, E; Ren, J; Stuart, DI.; Hoenemann, H; Serrano, A; Van Den Born, E; Charleston, B; Jones, I. M. *Universal detection of foot and mouth disease virus based on the conserved VP0 protein. Wellcome Open Research.*, v.3, p.88 -, 2018.



RESEARCH ARTICLE

Universal detection of foot and mouth disease virus based on the conserved VP0 protein [version 1; peer review: 3 approved with reservations, 1 not approved]

Silvia Loureiro¹, Claudine Porta², Hemanta K. Maity ¹, Eva Perez², Flavia F. Bagno ¹, Abhay Kotecha ³, Elizabeth Fry ³, Jingshan Ren ³, David I. Stuart ³, Holger Hoenemann⁴, Amaya Serrano ⁴, Erwin van den Born⁴, Bryan Charleston², Ian M. Jones ¹

¹Biological Sciences, University of Reading, Reading, Berkshire, RG6 6AJ, UK

²The Pirbright Institute, Woking, Surrey, GU24 0NF, UK

³Division of Structural Biology, The Wellcome Trust Centre for Human Genetics, University of Oxford, Oxford, Oxfordshire, OX3 7BN, UK

⁴MSD Animal Health, Boxmeer, 5831 AN, The Netherlands

❖ Artigo em Preparação

Development and validation of an enzyme-linked immunoassay kit for diagnosis and surveillance of COVID-19.

❖ Apresentações Orais

- "Fast-track development and validation of an enzyme-linked immunoassay kit for diagnosis and surveillance of COVID-19"- Menção honrosa pela participação no Prêmio Hélio Gelli Pereira- XXXI Congresso Brasileiro De Virologia & XV Encontro e Virologia do Mercosul. Novembro de 2020.
- "Desenvolvimento e validação de um kit para a detecção da COVID-19 e avaliação da resposta sorológica em indivíduos oligossintomáticos" - VII Simpósio de Microbiologia da UFMG. Outubro de 2020.
- "Produção heteróloga de proteínas estruturais dos vírus Zika e Chikungunya e avaliação de seu potencial para o uso em ferramentas diagnósticas" - Premiação

Melhor Dissertação do ano de 2018 do Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG. IV Simpósio de Microbiologia da UFMG. Outubro de 2019.

❖ Apresentação de Poster em Congresso

- Evaluation of a recombinant protein in ELISA and rapid test for diagnosis and surveillance of Chikungunya- IV FAMERP-UTMB: Emerging infections in the Americas.2020.
- Production and prototyping of an Enzyme-Linked Immunoassay for Diagnosis and Surveillance of Chikungunya- XXIX Congresso Brasileiro de Virologia, 2019.
- Do protótipo ao produto: Desenvolvimento de um kit de ELISA para detecção e sorovigilância de infecções pelo vírus Chikungunya- VII Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2019.
- Design and evaluation of recombinant chikungunya virus E1 and E2 envelope proteins for serodiagnosis of the infection. XXIX Congresso Brasileiro de Virologia. 2018.
- Desafios envolvendo o diagnóstico da Febre Chikungunya em regiões de co-circulação de Dengue e Zika - um estudo em Minas Gerais. V Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2018.

❖ Resumos publicados

- Bagno, FF; Figueiredo, MM; Godoi, LC; Da Fonseca, FG. Development of serologic tools for diagnosis and surveillance of Chikungunya. Meeting Report. *Microbiology society*.2019.
- Andreza Parreiras Gonçalves, Thaís Bárbara de Souza Silva, Alex F. Carvalho, Hugo I. Sato, Larissa Vuitika, Flavia Fonseca Bagno, *et al.*“The use of denaturing solution as collection and transport media to improve SARS-CoV-2 RNA detection and reduce infection of laboratory personnel”- XXXI Congresso Brasileiro de Virologia & XV Encontro de Virologia do Mercosul 2020.
- Sergio, S. A. R.; Bagno, F. F.; Moraes, T. F. S.; Fonseca, M. S. P. ; Da Fonseca, F. G. ; Godoi, L. C. “Production of a recombinant protein of zika virus in baculovirus expression system”. IV FAMERP-UTMB: Emerging infections in the Americas.2020.
- Sergio, S. A. R.; Bagno, F. F.; Moraes, T. F. S.; Fonseca, M. S. P.; Da Fonseca, F. G.; Godoi, L. C. “Geração De Um Bacmídeo Recombinante Contendo O Gene Da Proteína E Do Zika Vírus Para Expressão Em Sistema Baculovírus”. VII Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2019.

❖ Organização de eventos e Monitoria

- Curso: Edição de genomas utilizando a tecnologia CRISPR/Cas9 (Organização e monitoria prática, carga horária: 40h), CT-Vacinas, BHTec. 2019.
- Curso: Clonagem, produção e análise de proteínas recombinantes para testes de vacinas e diagnóstico (Organização e monitoria prática, carga horária: 40h), CT-Vacinas, BHTec, 2018.
- IV Simpósio de Microbiologia da UFMG Professor Eduardo Osório Cisalpino: Desafios Atuais no Enfrentamento de Doenças Microbianas. 2018.

❖ Atividades de divulgação científica

- Exposição CT-Vacinas na 17ª Semana Nacional de Ciência e Tecnologia (Dezembro de 2020).
- Site Capes: Pesquisa testa moléculas para vacina da COVID-19 Disponível em: <https://www.gov.br/capes/pt-br/assuntos/noticias/pesquisa-testa-moleculas-para-vacina-da-covid-19> Publicado em 23/06/2020
- Pesquisa e Desenvolvimento em uma instituição pública. Disciplina de Prática Profissional I- Curso Técnico em Biotecnologia Coltec-UFMG. Palestras ministradas nos anos de 2019,2020 e 2021.

❖ Cursos de curta duração

- Treinamento operacional do equipamento Luminoskan- Thermo Fisher Scientific (Carga horária: 12h) On-line, 2021.
- Treinamento Boas práticas laboratoriais (BPL) (Carga horária: 16h) BHTec, 2019.
- São Paulo School of Advanced Sciences on Vaccines (Carga horária: 90h). Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, São Paulo, Brasil. 2018.

APÊNDICE A-SEQUÊNCIAS DOS GENES CHIKV-E2 E ZIKV-E E MAPA DOS PLASMÍDEOS PARA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS EM *E.coli*

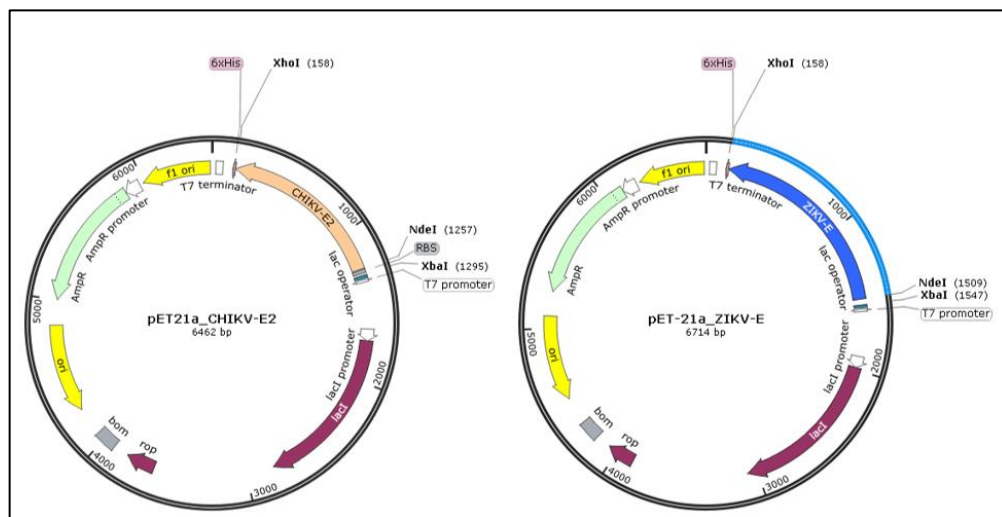
Sítio *NdeI* e Sítio *XhoI*

CHIKV-E2

ATATGAGCATCAAGGATCACTTCAACGTTTATAAAGCGACCCGTCCTGATCTGGCGCACTGCCCGGACTGCGGTGAAGGTC ATAGCTGCCACAGCCCGTTGCGCTGGAGCGTATCCGTAACGAAGCGACCGATGGCACCCCTGAAGATTCAGGTGAGCCTG CAAATCGGCATTAAGACCGACGATAGCCACGACTGGACCAAACCTGCGTTACATGGACAACCACATGCCGGCGGATGCGGA GCGTGCGGGTCTGTTTGTTCGTACCAGCGCGCCGTGCACCATCACCGGTACGATGGGTCACTTCATTCTGGCGGTTGCC CGAAGGGCGAAACCCTGACCGTTGGTTTTACCAGTGGCCGTAAAATCAGCCACAGCTGCACCCACCCGTTCCACCATGAC CCGCCGGTGATTGGTCTGTGAGAAATTTACAGCCGTCCGCAGCATGGTCTGAACTGCCGTGCAGCACCTATGCGCAAAG CACC CGCGGACCCGCGGAGGAAATCGAAGTTACATGCCGCCAGACACCCCGGATCGTACCCTGATGAGCCAGCAAAGC GGTAACGTGAAGATTACCGTTAACAGCCAGACCGTGCCTTACAATGCAACTGCGGTGACAGCAGCAGGGCCTGACCAC CACCGATAAGGTGATCAACAACCTGCAAAGTTGACCAGTGCCACGCGGGTGACCAACCACAAGAAATGGCAATATAACAG CCCGCTGGTTCGCGTAACCGCGAGTTCGGTGATCGTAAGGGCAAAGTGCACATCCCGTTTCCGCTGGCGAACGTGACCT GCCGTGTTCCGAAGGCGCGTAACCCGACCGTGACCTACGGTAAAAACCAGTTATTATGCTGCTGTATCCGGACCACCCG ACCCTGCTGAGCTACCGTAACATGGGCGAGGAAACCGAATCAAGAGGAATGGGTTACCCACAAGAAAGAGATTCTGCT GACCGTGCCGACCGAGGTTCTGGAAGTTACCTGGGCAACAACGAAACCGTATAAGTACTGCCCGCAACTGAGCACCAACG GCACCGCGCACGGCCACCCGACGAGATCATTCTGTACTATTACGAAGTGTACCCG**CTCGAG**

ZIKV-E

CATATGATCCGTTGCATTGGTGTGAGCAACCGTGACTTCGTTGAGGGCATGAGCGGTGGCACCTGGGTGGATGTGGTTCT GGAACACGGTGGCTGCGTTACCGTGATGGCGCAGGACAAGCCGACCGTGGATATCGAGCTGGTGACCACCACCGTTAGC AACATGGCGGAAGTGCCTAGCTACTGCTATGAAGCGAGCATTAGCGACATGGCGAGCGATAGCCGTTGCCCGACCCAAGG TGAAGCGTACCTGGACAAGCAGAGCGATACCCAATATGTGTGCAAACGTACCCTGGTTGACCGTGGTTGGGGCAACGGTT GCGGCCTGTTCCGCAAGGGCAGCCTGGTTACCTGCGCGAAATTTGCGTGCAGCAAGAAAATGACCGGCAAGAGCATCCAG CCGGAGAACCTGGAATACCGTATTATGCTGAGCGTGACCGGTAGCCAACACAGCGGCATGATCGTTAACGACCCGGCCA CGAGACCGATGAAAACCGTGCAGAAAGTGGAGATTACCCCGAACAGCCCGCGTGCAGGAAACCGTGGTGGCTTCGGT AGCCTGGGCTGGACTGCGAGCCGCGTACCGGTCTGGACTTTAGCGATCTGTACTATCTGACCATGAACAACAAGCACTG GCTGGTTCACAAGAATGGTTCACGACATCCCGCTGCCGTGGCATGCGGGTGCAGGATACCGGTACCCCGCACTGGAACA ACAAGAGGGCGCTGGTTGAGTTTAAGGATGCGCACGCGAAACGTGAGACCGTGGTTGTGCTGGGTAGCCAAGAGGGCGC GGTTACACAGCCGCTGGCGGGTGCCTGGAGGGGAAATGAGATGGTGCGAAGGGCCGCTGAGCAGCGGTACCTGAA ATGCCGTCTGAAGATGGATAAACTGCGTCTGAAGGGCGTGAGCTACAGCCTGTGCACCGCGGCGTTCACCTTTACAAAAT TCCGGCGGAGACCCTGCATGGTACCGTTACCGTGGAAGTTCAGTATGCGGGTACCGATGGTCCGTGCAAGGTGCCGGC GAGATGGCGGTTGATATGCAAACCCTGACCCCGTGGGTGCTGTGATCACCGCCAACCCTGTTATTACCGAGAGCACCGA AACACAGCAAAATGATGCTGGAGCTGGACCCGCCGTTTGGCGATAGCTATATCGTGATTGGTGTGGCGAAAAGAAAATCAC CCACCCTGGCAGCGGTAGCAGCATTGGCAAGGCGTTTGAAGCGACCGTGCCTGGTGGCGAAAACGTATGGCGGTT CTGGGTGACACCGCGTGGGATTTTGGCAGCGTTGGTGGCGCGCTGAACAGCCTGGGCAAGGGCATCCACCAAAT**CTCC AG**



APÊNDICE B- SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA O PREPARO E ANÁLISE DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

❖ MEIOS DE CULTIVO

Meio de cultivo LB

- Triptona 10g/L
- Extrato de levedura 5g/L
- NaCl 5g/L

Meio de cultivo LB Agar

- Triptona 10g/L
- Extrato de levedura 5g/L
- NaCl 5g/L
- Ágar 15g/L

❖ SOLUÇÕES PARA GEL DE AGAROSE

Tampão de amostra de DNA 4X

- Bromofenol blue 0,25%
- Xileno cianol 0,25%
- Glicerol 30%

TAE (Tris-Acetato-EDTA) 50X

- Tris base 242 g/L
- Ácido acético glacial (CH₃COOH) 5,7%
- EDTA 0,5M (pH 8,0)10%

❖ SOLUÇÕES PARA GEL DE POLIACRILAMIDA

Tampão Tris-HCl 1,5mM -pH 8,8

- Tris 182 g/L
- SDS 4g/L

Tampão Tris-HCl 0,5mM - pH6,8

- Tris 60 g/L
- SDS 4g/L

Gel de separação 1,5 mm (12,5%)

- H₂O destilada 2,6 mL
- 1,5M Tris-HCl pH 8,8 + SDS 0,4 % 1,5 mL
- Acrilamida/Bis 40% 1,9 mL
- Persulfato de amônio (APS) 10% 0,03 mL
- TEMED 0,003 mL

Gel de empilhamento 1,5 mm (4%)

- H₂O destilada 1,3 mL
- 0,5M Tris-HCl pH 6,8 + SDS 0,4 % 0,5 mL
- Acrilamida/Bis 40% 0,2 mL
- Persulfato de amônio (APS) 10% 0,01 mL
- TEMED 0,002 mL
- Volume total 2 mL

Tampão de amostra de proteína 4X

- Tris-HCl 200 mM pH 6,8
- SDS 10%
- Azul de bromofenol 0,05%
- Glicerol 20%
- β -mercaptoetanol 8%

Tampão de corrida

- Tris 0,25M
- Glicina 1,9M
- SDS 1%

Azul de Coomassie

- Azul de Coomassie 1g/L
- Etanol 45%
- Ácido acético 10%

Solução descorante

- Etanol 10%
- Ácido acético 7%

❖ SOLUÇÕES PARA PURIFICAÇÃO

Tampão de lise

- Tris-HCl 20 mM
 - NaCl 100 mM
 - DTT 5 Mm
 - Benzamidina 5 Mm
 - PMSF 1mM
- pH 7,4

Tampão de ligação (Tampão A)

- NaH₂PO₄ 20 mM
 - NaCl 500 mM
 - Imidazol 30 mM
 - Ureia de acordo com o teste de solubilidade
- pH 7,4

Tampão de eluição (Tampão B)

- NaH₂PO₄ 20 mM
 - NaCl 500 mM
 - Imidazol 500 mM
 - Ureia de acordo com o teste de solubilidade
- pH 7,4

❖ SOLUÇÕES PARA WESTERN BLOT

Tampão de transferência

- Tris 15,15g/L
- Glicina 72g/L
- Etanol 20%

Solução de lavagem TBS-T

- TBS 1X (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM)
 - Tween-20 0,1%
- pH 7,5

Solução de bloqueio

Leite em pó 5% (p/v) em TTBS 1X

APÊNDICE C- SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA ELISA

Etapa 1: Sensibilização

- Carbonato de sódio 15 mM
- Bicarbonato de sódio 85 mM

pH 9,6

Etapa 2: Bloqueio

- Sacarose 10 %p/v
- Cloreto de sódio 150 mM
- Albumina bovina 1%p/v

pH 7,4

Etapa 3: Diluente de Amostra

- Fosfato de sódio dibásico anidro PA 100mM
- Fosfato de potássio monobásico anidro 17mM
- Cloreto de sódio 150mM
- Cloreto de potássio PA28mM
- Albumina bovina 1%
- Sacarose 2%
- D-manitol 1%
- Solução BND 50% p/v em DMSO 0,04 %v/v
- Tween 800,05% v/v

pH 7,4

Etapa 4: Tampão de lavagem 10X

- Fosfato de sódio dibásico anidro PA100 mM
- Fosfato de potássio monobásico anidro 18 mM
- Cloreto de sódio 1500 mM
- Cloreto de potássio PA 28mM
- Proclin 0,1 %v/v
- Tween 201 %v/v

pH 7,4

Etapa 5: Conjugado

- Horseradish Peroxidase Diluent MOSS, Inc HRPD
- Protein Conjugate FAPON Biotech Inc BEEIGGI201- Lote 20160307 (1:5000)

Etapa 6: Substrato

TMB Ultra Sensitive Substrate 2.08 mMol - Código #TMBUS - MOSS, Inc

Etapa 7: Solução de Parada

Ácido sulfúrico 0,5 M

APÊDICE D: COMPARAÇÃO DE DESEMPENHO DOS TESTES DE ELISA PARA CHIKV¹⁷

Grupo	Paciente	Amostra	Diagnóstico FUNED	Testes FUNED		IgM			IgG		
				CHIKV- IgM	CHIKV-IgG	Comercial	HEK-293	E. coli	Comercial	HEK-293	E. coli
G1	1	4612	CHIKV	POS	-	5,0	3,9	3,2	2,4	3,7	0,9
G1	2	4613	CHIKV	POS	-	4,9	4,0	nt	4,1	8,9	7,0
G1	3	4617	CHIKV	POS	-	5,0	6,0	1,1	1,1	3,0	1,4
G1	4	4625	CHIKV	POS	-	4,9	3,6	2,2	2,2	3,8	1,0
G1	5	4638	CHIKV	POS	-	4,8	4,3	2,1	4,5	11,1	2,5
G1	6	4641	CHIKV	POS	-	5,4	2,3	1,2	4,4	9,0	2,7
G1	7	4642	CHIKV	POS	-	5,6	8,6	nt	4,3	1,8	1,7
G1	8	4708	CHIKV	POS	-	5,2	4,5	3,9	2,8	5,9	1,1
G1	9	4735	CHIKV	POS	-	5,4	8,7	3,7	1,3	6,7	9,3
G1	10	4781	CHIKV	POS	-	3,0	1,1	nt	6,8	10,5	4,7
G1	11	4795	CHIKV	POS	-	5,5	4,7	3,4	3,6	8,4	6,5
G1	12	4833	CHIKV	POS	-	5,1	6,6	2,9	3,5	9,4	1,5
G1	13	4843	CHIKV	POS	-	4,7	2,3	nt	3,8	8,7	3,9
G1	14	4844	CHIKV	POS	-	4,2	4,6	2,4	2,8	5,1	0,6
G1	15	4913	CHIKV	POS	-	3,6	1,0	1,0	2,5	8,9	3,2
G1	16	4916	CHIKV	POS	-	4,6	6,8	10,6	2,2	4,1	2,3
G1	17	4984	CHIKV	POS	-	5,1	6,1	2,2	4,3	8,2	1,5
G1	18	4997	CHIKV	POS	-	4,7	2,2	3,7	1,4	3,2	1,7
G1	19	5008	CHIKV	POS	-	1,2	0,5	1,0	0,3	0,5	1,5
G1	20	5021	CHIKV	POS	-	4,9	3,1	1,6	2,2	2,6	2,0
G1	21	5022	CHIKV	POS	-	4,9	3,3	4,0	3,1	6,2	2,3
G1	22	5026	CHIKV	POS	-	5,0	6,9	4,5	1,8	8,7	1,4
G1	23	5031	CHIKV	POS	-	5,0	1,0	1,1	4,6	8,6	1,6
G1	24	5059	CHIKV	POS	-	4,4	2,9	1,0	2,2	3,5	1,6
G1	25	5063	CHIKV	POS	-	3,0	1,1	0,6	1,9	0,9	2,0
G2	26	5095	CHIKV	POS	POS	5,3	2,8	nt	4,8	8,2	1,4
G2	27	4567	CHIKV	POS	POS	3,9	2,3	2,0	2,2	12,5	4,8
G2	28	4586	CHIKV	POS	POS	2,1	1,0	1,2	2,6	10,7	3,0
G2	29	4589	CHIKV	POS	POS	0,9	7,4	0,8	2,5	12,6	5,4
G2	30	4592	CHIKV	POS	POS	1,1	3,9	2,5	2,6	12,9	7,4
G2	31	4598	CHIKV	POS	POS	0,7	1,4	2,0	2,6	9,3	3,6
G2	32	4601	CHIKV	POS	POS	3,5	3,2	nt	2,3	9,7	1,5

¹⁷Verde: resultado não reagente ($I < 0,8$), branco: indeterminado ($0,8 \leq I < 1,1$), vermelho: reagente ($I > 1,1$). Os índices estão arredondados, podendo apresentar classificações diferentes (cor) e o mesmo valor numérico exibido. O índice depende do cut-off obtido para cada antígeno, de forma que absorbâncias similares para diferentes antígenos podem resultar numa classificação diferente pelo índice. nt: amostra não testada.

APÊDICE D- COMPARAÇÃO DE DESEMPENHO DOS TESTES DE ELISA PARA CHIKV-Cont.

Grupo	Paciente	Amostra	Diagnóstico	Testes FUNED		IgM			IgG		
				CHIKV- IgM	CHIKV-IgG	Comercial	HEK-293	<i>E. coli</i>	Comercial	HEK-293	<i>E. coli</i>
G2	33	4606	CHIKV	POS	POS	2,0	2,4	1,6	5,6	12,0	4,7
G2	34	4607	CHIKV	POS	POS	2,8	0,9	1,1	2,5	11,3	5,8
G2	35	4610	CHIKV	POS	POS	3,1	1,4	nt	2,5	12,8	7,1
G2	36	4615	CHIKV	POS	POS	5,4	6,5	nt	1,8	12,4	2,3
G2	37	4629	CHIKV	POS	POS	5,2	4,5	3,4	2,3	11,8	4,0
G2	38	4651	CHIKV	POS	POS	4,2	1,0	0,8	2,4	11,6	5,1
G2	39	4696	CHIKV	POS	POS	2,6	8,1	5,3	2,2	9,8	6,2
G2	40	4777	CHIKV	POS	POS	4,3	6,6	2,1	2,4	12,1	5,9
G2	41	4801	CHIKV	POS	POS	3,4	5,3	2,2	2,5	10,5	2,9
G2	42	4810	CHIKV	POS	POS	4,7	4,3	2,5	1,9	9,2	2,5
G2	43	4814	CHIKV	POS	POS	4,4	2,1	1,5	2,5	11,1	4,7
G2	44	4822	CHIKV	POS	POS	4,9	5,9	2,4	2,0	7,9	1,1
G2	45	4823	CHIKV	POS	POS	3,9	1,1	0,9	2,6	11,4	4,5
G2	46	4829	CHIKV	POS	POS	5,2	1,4	1,9	2,5	10,2	3,1
G2	47	4837	CHIKV	POS	POS	4,4	1,4	2,4	2,3	6,3	1,1
G2	48	4838	CHIKV	POS	POS	5,4	2,8	0,9	2,3	7,4	1,6
G2	49	4840	CHIKV	POS	POS	5,0	1,1	2,1	2,5	9,9	2,6
G2	50	4845	CHIKV	POS	POS	5,2	2,4	0,2	2,2	10,6	2,7
G2	51	4907	CHIKV	POS	POS	4,4	2,0	2,3	1,6	3,9	1,8
G2	52	4908	CHIKV	POS	POS	4,4	2,2	1,8	5,9	10,9	7,4
G2	53	4909	CHIKV	POS	POS	4,4	1,2	0,9	5,3	9,4	1,8
G2	54	4983	CHIKV	POS	POS	4,9	8,7	4,1	2,2	8,4	1,1
G2	55	5048	CHIKV	POS	POS	4,6	0,6	4,0	2,5	10,1	3,2
G2	56	5050	CHIKV	POS	POS	0,4	0,8	0,9	0,2	0,7	1,3
G2	57	5054	CHIKV	POS	POS	4,5	1,4	1,9	5,4	9,4	3,8
G2	58	5075	CHIKV	POS	POS	0,8	0,3	1,4	6,2	6,8	2,4
G2	59	5090	CHIKV	POS	POS	5,1	2,5	1,5	4,4	8,3	10,7
G3	60	4561	CHIKV	NEG	POS	0,9	0,7	1,0	2,6	13,4	9,0
G3	61	4568	CHIKV	NEG	POS	1,0	5,1	0,8	2,5	13,3	8,6
G3	62	4576	CHIKV	NEG	POS	0,2	0,4	0,6	0,5	0,5	0,6
G3	63	4584	CHIKV	IND	POS	0,7	2,1	1,7	2,6	13,3	11,6
G3	64	4591	CHIKV	NEG	POS	0,3	0,5	1,6	2,8	12,9	4,0
G3	65	4600	CHIKV	IND	POS	1,4	2,2	1,0	2,7	12,6	5,6
G3	66	4603	CHIKV	IND	POS	3,3	1,1	1,0	2,4	12,8	10,6
G3	67	4668	CHIKV	NEG	POS	0,2	0,4	0,8	0,4	0,4	0,7
G3	68	4700	CHIKV	NEG	POS	1,1	0,8	0,6	2,7	13,1	10,4
G3	69	4766	CHIKV	NEG	POS	1,3	0,7	nt	2,7	12,9	10,8
G3	70	4956	CHIKV	NEG	POS	0,9	0,4	1,0	2,7	9,2	4,5
G3	71	5046	CHIKV	NEG	POS	1,8	0,6	0,7	2,9	12,2	7,9
G3	72	5047	CHIKV	IND	POS	4,0	1,6	1,6	3,1	12,6	8,8
G3	73	5074	CHIKV	NEG	POS	0,4	0,4	nt	2,9	11,0	10,0
G3	74	5078	CHIKV	IND	POS	0,6	0,7	1,3	2,7	10,6	4,9

APÊNDICE E-DADOS DA ANÁLISE DE DESEMPENHO DO KIT DE ELISA PARA CHIKV (utilizando proteína A-HRP como conjugado)

ID	Positivas		curva ROC		M _{neg} +3DP		(C ⁺)* DP+ M _{neg}	
	Abs	I (co=0,407)	I (co=0,407)	I (co=0,506)	I (co=0,427)	I (co=0,427)	I (co=0,427)	I (co=0,427)
4561	2,501	6,1	6,1	4,9	5,9	5,9	5,9	5,9
4567	1,646	4,0	4,0	3,3	3,9	3,9	3,9	3,9
4586	0,840	2,1	2,1	1,7	2,0	2,0	2,0	2,0
4589	1,609	4,0	4,0	3,2	3,8	3,8	3,8	3,8
4591	1,099	2,7	2,7	2,2	2,6	2,6	2,6	2,6
4592	1,859	4,6	4,6	3,7	4,4	4,4	4,4	4,4
4598	0,952	2,3	2,3	1,9	2,2	2,2	2,2	2,2
4600	1,401	3,4	3,4	2,8	3,3	3,3	3,3	3,3
4601	0,483	1,2	1,2	1,0	1,1	1,1	1,1	1,1
4606	1,299	3,2	3,2	2,6	3,0	3,0	3,0	3,0
4607	1,617	4,0	4,0	3,2	3,8	3,8	3,8	3,8
4610	2,074	5,1	5,1	4,1	4,9	4,9	4,9	4,9
4613	2,497	6,1	6,1	4,9	5,8	5,8	5,8	5,8
4615	0,808	2,0	2,0	1,6	1,9	1,9	1,9	1,9
4617	0,692	1,7	1,7	1,4	1,6	1,6	1,6	1,6
4629	1,341	3,3	3,3	2,7	3,1	3,1	3,1	3,1
4638	0,923	2,3	2,3	1,8	2,2	2,2	2,2	2,2
4641	1,173	2,9	2,9	2,3	2,7	2,7	2,7	2,7
4642	0,665	1,6	1,6	1,3	1,6	1,6	1,6	1,6
4696	1,605	3,9	3,9	3,2	3,8	3,8	3,8	3,8
4700	2,649	6,5	6,5	5,2	6,2	6,2	6,2	6,2
4735	2,408	5,9	5,9	4,8	5,6	5,6	5,6	5,6
4766	2,274	5,6	5,6	4,5	5,3	5,3	5,3	5,3
4777	1,524	3,7	3,7	3,0	3,6	3,6	3,6	3,6
4781	1,586	3,9	3,9	3,1	3,7	3,7	3,7	3,7
4795	2,847	7,0	7,0	5,6	6,7	6,7	6,7	6,7
4801	1,012	2,5	2,5	2,0	2,4	2,4	2,4	2,4
4810	0,802	2,0	2,0	1,6	1,9	1,9	1,9	1,9
4814	1,094	2,7	2,7	2,2	2,6	2,6	2,6	2,6
4829	0,788	1,9	1,9	1,6	1,8	1,8	1,8	1,8
4840	0,832	2,0	2,0	1,6	1,9	1,9	1,9	1,9
4845	0,740	1,8	1,8	1,5	1,7	1,7	1,7	1,7
4908	2,097	5,2	5,2	4,1	4,9	4,9	4,9	4,9
4909	0,788	1,9	1,9	1,6	1,8	1,8	1,8	1,8
4913	1,219	3,0	3,0	2,4	2,9	2,9	2,9	2,9
4916	0,802	2,0	2,0	1,6	1,9	1,9	1,9	1,9
4956	1,215	3,0	3,0	2,4	2,8	2,8	2,8	2,8
4997	0,437	1,1	1,1	0,9	1,0	1,0	1,0	1,0
5021	0,826	2,0	2,0	1,6	1,9	1,9	1,9	1,9
5022	0,796	2,0	2,0	1,6	1,9	1,9	1,9	1,9
5046	2,276	5,6	5,6	4,5	5,3	5,3	5,3	5,3
5047	2,144	5,3	5,3	4,2	5,0	5,0	5,0	5,0
5048	1,040	2,6	2,6	2,1	2,4	2,4	2,4	2,4
5054	1,643	4,0	4,0	3,2	3,8	3,8	3,8	3,8
5059	0,542	1,3	1,3	1,1	1,3	1,3	1,3	1,3
5063	1,083	2,7	2,7	2,1	2,5	2,5	2,5	2,5
5074	1,677	4,1	4,1	3,3	3,9	3,9	3,9	3,9
5075	0,684	1,7	1,7	1,4	1,6	1,6	1,6	1,6
5078	1,086	2,7	2,7	2,1	2,5	2,5	2,5	2,5
5090	3,024	7,4	7,4	6,0	7,1	7,1	7,1	7,1

Abs=absorbância 450 nm

M_{neg}= média das absorbâncias das amostras negativas

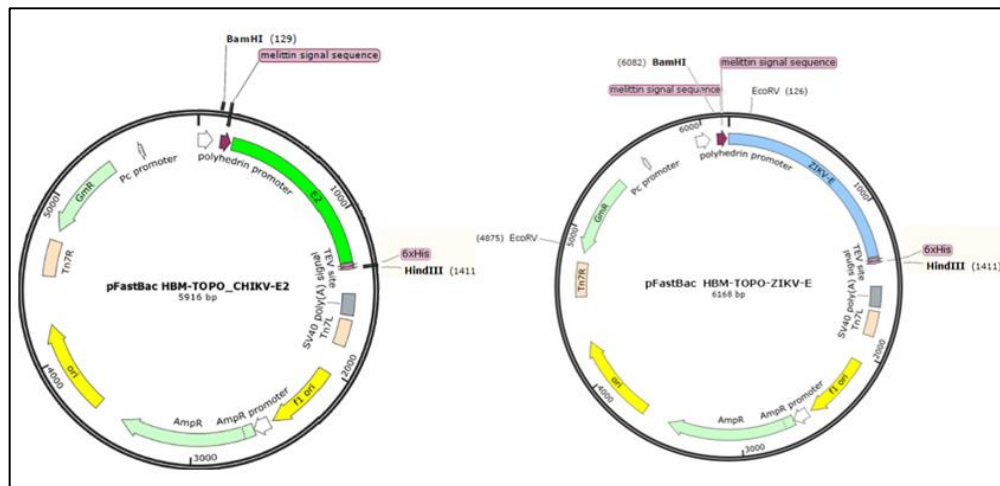
C⁺= controle positivo

DP= Desvio Padrão das amostras negativas

co=cut-off

Negativas		curva ROC	M _{neg} +3DP	(C ⁺)* DP+ M _{neg}
ID	Abs	I (co=0,407)	I(co=0,506)	I (co=0,427)
16	0,164	0,4	0,3	0,4
336	0,148	0,4	0,3	0,3
349	0,212	0,5	0,4	0,5
352	0,253	0,6	0,5	0,6
357	0,608	1,5	1,2	1,4
362	0,097	0,2	0,2	0,2
438	0,151	0,4	0,3	0,4
439	0,154	0,4	0,3	0,4
440	0,135	0,3	0,3	0,3
441	0,142	0,3	0,3	0,3
442	0,240	0,6	0,5	0,6
443	0,204	0,5	0,4	0,5
444	0,157	0,4	0,3	0,4
446	0,106	0,3	0,2	0,2
447	0,173	0,4	0,3	0,4
448	0,130	0,3	0,3	0,3
449	0,202	0,5	0,4	0,5
450	0,131	0,3	0,3	0,3
451	0,112	0,3	0,2	0,3
452	0,142	0,3	0,3	0,3
454	0,290	0,7	0,6	0,7
456	0,113	0,3	0,2	0,3
457	0,098	0,2	0,2	0,2
467	0,120	0,3	0,2	0,3
469	0,171	0,4	0,3	0,4
470	0,179	0,4	0,4	0,4
471	0,188	0,5	0,4	0,4
476	0,594	1,5	1,2	1,4
536	0,104	0,3	0,2	0,2
538	0,127	0,3	0,3	0,3
543	0,151	0,4	0,3	0,4
556	0,131	0,3	0,3	0,3
563	0,114	0,3	0,2	0,3
566	0,147	0,4	0,3	0,3
572	0,150	0,4	0,3	0,4
576	0,163	0,4	0,3	0,4
577	0,140	0,3	0,3	0,3
580	0,231	0,6	0,5	0,5
586	0,210	0,5	0,4	0,5
A24	0,169	0,4	0,3	0,4
AFC	0,377	0,9	0,7	0,9
B5S	0,282	0,7	0,6	0,7
BCR	0,117	0,3	0,2	0,3
C18S	0,170	0,4	0,3	0,4
CMS	0,105	0,3	0,2	0,2
FFB	0,246	0,6	0,5	0,6
GABC	0,279	0,7	0,6	0,7
GMF	0,206	0,5	0,4	0,5
HS	0,200	0,5	0,4	0,5
J23	0,221	0,5	0,4	0,5
L8P	0,375	0,9	0,7	0,9
LMN	0,142	0,3	0,3	0,3
M12P	0,332	0,8	0,7	0,8
MMF	0,159	0,4	0,3	0,4
DP	0,100			
M _{neg}	0,194			

APÊNDICE F - PLASMÍDEOS CONSTRUÍDOS PARA EXPRESSÃO DOS GENES EM SISTEMA BACULOVÍRUS E LISTA DE INICIADORES UTILIZADOS



Iniciador	Sequência
CHIKV-E2(F)	5'-AGCATCAAGGATCACTTCAA-3'
CHIKV-E2(R)	5'-CGGGTACAGTTCGTAATAGT-3'
ZIKV-E(F)	5'- ATCCGTTGCATTGGTGTGAG-3'
ZIKV-E(R)	5'- AATTTGGTGGATGCCCTTGC-3'
Polyhedrin(F)	5'-AAATGATAACCATCTCGC-3'
SV40 polyA(R)	5'-GGTATGGCTGATTATGATC-3'
pUC/M13(F)	5'-CCCAGTCACGACGTTGAAAACG-3'
pUC/M13(R)	5-AGCGGATAACAATTCACACAGG-3'

**APÊNDICE G- DADOS DO TESTE DE ESPECIFICIDADE
ANALÍTICA/INTERFERENTES DO ELISA PARA CHIKV**

ID	Classificação	CHIKV (IgG)	CHIKV(IgM)	DENV (IgG)	ZIKV (IgG)	CHIKV-CT (I)
4561	CHIKV	POS	POS	NEG	NEG	4,9
4567	CHIKV	POS	POS	NEG	NEG	3,3
4586	CHIKV	POS	POS	NEG	NEG	1,7
4589	CHIKV	POS	IND	NEG	NEG	3,2
4591	CHIKV	POS	POS	NEG	NEG	2,2
4592	CHIKV	POS	NEG	NEG	NEG	3,7
4598	CHIKV	POS	NEG	NEG	NEG	1,9
4600	CHIKV	POS	IND	NEG	NEG	2,8
16	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	0,3
123	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	0,4
124	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	0,3
128	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	0,7
136	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	0,3
163	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	0,7
185	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	0,3
234	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	0,3
006/17	DENV	NEG	NEG	POS	-	0,3
171/17	DENV	NEG	NEG	POS	-	0,2
175/17	DENV	NEG	NEG	POS	-	0,5
330/17	DENV	NEG	NEG	POS	-	0,6
358/17	DENV	NEG	NEG	POS	-	0,2
417/17	DENV	NEG	NEG	POS	-	0,3
534/17	DENV	NEG	NEG	POS	-	0,2
545/17	DENV	NEG	NEG	POS	-	0,2
51	ZIKV	NEG	NEG	NEG	POS	0,2
52	ZIKV	NEG	NEG	NEG	POS	0,2
83	ZIKV	NEG	NEG	NEG	POS	0,2
85	ZIKV	NEG	NEG	NEG	POS	0,2
86	ZIKV	NEG	NEG	NEG	POS	0,3
93533	RF	NEG	-	-	-	0,3
93076	RF	NEG	-	-	-	0,4
10004	RF	NEG	-	-	-	0,3
EGS	RF	NEG	-	-	-	0,2
MAA	RF	NEG	-	-	-	0,5
AB	RF	NEG	-	-	-	0,3
CMP	RF	NEG	-	-	-	0,5
MF	RF	NEG	-	-	-	0,3
IMF	RF	NEG	-	-	-	0,5

I=Índice, verde: amostras não reagentes, branco: amostras indeterminadas, vermelho: amostras reagentes.

APÊNDICE H -ANÁLISE DE DESEMPENHO DAS PROTEÍNAS N, S1(F) E S EM ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-SARS-CoV-2

Negativas											
	OD IgG						Índice IgG				
	N	S1 (F)	S	N+S1(F)	N+S		N	S1 (F)	S	N+S1(F)	N+S
SCT01	0,181	0,091	0,076	0,176	0,177	SCT01	0,5	0,2	0,2	0,5	0,5
SCT02	0,141	0,078	0,066	0,131	0,113	SCT02	0,4	0,2	0,1	0,4	0,3
SCT04	0,216	0,172	0,079	0,219	0,153	SCT04	0,6	0,4	0,2	0,6	0,4
SCT05	0,177	0,085	0,439	0,154	0,158	SCT05	0,5	0,2	0,9	0,4	0,5
SCT06	0,098	0,069	0,074	0,090	0,109	SCT06	0,3	0,2	0,1	0,2	0,3
SCT07	0,129	0,098	0,074	0,134	0,125	SCT07	0,3	0,2	0,1	0,4	0,4
SCT09	0,145	0,080	0,437	0,123	0,185	SCT09	0,4	0,2	0,9	0,3	0,5
SCT10	0,212	0,090	0,084	0,114	0,113	SCT10	0,5	0,2	0,2	0,3	0,3
SCT13	0,139	0,094	0,111	0,123	0,137	SCT13	0,4	0,2	0,2	0,3	0,4
SCT14	0,176	0,278	0,093	0,163	0,143	SCT14	0,5	0,7	0,2	0,4	0,4
SCT15	0,105	0,082	0,085	0,103	0,102	SCT15	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3
SCT17	0,162	0,104	0,086	0,113	0,134	SCT17	0,4	0,2	0,2	0,3	0,4
SCT18	0,089	0,067	0,158	0,074	0,142	SCT18	0,2	0,2	0,3	0,2	0,4
SCT19	0,346	0,110	0,061	0,297	0,234	SCT19	0,9	0,3	0,1	0,8	0,7
SCT11	0,219	0,131	0,072	0,192	0,156	SCT11	0,6	0,3	0,1	0,5	0,4
SCT22	0,254	0,135	0,118	0,233	0,190	SCT22	0,7	0,3	0,2	0,6	0,5
SCT29	0,104	0,089	0,108	0,105	0,100	SCT29	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3
SCT30	0,127	0,125	0,218	0,112	0,203	SCT30	0,3	0,3	0,4	0,3	0,6
SCT33	0,096	0,072	0,061	0,077	0,073	SCT33	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2
SCT34	0,144	0,076	0,076	0,098	0,093	SCT34	0,4	0,2	0,2	0,3	0,3
SCT35	0,278	0,083	0,059	0,233	0,184	SCT35	0,7	0,2	0,1	0,6	0,5
SCT36	0,175	0,073	0,067	0,153	0,143	SCT36	0,5	0,2	0,1	0,4	0,4
MCT1	0,103	0,094	0,055	0,080	0,075	MCT1	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2
MCT2	0,241	0,486	0,715	0,328	0,473	MCT2	0,6	1,1	1,4	0,9	1,4
MCT3	0,103	0,559	0,081	0,108	0,084	MCT3	0,3	1,3	0,2	0,3	0,2
MCT4	0,111	0,073	0,071	0,103	0,099	MCT4	0,3	0,2	0,1	0,3	0,3
LPV 10	0,222	0,072	0,067	0,202	0,146	LPV 10	0,6	0,2	0,1	0,6	0,4
LPV 12	0,206	0,080	0,058	0,142	0,137	LPV 12	0,5	0,2	0,1	0,4	0,4
LPV 13	0,204	0,125	0,060	0,135	0,073	LPV 13	0,5	0,3	0,1	0,4	0,2
LPV 14	0,136	0,076	0,063	0,123	0,116	LPV 14	0,3	0,2	0,1	0,3	0,3
LPV 15	0,119	0,065	0,060	0,073	0,065	LPV 15	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2
LPV 16	0,224	0,090	0,063	0,187	0,168	LPV 16	0,6	0,2	0,1	0,5	0,5
LPV 17	0,109	0,066	0,059	0,093	0,086	LPV 17	0,3	0,2	0,1	0,3	0,2
LPV 20	0,175	0,072	0,090	0,137	0,157	LPV 20	0,5	0,2	0,2	0,4	0,4
LPV 21	0,128	0,119	0,076	0,115	0,098	LPV 21	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3
LPV 18	0,153	0,125	0,090	0,116	0,121	LPV 18	0,4	0,3	0,2	0,3	0,3
LPV 22	0,116	0,118	0,072	0,094	0,089	LPV 22	0,3	0,3	0,1	0,3	0,3
LPV 23	0,094	0,071	0,065	0,095	0,075	LPV 23	0,2	0,2	0,1	0,3	0,2
LPV 24	0,102	0,067	0,057	0,078	0,074	LPV 24	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2
LPV 29	0,444	0,073	0,065	0,410	0,249	LPV 29	1,1	0,2	0,1	1,1	0,7

APÊNDICE G: Análise de desempenho das proteínas N, S1(F) e S em ELISA para detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2. Cont.

Positivas											
	OD IgG						Índice IgG				
	N	S1 (F)	S	N+S1(F)	N+S		N	S1 (F)	S	N+S1(F)	N+S
SPF 6A	3,036	1,602	1,852	2,950	2,723	SPF 6A	7,8	3,8	3,7	8,1	7,8
SPF7B	1,136	0,594	1,239	1,088	1,264	SPF7B	2,9	1,4	2,5	3,0	3,6
SPF9A	0,645	1,535	1,704	1,493	1,441	SPF9A	1,7	3,6	3,4	4,1	4,1
SPF10B	1,051	0,137	0,084	0,950	0,653	SPF10B	2,7	0,3	0,2	2,6	1,9
SPF11	2,289	0,238	0,225	2,150	2,009	SPF11	5,9	0,6	0,4	5,9	5,7
SPF12A	2,258	2,683	3,079	2,702	2,675	SPF12A	5,8	6,3	6,1	7,4	7,6
SCT16	1,960	0,114	0,117	1,910	1,467	SCT16	5,0	0,3	0,2	5,2	4,2
SPF14	2,479	1,760	1,878	2,630	2,348	SPF14	6,4	4,2	3,8	7,2	6,7
SPF023	0,652	0,614	0,668	0,761	0,726	SPF023	1,7	1,5	1,3	2,1	2,1
SCT23	0,637	0,699	0,735	0,836	0,746	SCT23	1,6	1,7	1,5	2,3	2,1
SCOV6	1,971	1,733	2,956	2,231	2,601	SCOV6	5,1	4,1	5,9	6,1	7,4
SCOV7	1,787	0,877	1,495	1,961	1,900	SCOV7	4,6	2,1	3,0	5,4	5,4
SPF013	0,551	0,635	1,127	0,808	0,993	SPF013	1,4	1,5	2,3	2,2	2,8
LC	2,731	3,045	3,205	2,996	3,071	LC	7,0	7,2	6,4	8,2	8,8
SPF076	2,372	1,674	2,361	2,554	2,486	SPF076	6,1	4,0	4,7	7,0	7,1
D59	2,504	1,732	1,573	2,570	2,437	D59	6,4	4,1	3,1	7,1	7,0
SPF070	1,970	1,347	1,770	1,988	2,114	SPF070	5,1	3,2	3,5	5,5	6,0
SPF080	1,429	0,641	1,161	1,621	1,563	SPF080	3,7	1,5	2,3	4,5	4,5
SPF088	1,838	1,615	2,186	2,140	2,024	SPF088	4,7	3,8	4,4	5,9	5,8
SPF092	0,744	0,973	1,336	1,147	1,219	SPF092	1,9	2,3	2,7	3,2	3,5
SPF093	1,257	1,174	0,999	1,454	1,251	SPF093	3,2	2,8	2,0	4,0	3,6
SPF114	2,017	1,844	1,684	2,346	2,056	SPF114	5,2	4,4	3,4	6,4	5,9
SPF101	0,366	0,215	0,399	0,318	0,343	SPF101	0,9	0,5	0,8	0,9	1,0
SPF103	0,640	0,616	0,903	0,828	0,823	SPF103	1,6	1,5	1,8	2,3	2,4
SPF118	0,400	0,593	0,943	0,631	0,696	SPF118	1,0	1,4	1,9	1,7	2,0
SPF121	2,998	2,546	3,063	2,936	2,970	SPF121	7,7	6,0	6,1	8,1	8,5
SPF162	0,614	0,844	1,461	1,007	1,139	SPF162	1,6	2,0	2,9	2,8	3,3
SPF126	0,724	0,412	0,646	0,844	0,786	SPF126	1,9	1,0	1,3	2,3	2,2
SPF133	0,357	0,618	1,082	0,662	0,744	SPF133	0,9	1,5	2,2	1,8	2,1
SPF137	0,675	1,019	2,092	1,192	1,534	SPF137	1,7	2,4	4,2	3,3	4,4
SPF143	1,555	1,499	1,853	1,773	1,773	SPF143	4,0	3,5	3,7	4,9	5,1
SPF145	0,300	1,266	1,630	0,832	1,164	SPF145	0,8	3,0	3,3	2,3	3,3
SPF148	1,690	0,529	0,419	1,581	1,387	SPF148	4,3	1,3	0,8	4,3	4,0
SPF149	1,634	1,394	1,382	1,672	1,624	SPF149	4,2	3,3	2,8	4,6	4,6

APÊNDICE G: Análise de desempenho das proteínas N, S1(F) e S em ELISA para detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2. Cont.

Positivas											
	OD IgG						Índice IgG ¹⁸				
	N	S1 (F)	S	N+S1(F)	N+S		N	S1 (F)	S	N+S1(F)	N+S
SPF153	0,860	0,884	1,401	1,055	1,003	SPF153	2,2	2,1	2,8	2,9	2,9
SPF160	2,342	1,708	2,180	2,377	2,461	SPF160	6,0	4,0	4,4	6,5	7,0
SPF171	0,573	0,266	0,654	0,681	0,714	SPF171	1,5	0,6	1,3	1,9	2,0
SPF137	3,181	2,201	2,677	3,305	3,315	SPF137	8,2	5,2	5,3	9,1	9,5
SPF143	2,555	0,122	0,179	2,517	2,157	SPF143	6,6	0,3	0,4	6,9	6,2
SPF168	0,404	0,756	1,269	0,797	0,997	SPF168	1,0	1,8	2,5	2,2	2,8
SPF172	0,397	1,248	1,537	0,793	1,114	SPF172	1,0	3,0	3,1	2,2	3,2
SPF176	2,165	0,883	1,307	2,062	2,073	SPF176	5,6	2,1	2,6	5,7	5,9
SPF177	2,730	1,080	1,729	2,667	2,588	SPF177	7,0	2,6	3,5	7,3	7,4
SPF193	3,205	2,549	3,012	3,113	3,243	SPF193	8,2	6,0	6,0	8,6	9,3
SPF207	0,533	0,265	0,330	0,585	0,511	SPF207	1,4	0,6	0,7	1,6	1,5
SPF212	1,390	0,176	0,242	1,508	1,228	SPF212	3,6	0,4	0,5	4,1	3,5
SPF227	2,352	0,902	1,357	2,222	2,171	SPF227	6,1	2,1	2,7	6,1	6,2
SPF266	0,580	0,450	0,968	0,782	0,805	SPF266	1,5	1,1	1,9	2,1	2,3
SPF253	1,069	0,690	0,842	1,090	1,104	SPF253	2,7	1,6	1,7	3,0	3,2
SPF254	0,779	1,715	2,204	1,419	1,994	SPF254	2,0	4,1	4,4	3,9	5,7
SPF272	0,956	1,156	1,720	1,463	1,589	SPF272	2,5	2,7	3,4	4,0	4,5
SPF273	1,293	1,389	0,685	1,231	1,052	SPF273	3,3	3,3	1,4	3,4	3,0
SPF274	0,516	0,183	0,253	0,503	0,435	SPF274	1,3	0,4	0,5	1,4	1,2
SPF294	1,938	0,338	0,421	1,893	1,526	SPF294	5,0	0,8	0,8	5,2	4,4
SPF285	2,172	0,528	0,402	2,149	1,672	SPF285	5,6	1,2	0,8	5,9	4,8
SPF313	1,105	0,856	1,190	1,322	1,387	SPF313	2,8	2,0	2,4	3,6	4,0

Resultado	N	S1 (F)	S	N+S1(F)	N+S
Indeterminado	5	2	3	1	1
Reagente	50	44	45	55	55
Positividade*	89%	79%	80%	98%	98%
Sensibilidade**	98%	81%	85%	100%	100%

*Amostras totais

**Desconsiderando indeterminadas

¹⁸¹⁸ Verde: resultado não reagente ($I < 0,8$), branco: indeterminado ($0,8 \leq I < 1,1$), vermelho: reagente ($I > 1,1$). Os índices estão arredondados, podendo apresentar classificações diferentes (cor) e o mesmo valor numérico exibido. O índice depende do cut-off obtido para cada antígeno ou associação de antígenos, de forma que absorbâncias similares para diferentes antígenos podem resultar numa classificação diferente pelo índice.

APÊNDICE G: Análise de desempenho das proteínas N, S1(F) e S em ELISA para detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2. Cont.

Negativas											
	OD IgM						Índice IgM				
	N	S1 (F)	S	N+S1(F)	N+S		N	S1 (F)	S	N+S1(F)	N+S
SCT01	0,241	0,143	0,076	0,153	0,154	SCT01	0,6	0,7	0,5	0,5	0,6
SCT02	0,157	0,166	0,131	0,143	0,141	SCT02	0,4	0,8	0,9	0,4	0,5
SCT04	0,257	0,193	0,081	0,135	0,123	SCT04	0,6	0,9	0,5	0,4	0,4
SCT05	0,277	0,200	0,184	0,208	0,226	SCT05	0,6	1,0	1,2	0,6	0,8
SCT06	0,181	0,131	0,080	0,137	0,131	SCT06	0,4	0,6	0,5	0,4	0,5
SCT07	0,197	0,115	0,097	0,161	0,155	SCT07	0,4	0,6	0,6	0,5	0,6
SCT09	0,070	0,087	0,060	0,072	0,069	SCT09	0,2	0,4	0,4	0,2	0,3
SCT10	0,149	0,096	0,086	0,104	0,106	SCT10	0,3	0,5	0,6	0,3	0,4
SCT13	0,150	0,110	0,076	0,095	0,095	SCT13	0,3	0,5	0,5	0,3	0,3
SCT14	0,216	0,126	0,118	0,152	0,150	SCT14	0,5	0,6	0,8	0,5	0,5
SCT15	0,105	0,056	0,053	0,070	0,071	SCT15	0,2	0,3	0,4	0,2	0,3
SCT17	0,123	0,068	0,062	0,100	0,090	SCT17	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3
SCT18	0,170	0,109	0,079	0,136	0,111	SCT18	0,4	0,5	0,5	0,4	0,4
SCT19	0,096	0,079	0,062	0,089	0,088	SCT19	0,2	0,4	0,4	0,3	0,3
SCT11	0,127	0,083	0,067	0,126	0,099	SCT11	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4
SCT22	0,229	0,111	0,093	0,134	0,149	SCT22	0,5	0,5	0,6	0,4	0,5
SCT29	0,248	0,098	0,102	0,113	0,129	SCT29	0,6	0,5	0,7	0,3	0,5
SCT30	0,170	0,075	0,081	0,110	0,126	SCT30	0,4	0,4	0,5	0,3	0,5
SCT33	0,144	0,071	0,064	0,118	0,112	SCT33	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4
SCT34	0,087	0,060	0,066	0,101	0,080	SCT34	0,2	0,3	0,4	0,3	0,3
SCT35	0,202	0,135	0,083	0,146	0,148	SCT35	0,5	0,7	0,6	0,4	0,5
SCT36	0,201	0,083	0,079	0,131	0,120	SCT36	0,5	0,4	0,5	0,4	0,4
MCT1	0,143	0,080	0,073	0,105	0,111	MCT1	0,3	0,4	0,5	0,3	0,4
MCT2	0,191	0,081	0,089	0,120	0,137	MCT2	0,4	0,4	0,6	0,4	0,5
MCT3	0,218	0,129	0,070	0,412	0,122	MCT3	0,5	0,6	0,5	1,2	0,4
MCT4	0,109	0,063	0,066	0,078	0,077	MCT4	0,2	0,3	0,4	0,2	0,3
LPV 10	0,345	0,066	0,061	0,175	0,172	LPV 10	0,8	0,3	0,4	0,5	0,6
LPV 12	0,103	0,091	0,069	0,098	0,089	LPV 12	0,2	0,4	0,5	0,3	0,3
LPV 13	0,277	0,077	0,076	0,137	0,136	LPV 13	0,6	0,4	0,5	0,4	0,5
LPV 14	0,247	0,072	0,063	0,173	0,177	LPV 14	0,6	0,4	0,4	0,5	0,6
LPV 15	0,246	0,088	0,087	0,196	0,191	LPV 15	0,6	0,4	0,6	0,6	0,7
LPV 16	0,091	0,060	0,065	0,078	0,071	LPV 16	0,2	0,3	0,4	0,2	0,3
LPV 17	0,128	0,078	0,069	0,088	0,080	LPV 17	0,3	0,4	0,5	0,3	0,3
LPV 20	0,381	0,068	0,062	0,276	0,260	LPV 20	0,9	0,3	0,4	0,8	0,9
LPV 21	0,096	0,064	0,057	0,079	0,073	LPV 21	0,2	0,3	0,4	0,2	0,3
LPV 18	0,146	0,079	0,073	0,122	0,107	LPV 18	0,3	0,4	0,5	0,4	0,4
LPV 22	0,433	0,129	0,094	0,281	0,271	LPV 22	1,0	0,6	0,6	0,8	1,0
LPV 23	0,105	0,069	0,064	0,090	0,084	LPV 23	0,2	0,3	0,4	0,3	0,3
LPV 24	0,066	0,054	0,051	0,057	0,059	LPV 24	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2
LPV 29	0,052	0,048	0,048	0,056	0,057	LPV 29	0,1	0,2	0,3	0,2	0,2

APÊNDICE G: Análise de desempenho das proteínas N, S1(F) e S em ELISA para detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2. Cont.

Positivas											
	OD IgM						Índice IgM				
	N	S1 (F)	S	N+S1(F)	N+S		N	S1 (F)	S	N+S1(F)	N+S
SPF 6A	0,217	0,507	0,478	0,411	0,485	SPF 6A	0,5	2,5	3,2	1,2	1,8
SPF7B	0,725	0,834	0,735	0,959	1,006	SPF7B	1,7	4,1	4,9	2,9	3,7
SPF9A	0,227	0,377	0,249	0,310	0,302	SPF9A	0,5	1,8	1,7	0,9	1,1
SPF10B	0,677	0,143	0,129	0,580	0,525	SPF10B	1,5	0,7	0,9	1,7	1,9
SPF11	0,125	0,100	0,102	0,146	0,145	SPF11	0,3	0,5	0,7	0,4	0,5
SPF12A	0,197	1,572	1,474	1,202	1,227	SPF12A	0,4	7,7	9,8	3,6	4,5
SCT16	0,072	0,065	0,053	0,082	0,065	SCT16	0,2	0,3	0,4	0,2	0,2
SPF14	0,391	0,365	0,254	0,398	0,428	SPF14	0,9	1,8	1,7	1,2	1,6
SPF023	0,172	0,880	0,682	0,545	0,476	SPF023	0,4	4,3	4,5	1,6	1,7
SCT23	0,142	0,453	0,161	0,191	0,153	SCT23	0,3	2,2	1,1	0,6	0,6
SCOV6	0,278	0,410	0,224	0,286	0,310	SCOV6	0,6	2,0	1,5	0,9	1,1
SCOV7	0,222	0,409	0,289	0,303	0,299	SCOV7	0,5	2,0	1,9	0,9	1,1
SPF013	0,207	0,140	0,111	0,174	0,164	SPF013	0,5	0,7	0,7	0,5	0,6
LC	1,458	1,777	1,068	1,489	1,465	LC	3,3	8,7	7,1	4,4	5,3
SPF076	0,123	0,434	0,374	0,252	0,368	SPF076	0,3	2,1	2,5	0,7	1,3
D59	0,315	0,348	0,850	0,341	0,435	D59	0,7	1,7	5,6	1,0	1,6
SPF070	0,227	0,379	0,406	0,334	0,397	SPF070	0,5	1,9	2,7	1,0	1,4
SPF080	0,128	0,252	0,221	0,178	0,166	SPF080	0,3	1,2	1,5	0,5	0,6
SPF088	0,180	0,895	0,776	0,600	0,623	SPF088	0,4	4,4	5,2	1,8	2,3
SPF092	0,111	0,235	0,163	0,160	0,146	SPF092	0,3	1,2	1,1	0,5	0,5
SPF093	0,734	0,480	0,340	0,723	0,649	SPF093	1,7	2,4	2,3	2,2	2,4
SPF114	1,318	1,087	0,825	1,442	1,322	SPF114	3,0	5,3	5,5	4,3	4,8
SPF101	0,146	0,198	0,172	0,190	0,188	SPF101	0,3	1,0	1,1	0,6	0,7
SPF103	0,472	0,553	0,383	0,503	0,607	SPF103	1,1	2,7	2,5	1,5	2,2
SPF118	0,147	0,294	0,231	0,218	0,205	SPF118	0,3	1,4	1,5	0,6	0,7
SPF121	1,236	2,639	2,765	2,118	1,917	SPF121	2,8	12,9	18,4	6,3	7,0
SPF162	0,137	0,214	0,106	0,149	0,122	SPF162	0,3	1,0	0,7	0,4	0,4
SPF126	0,645	0,916	1,117	1,016	1,119	SPF126	1,5	4,5	7,4	3,0	4,1
SPF133	0,126	0,262	0,136	0,158	0,145	SPF133	0,3	1,3	0,9	0,5	0,5
SPF137	1,043	1,264	1,285	1,485	1,495	SPF137	2,4	6,2	8,5	4,4	5,4
SPF143	1,445	1,521	1,083	1,478	1,487	SPF143	3,3	7,5	7,2	4,4	5,4
SPF145	1,286	1,028	0,767	1,180	1,262	SPF145	2,9	5,0	5,1	3,5	4,6
SPF148	0,297	0,140	0,145	0,246	0,265	SPF148	0,7	0,7	1,0	0,7	1,0
SPF149	0,270	0,450	0,447	0,429	0,425	SPF149	0,6	2,2	3,0	1,3	1,5

APÊNDICE G: Análise de desempenho das proteínas N, S1(F) e S em ELISA para detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2. Cont.

Positivas											
	OD IgM						Índice IgM				
	N	S1 (F)	S	N+S1(F)	N+S		N	S1 (F)	S	N+S1(F)	N+S
SPF153	0,276	0,513	0,327	0,365	0,310	SPF153	0,6	2,5	2,2	1,1	1,1
SPF160	0,311	1,373	1,099	0,996	0,801	SPF160	0,7	6,7	7,3	3,0	2,9
SPF171	0,192	0,606	0,336	0,428	0,291	SPF171	0,4	3,0	2,2	1,3	1,1
SPF137	0,451	1,437	0,797	0,736	0,796	SPF137	1,0	7,1	5,3	2,2	2,9
SPF143	0,666	0,309	0,292	0,599	0,612	SPF143	1,5	1,5	1,9	1,8	2,2
SPF168	0,120	0,219	0,225	0,174	0,212	SPF168	0,3	1,1	1,5	0,5	0,8
SPF172	0,326	0,249	0,173	0,221	0,225	SPF172	0,7	1,2	1,1	0,7	0,8
SPF176	0,555	0,785	0,356	0,521	0,517	SPF176	1,3	3,9	2,4	1,6	1,9
SPF177	1,742	0,393	0,300	1,657	1,668	SPF177	4,0	1,9	2,0	4,9	6,1
SPF193	0,449	1,250	0,988	0,866	0,894	SPF193	1,0	6,1	6,6	2,6	3,3
SPF207	0,373	0,277	0,205	0,300	0,305	SPF207	0,9	1,4	1,4	0,9	1,1
SPF212	1,613	0,648	0,460	1,241	1,378	SPF212	3,7	3,2	3,1	3,7	5,0
SPF227	0,432	0,556	0,575	0,479	0,751	SPF227	1,0	2,7	3,8	1,4	2,7
SPF266	0,143	0,087	0,063	0,096	0,102	SPF266	0,3	0,4	0,4	0,3	0,4
SPF253	0,200	0,212	0,205	0,177	0,252	SPF253	0,5	1,0	1,4	0,5	0,9
SPF254	0,156	1,113	0,881	0,583	0,709	SPF254	0,4	5,5	5,8	1,7	2,6
SPF272	0,147	0,491	0,410	0,284	0,350	SPF272	0,3	2,4	2,7	0,8	1,3
SPF273	0,728	1,232	0,994	0,971	1,084	SPF273	1,7	6,0	6,6	2,9	4,0
SPF274	0,197	0,232	0,174	0,185	0,193	SPF274	0,4	1,1	1,2	0,6	0,7
SPF294	0,437	0,384	0,312	0,434	0,495	SPF294	1,0	1,9	2,1	1,3	1,8
SPF285	0,438	0,265	0,224	0,318	0,349	SPF285	1,0	1,3	1,5	0,9	1,3
SPF313	0,397	0,362	0,225	0,273	0,368	SPF313	0,9	1,8	1,5	0,8	1,3

Resultado	N	S1 (F)	S	N+S1(F)	N+S
Indeterminado	9	10	5	4	5
Reagente	15	29	38	46	46
Positividade.*	27%	52%	68%	82%	82%
Sensibilidade**	32%	63%	75%	88%	90%

*Amostras totais

**Desconsiderando indeterminadas

APÊNDICE I- AMOSTRAS UTILIZADAS NA PADRONIZAÇÃO DO KIT EIE COVID-19 IGG Cont.

Negativas Pré COVID						Neg pós COVID (qPCR -, doadores saudáveis)		
ID Amostr a	OD EIE IgG	Índice EIE IgG	ID Amostr a	OD EIE IgG	Índice EIE IgG	ID Amostra	OD EIE IgG	Índice EIE IgG
NEG1	0,109	0,3	NEG42	0,215	0,5	SCT01	0,203	0,5
NEG4	0,145	0,3	NEG47	0,163	0,4	SCT02	0,166	0,4
NEG5	0,216	0,5	NEG49	0,196	0,5	SCT03	0,165	0,4
NEG7	0,201	0,5	NEG50	0,324	0,8	SCT04	0,152	0,4
NEG9	0,161	0,4	NEG51	0,315	0,8	SCT05	0,17	0,4
NEG11	0,294	0,7	NEG53	0,444	1,1	SCT06	0,088	0,2
NEG14	0,14	0,3	NEG54	0,177	0,4	SCT07	0,152	0,4
NEG16	0,219	0,5	NEG55	0,144	0,3	SCT08	0,11	0,3
NEG18	0,322	0,8	NEG56	0,214	0,5	SCT09	0,157	0,4
NEG24	0,179	0,4	NEG57	0,293	0,7	SCT10	0,123	0,3
NEG26	0,117	0,3	NEG60	0,206	0,5	SCT11	0,178	0,4
Se208	0,457	1,1	NEG61	0,118	0,3	SCT12	0,198	0,5
Se222	0,19	0,5	NEG64	0,102	0,2	SCT13	0,133	0,3
Se 235	0,112	0,3	NEG65	0,123	0,3	SCT14	0,146	0,4
Se234	0,19	0,5	NEG67	0,151	0,4	SCT15	0,126	0,3
Se225	0,099	0,2	NEG69	0,281	0,7	SCT17	0,113	0,3
NEG36	0,105	0,3	NEG71	0,167	0,4	SCT18	0,097	0,2
NEG37	0,528	1,3	NEG72	0,198	0,5	SCT19	0,409	1,0
NEG38	0,137	0,3	NEG73	0,12	0,3	SCT20	0,134	0,3
NEG39	0,283	0,7	NEG76	0,157	0,4	APS CB	0,222	0,5
NEG40	0,431	1,0	NEG78	0,173	0,4	APS MA	0,113	0,3
NEG41	0,216	0,5				APS FV	0,109	0,3
						SPF22	0,125	0,3
						SPF24	0,171	0,4

APÊNDICE I- Amostras utilizadas na padronização do Kit EIE COVID-19 IgG Cont.

Positivos por qPCR									
ID Amostra	DPP IgG	ABS EIE IgG	Índice EIE IgG	Observação	ID Amostra	DPP IgG	ABS EIE IgG	Índice EIE IgG	Observação
SPF05	NR	0,639	1,5	Não Hospit.	D23	R	3,555	8,6	Não Hospit.
SPF06 F	NR	3,612	8,7	Hosp.	D25	R	3,62	8,7	Não Hospit.
SPF07 D	R	3,324	8,0	Hosp.	D26	R	3,724	9,0	Não Hospit.
SPF09B	R	3,307	8,0	Hosp.	D29	R	0,705	1,7	Não Hospit.
SPF10B	R	1,16	2,8	Hosp.	D38	R	1,159	2,8	Não Hospit.
SPF11	R	3,026	7,3	Hosp.	D40	R	1,047	2,5	Não Hospit.
SPF12B	R	3,491	8,4	Hosp.	D59	R	3,265	7,9	Não Hospit.
CJP	NR	0,214	0,5	Hosp.	D63	R	1,535	3,7	Não Hospit.
EGC	NR	0,186	0,4	Hosp.	D64	NR	0,396	1,0	Não Hospit.
LC	R	3,474	8,4	Hosp.	D109	R	2,276	5,5	Não Hospit.
WAV 263	R	2,566	6,2	Hosp.	D110	NR	0,487	1,2	Não Hospit.
SPF13	NR	0,673	1,6	Não Hospit.	D113	R	0,912	2,2	Não Hospit.
SPF14	R	1,942	4,7	Não Hospit.	D227	R	2,694	6,5	Não Hospit.
SPF15	NR	0,389	0,9	Não Hospit.	SCT16	R	2,242	4,6	Não Hospit.
SPF21	R	3,07	7,4	Não Hospit.	SPF23	R	0,798	1,6	Não Hospit.

APÊNDICE I- AMOSTRAS UTILIZADAS NA VALIDAÇÃO INTERNA DO KIT EIE COVID-19 IgG

ID	qPCR	DPP-IgM	DPP-IgG	EIE IgG (I)	Obs	ID	qPCR	Dias após qPCR	DPP-IgM	DPP-IgG	EIE IgG (I)	Obs
MCT1	Neg	19	1,5	0,2	DS	SPF06A	Pos	Sem data	29	18	8,2	Hosp.
MCT2	Neg	9,4	14	0,4	DS	SPF06B	Pos	Sem data	90	250	8,9	Hosp.
MCT3	Neg	22	3,7	0,2	DS	SPF07 A1	Pos	Sem data	4,8	56	0,6	Hosp.
MCT4	Neg	2,2	5,2	0,3	DS	SPF07 B	Pos	Sem data	30	201	3,9	Hosp.
MCT5	Neg	38	3,5	0,3	DS	SPF07 C	Pos	Sem data	66	266	6,6	Hosp.
MCT6	Neg	2,7	3,6	0,3	DS	SPF07 D	Pos	Sem data	131	281	7,8	Hosp.
MCT7	Neg	6	6,8	0,2	DS	SPF08C	Pos	Sem data	1,6	1,3	0,4	Hosp.
MCT8	Neg	27	3,2	0,2	DS	SPF09A	Pos	Sem data	34	11	1,5	Hosp.
MCT9	Neg	4,6	24	0,4	DS	SPF09B	Pos	Sem data	193	151	7,4	Hosp.
MCT10	Neg	2,2	2,6	0,3	DS	SPF10A	Pos	Sem data	4	8	0,2	Hosp.
MCT11	Neg	14	2	0,2	DS	SPF10B	Pos	Sem data	81	100	2,5	Hosp.
MCT12	Neg	4,4	2,2	0,6	DS	SPF11	Pos	Sem data	9,5	8,1	6,9	Hosp.
MCT13	Neg	4,3	8,8	0,4	DS	SPF12A	Pos	Sem data	85	231	7,6	Hosp.
MCT14	Neg	49	8,5	0,3	DS	SPF12B	Pos	Sem data	69	169	8,0	Hosp.
MCT15	Neg	6	1,8	0,2	DS							
MCT21	Neg	5	2	0,3	DS							
MCT22	Neg	2,7	0,6	0,2	DS							
MCT23	Neg	4,3	1,7	0,2	DS							

Classificação dos resultados: Verde: Amostra não-reagente (sorologia, DPP<25, EIE<0,8) ou não-detectável (qPCR), branco: amostra indeterminada (0,8≤EIE<1,1), vermelho: amostra reagente (sorologia, DPP>25, EIE≥1,10,8) ou detectável (qPCR).

Siglas: I:Índice, Hosp.: Paciente hospitalizado, Não Hosp.: Paciente não hospitalizado, DS: doador saudável (qPCR- e sem sintomas), Susp.: caso suspeito (ainda que sem dados de qPCR, casos de pessoas que tiveram contato com pacientes confirmados por qPCR e/ou sintomáticos).

APÊNDICE J-AMOSTRAS UTILIZADAS PARA O CÁLCULO DO CUT-OFF DURANTE A AVALIAÇÃO INICIAL DO KIT EIE COVID-19 IGG

Cut-off							
ID	OD EIE	ID	OD EIE	ID	OD EIE	ID	OD EIE
Amostra	IgG	Amostra	IgG	Amostra	IgG	Amostra	IgG
MMF	0,208	L8P	0,198	CPQ	0,199	454	0,206
B5S	0,186	TST	0,194	HIS	0,195	536	0,176
E20	0,242	TAPN	0,108	WDFSD	0,279	A24	0,132
TAT	0,256	CLBASC	0,239	443	0,136	PAA	0,193
447	0,113	457	0,137	440	0,110	PACC	0,204
349	0,109	439	0,387	473	0,189	NSHS	0,182
476	0,143	556	0,180	LG	0,319	452	0,076
HS	0,178	469	0,141	TFSN	0,157	327	0,092
S13S	0,210	R22	0,104	BCR	0,162	444	0,117
BO	0,175	GABC	0,216	GMF	0,122	A15	0,245
FC	0,218	TAT	0,247	442	0,153	AFC	0,158
446	0,084	SSM	0,298	586	0,276	BSAS	0,059
352	0,155	455	0,142	477	0,189	CRRB	0,203
563	0,389	362	0,118	D6S	0,289	448	0,133
C(L)	0,134	451	0,116	LSH	0,290	336	0,111
J1P	0,202	538	0,167	GRG	0,105	577	0,133
MSPF	0,387	M11S	0,215	BSAASS	0,290	C1857	0,120
TCIT	0,176	EJF	0,176	456	0,093	TBL	0,127
DSP	0,166	NM	0,315	441	0,085	WFD	0,061
355	0,129	JGD	0,258	471	0,130	LBPFF	0,370
577	0,180	576	0,138	595	0,162	450	0,157
CAT	0,242	357	0,358	566	0,105	338	0,252
Média					0,195		
DP					0,077		
Cutoff (Mneg+3P)					0,426		

APÊNDICE K- AMOSTRAS UTILIZADAS NA VALIDAÇÃO INTERNA DO KIT EIE COVID-19 IgG- Cont.

ID	qPCR	DPP-IgM	DPP-IgG	EIE IgG (I)	Obs	ID	qPCR	DPP-IgM	DPP-IgG	EIE IgG (I)	Obs
SCOV2	Não real.	3,6	1,1	0,3	Susp.	SPF053	Não real.	8,3	3,7	0,5	Susp.
SCOV5	Não real.	2,6	1,2	0,2	Susp.	SPF059	Não real.	13	21	1,3	Susp.
SCOV6	Não real.	12	176	7,3	Susp.	SPF066	Não real.	35	3,8	0,5	Susp.
SCOV7	Não real.	12	62	5,1	Susp.	SPF074	Não real.	32	2,5	0,4	Susp.
SCT16	Não real.	1,2	70	4,6	Susp.	SPF084	Não real.	37	3,7	0,3	Susp.
SCT23	Não real.	4,7	61	2,2	Susp.	SPF087	Não real.	3,8	0,6	0,5	Susp.
SPF002	Não real.	6,8	10	1,1	Susp.	SPF099	Não real.	11	3,9	0,3	Susp.
SPF005	Não real.	2,8	7	1,5	Susp.	SPF106	Não real.	3,8	0,7	0,5	Susp.
SPF014	Não real.	43	120	4,6	Susp.	SPF116	Não real.	7,6	3,6	0,4	Susp.
SPF015	Não real.	2,5	7	0,8	Susp.	SPF127	Não real.	19	85	5,9	Susp.
SPF016	Não real.	2,3	3,7	0,2	Susp.	SPF136	Não real.	7,2	3,6	0,3	Susp.
SPF017	Não real.	1,6	1,2	0,2	Susp.	SPF152	Não real.	2,1	24	0,7	Susp.
SPF018	Não real.	7,3	1,3	0,2	Susp.	SPF158	Não real.	27	2	0,3	Susp.
SPF019	Não real.	6,5	12	0,2	Susp.	SPF163	Não real.	5,8	123	4	Susp.
SPF020	Não real.	2	5,1	0,2	Susp.	SPF190	Não real.	51	280	9,1	Susp.
SPF021	Não real.	139	314	6,3	Susp.	SPF045	Não real.	1,6	54	0,5	Susp.
SPF025	Não real.	4,1	13	1,0	Susp.	SPF050	Não real.	0,9	58	0,5	Susp.
SPF030	Não real.	13	1,3	0,2	Susp.	SPF057	Não real.	3,5	31	0,5	Susp.
SPF032	Não real.	1,7	10	0,4	Susp.	SPF159	Não real.	22	54	1,8	Susp.
SPF033	Não real.	7,6	3,3	0,3	Susp.	SPF174	Não real.	32	73	1,7	Susp.
SPF042	Não real.	8,3	3,0	0,9	Susp.	SPF180	Não real.	29	108	2,0	Susp.
SPF052	Não real.	3,1	1,1	0,3	Susp.						

Susp.: caso suspeito (ainda que sem dados de qPCR, casos de pessoas que tiveram contato com pacientes confirmados por qPCR e/ou sintomáticos).

APÊNDICE L- AMOSTRAS UTILIZADAS NA VALIDAÇÃO INTERNA DO KIT EIE COVID-19 IgG- SOROCONVERSÃO

P	ID	Coleta	Dias após qPCR	DPP-IgM	DPP-IgG	EIE IgG (I)
1	SPF278	1 ^a	5	20	1	0,8
	SPF285	2 ^a	8	15	4,1	5,4
	SPF295	3 ^a	11	29	26	5,2
2	SPF036	1 ^a	9	3,7	33	1,4
	SPF041	2 ^a	14	3,1	19	1,6
	SPF054	3 ^a	18	11	71	2,1
3	SPF093	1 ^a	5	194	81	5,6
	SPF110	2 ^a	8	222	156	8,6
	SPF130	3 ^a	11	182	131	8,0
	SPF199	4 ^a	26	166	175	8,1
4	SPF126	1 ^a	8	133	19	2,9
	SPF144	2 ^a	12	82	52	3,2
	SPF170	3 ^a	18	69	115	4,6
5	SPF189	1 ^a	13	49	53	1,0
	SPF207	2 ^a	17	54	71	2,0
	SPF214	3 ^a	20	87	71	1,5
6	SPF100	1 ^a	1	25	11	0,5
	SPF117	2 ^a	4	79	10	0,5
	SPF137	3 ^a	7	169	92	1,9
	SPF198	4 ^a	22	122	139	4,9
7	SPF046	1 ^a	0	22	8,6	1,5
	SPF061	2 ^a	5	34	88	5,2
	SPF070	3 ^a	9	50	91	5,4
	SPF154	4 ^a	24	13	66	3,8

P	ID	Coleta	Dias após qPCR	DPP-IgM	DPP-IgG	EIE IgG (I)
8	SPF247	1 ^a	11	17	24	0,7
	SPF254	2 ^a	13	13	68	1,8
	SPF270	3 ^a	18	15	55	3,0
	SPF303	4 ^a	29	10	109	3,3
9	SPF246	1 ^a	4	9,2	8,1	0,4
	SPF253	2 ^a	6	16	70	2,7
	SPF271	3 ^a	11	18	62	4,2
10	SPF302	4 ^a	22	23	122	3,7
	SPF082	1 ^a	4	3,3	1,2	0,2
	SPF103	2 ^a	8	34	32	2,1
11	SPF139	3 ^a	12	215	295	8,4
	SPF195	4 ^a	27	117	266	8,4
	SPF269	1 ^a	5	29	2,5	0,3
12	SPF273	2 ^a	9	68	113	4,0
	SPF289	3 ^a	12	160	277	9,6
	SPF048	1 ^a	5	57	3,3	0,4
13	SPF060	2 ^a	10	66	93	2,9
	SPF069	3 ^a	14	81	65	3
	SPF153	4 ^a	28	76	58	2,5
14	SPF001	1 ^a	4	5,2	6,5	0,5
	SPF003	2 ^a	7	8,5	6,5	0,9
	SPF004	3 ^a	11	7,5	21	1,3
	SPF013	4 ^a	18	5,5	23	1,5
14	SPF058	1 ^a	10	17	93	4,1
	SPF068	2 ^a	14	13	77	4,4
	SPF080	3 ^a	19	8	110	3,8

P	ID	Coleta	Dias após qPCR	DPP-IgM	DPP-IgG	EIE IgG (I)
15	SPF147	1 ^a	9	45	198	6,7
	SPF160	2 ^a	13	36	200	7
	SPF173	3 ^a	16	28	212	8,1
	SPF218	4 ^a	28	18	244	7,5
16	SPF263	1 ^a	6	107	7,7	0,4
	SPF275	2 ^a	10	93	15	0,5
	SPF288	3 ^a	13	123	15	0,7
	SPF313	4 ^a	19	124	51	2,5
17	SPF119	1 ^a	11	88	43	1,1
	SPF131	2 ^a	14	148	55	1,1
	SPF145	3 ^a	17	101	80	1,1
18	SPF044	1 ^a	2	2,3	1,3	0,2
	SPF049	2 ^a	6	1	1	0,4
	SPF056	3 ^a	11	5,3	4,5	1
	SPF076	4 ^a	20	15	169	7,4
19	SPF148	1 ^a	4	64	82	5,4
	SPF166	2 ^a	10	64	215	8,7
	SPF184	3 ^a	14	73	233	8,4
20	SPF143	1 ^a	9	14	51	3,9
	SPF157	2 ^a	12	16	54	5,4
	SPF179	3 ^a	18	26	70	6,1
	SPF219	4 ^a	30	25	60	5,5
21	SPF232	1 ^a	3	9,5	1,6	0,6
	SPF242	2 ^a	7	13	9	0,4
	SPF250	3 ^a	9	15	8,3	0,6
	SPF272	4 ^a	18	12	108	3,5

P	ID	Coleta	Dias após qPCR	DPP-IgM	DPP-IgG	EIE IgG (I)
22	SPF081	1 ^a	4	6,4	0,7	0,2
	SPF102	2 ^a	8	8	2,4	0,3
	SPF121	3 ^a	11	46	88	2,1
	SPF196	4 ^a	27	48	279	8,3
23	SPF212	1 ^a	5	148	101	4,8
	SPF221	2 ^a	9	84	224	7,1
	SPF226	3 ^a	12	99	239	6,7
24	SPF264	1 ^a	7	20	2,5	0,3
	SPF274	2 ^a	11	7	14	1,5
	SPF287	3 ^a	14	5,5	13	1,2
25	SPF161	1 ^a	16	9,5	23	1,6
	SPF188	2 ^a	22	10	21	1,9
	SPF205	3 ^a	26	5,3	46	1,8
26	SPF098	1 ^a	9	23	15	0,9
	SPF115	2 ^a	12	29	7,8	0,9
	SPF135	3 ^a	15	31	36	1,1
27	SPF172	4 ^a	24	33	20	1,2
	SPF165	1 ^a	7	80	132	7,2
	SPF175	2 ^a	10	49	210	7,9
28	SPF181	3 ^a	13	73	167	8,3
	SPF240	4 ^a	29	41	111	5,7
28	SPF193	1 ^a	7	88	256	8,6
	SPF209	2 ^a	12	118	317	8,5
	SPF220	3 ^a	16	89	240	7,4
	SPF256	4 ^a	25	59	313	7,7

P	ID	Coleta	Dias após qPCR	DPP-IgM	DPP-IgG	EIE IgG (I)
29	SPF097	1 ^a	9	4,8	34	0,6
	SPF114	2 ^a	12	21	196	3,4
	SPF134	3 ^a	15	43	231	6,8
	SPF197	4 ^a	30	17	231	5,8
30	SPF118	1 ^a	8	6,8	1,5	1,4
	SPF138	2 ^a	11	10	3,1	1,9
	SPF146	3 ^a	14	11	4,1	3,0
	SPF194	4 ^a	26	10	37	2,7
31	SPF088	1 ^a	7	27	66	5,9
	SPF108	2 ^a	10	18	159	7,6
	SPF125	3 ^a	13	22	86	6,8
	SPF191	4 ^a	27	11	81	5,3
32	SPF141	1 ^a	6	2,2	0,8	0,3
	SPF156	2 ^a	9	4,1	3,4	0,5
	SPF168	3 ^a	14	4,8	25	1,2
	SPF217	4 ^a	27	5,1	80	2
33	SPF071	1 ^a	1	2,5	1,3	0,4
	SPF078	2 ^a	4	3,5	1,1	0,4
	SPF150	4 ^a	15	68	146	5,9
34	SPF085	1 ^a	6	1,7	1	0,4
	SPF104	2 ^a	9	4,7	6,5	0,8
	SPF122	3 ^a	12	3,2	8	1,0
	SPF162	4 ^a	20	9,6	46	1,6
35	SPF177	1 ^a	15	327	130	7,9
	SPF183	2 ^a	18	333	136	8,2
	SPF204	3 ^a	22	326	112	7,9

P	ID	Coleta	Dias após qPCR	DPP-IgM	DPP-IgG	EIE IgG (I)
36	SPF176	1 ^a	10	43	167	6,0
	SPF182	2 ^a	13	62	137	7,2
	SPF208	3 ^a	17	28	160	6,9
37	SPF035	1 ^a	8	7,8	3,6	0,7
	SPF038	2 ^a	13	10	0,9	1,0
	SPF064	3 ^a	24	14	4,4	1,2
38	SPF277	1 ^a	0	2,5	1,2	0,3
	SPF284	2 ^a	3	9	8,8	0,4
	SPF294	3 ^a	6	84	142	4,7
39	SPF092	1 ^a	9	13	55	3,0
	SPF109	2 ^a	12	3,1	92	3,0
	SPF129	3 ^a	15	9,1	73	2,6
	SPF200	4 ^a	30	5,6	83	2,0
40	SPF213	1 ^a	5	5,5	1,7	0,3
	SPF222	2 ^a	9	20	64	4,3
	SPF227	3 ^a	12	25	100	5,4
	SPF292	4 ^a	30	15	160	7,9
41	SPF096	1 ^a	14	3	2,7	0,6
	SPF133	2 ^a	20	4,2	10	0,9
	SPF171	3 ^a	29	2,4	14	1,3
42	SPF149	1 ^a	3	11	2,6	0,5
	SPF167	2 ^a	9	56	95	4,7
	SPF185	3 ^a	13	52	137	5,1
	SPF238	4 ^a	29	16	148	4,4
43	SPF223	1 ^a	4	9	5,5	0,3
	SPF244	2 ^a	11	8,1	13	0,7
	SPF266	3 ^a	18	2,9	38	1,9

ANEXO A- LICENÇA PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS UTILIZANDO COELHOS, SOB RESPONSABILIDADE DO DR. RICARDO GAZINELLI (COORDENADOR DO CT-VACINAS).



LICENÇA

LW-39/19

Certificamos que o protocolo (P-29/19-3), intitulado "Geração de anticorpos policlonais em coelhos para o desenvolvimento de plataformas de diagnóstico sorológico visando o diagnóstico de doenças tropicais negligenciadas.", sob a responsabilidade de Ricardo Tostes Gazzinelli, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 08/08/2023 e inclui o uso total de :

Lagomorpha

- 10 Fêmeas, Idade: 3 Mes(es), Peso: 3,0000 Kilo(s).

Rio de Janeiro, 8 de agosto de 2019

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA

ANEXO B- CARTA EMITIDA PELA FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS-FUNED A RESPEITO DO USO DE AMOSTRAS HUMANAS NO PROJETO.



Participar do fortalecimento do Sistema Único de Saúde, protegendo e promovendo a saúde

INSTITUTO OCTÁVIO MAGALHÃES DIVISÃO DE EPIDEMIOLOGIA E CONTROLE DE DOENÇAS SERVIÇO DE VIROLOGIA E RIQUETSIOSES

Eu, Glauco de Carvalho Pereira, chefe do Laboratório de Virologia e Riquetsioses da Fundação Ezequiel Dias – FUNED, autorizo a utilização de amostras de soro humano provenientes desta Instituição no âmbito da realização dos seguintes projetos nos dos quais temos colaboração formalizada nos termos dos respectivos editais e programas:

- 1) PROJETO: "DESENVOLVIMENTO DE TESTES SOROLÓGICOS DIFERENCIAIS PARA ARBOVIROSES BRASILEIRAS BASEADOS NA IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS CONSERVADOS/ NÃO CONSERVADOS NO PROTEOMA DOS DIFERENTES VÍRUS E NA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES OBTIDAS EM SISTEMAS HETERÓLOGOS DE EXPRESSÃO". MODALIDADE: "EDITAL 007/2017 - PROGRAMA DE PESQUISA PARA O SUS - PPSUS" - PROCESSO N.: CBB- APQ-04295-17. COORDENADOR: PROF. FLAVIO G DA FONSECA
- 2) PROJETO: "DESENVOLVIMENTO DE TESTE SOROLÓGICO DIFERENCIAL PARA DENGUE, CHIKUNGUNYA ZIKA E FEBRE AMARELA - BIOSSENSORES BASEADOS EM NANOBASTÕES DE OURO". MODALIDADE: "EDITAL 001/2017 - DEMANDA UNIVERSAL". PROCESSO N.: CBB - APQ-03081-17. COORDENADOR: PROF. FLAVIO G DA FONSECA

As amostras serão utilizadas pelo Dr. Flávio Guimarães da Fonseca - Professor Associado junto ao Depto. de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, CI número M3467468, Siape no. 1 519 530 - para estudos de vigilância epidemiológica e para a pesquisa e desenvolvimento de novas estratégias de diagnósticos.

Atenciosamente,

Glauco Carvalho Pereira
Chefe do Serviço de Virologia e Riquetsioses
DECD-DIOM-FUNED-LACEN/MG
CRBio-04/nº44962/04-D /MASP: 1169906-3
14 de julho de 2018

ANEXO C- PARTE DO RELATÓRIO GERADO PELA VALIDAÇÃO EXTERNA DE PRODUTOS DO CT-VACINAS PELO LABORATÓRIO EM TECNOLOGIA DIAGNÓSTICA (FIOCRUZ, RJ) INCLUINDO O ELISA PARA CHIKV.



Perspectiva:

Como apresentado para o grupo IRR/UFMG, Bio-Manguinhos está dotado de infraestrutura física e grupo técnico com capacidade não só para desenvolver, como também produzir e registrar produtos da linha diagnóstica em sorologia, em especial, testes rápidos, como também testes moleculares.

Como discutido em reunião com a Diretoria de Bio-Manguinhos, quando da visita da *Prof. Dra. Ana Paula Fernandes* e do *Prof. Dr. Ricardo Gazzinelli*, deveremos avançar nas tratativas para encontrar as melhores alternativas para adequar e harmonizar um instrumento de parceria/cooperação tecnológica.

Edmilson D. da Silva
Laboratório de Tecnologia Diagnóstica
Bio-Manguinhos | Fiocruz

Chikungunya – ELISA pesquisa de IgG				
Antígeno	Plataforma	Sensibilidade	Especificidade	Amostras
E2	Elisa	93% (72/67)*	94% (45/46)*	BioM

* 2 amostras indeterminadas

Chikungunya – ELISA pesquisa de IgG (ZIKA e Dengue)				
Antígeno	Plataforma	ZIKA	Dengue	Amostras
E2	Elisa	0% (8/0)	0% (7/0)*	BioM

*2 amostras indeterminadas

Observação: As amostras indeterminadas não foram incluídas nos cálculos de sensibilidade e especificidade.

Considerações:

Com base nos resultados das avaliações, utilizando diferentes perfis de caracterização das amostras, foi possível constatar a elevada eficiência dos conjuntos de kits testados, indicando um potencial na sua utilização como ferramenta de diagnóstico.

Bio-Manguinhos/Fiocruz

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos

Av. Brasil, 4.365, Pavilhão Rocha Lima, Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - CEP: 21040-900

SAC: 08000 210310 - www.bio.fiocruz.br - facebook.com/BioFiocruz

ANEXO D- PARTE DO PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP PARA OBTENÇÃO DE AMOSTRAS HUMANAS PARA A VALIDAÇÃO DE PLATAFORMAS DE DIAGNÓSTICO DA COVID-19 EM NOME DA PROFESSORA ANA PAULA SALLES (CT-VACINAS).

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Ciência e Inovação para enfrentamento da pandemia de Covid-19, por meio de ações vinculadas ao diagnóstico de SARS-CoV2

Pesquisador: ANA PAULA SALLES MOURA FERNANDES

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 31686320.0.0000.5149

Instituição Proponente: Universidade Federal de Minas Gerais

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA, INOVACOES E COMUNICACOES

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.105.014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa visando o desenvolvimento de metodologias para o diagnóstico de COVID19, considerando a demanda emergencial e em médio prazo de testes de diagnóstico para COVID-19 no Brasil. Critério de Inclusão: Poderão participar do estudo homens e mulheres acima de 18 anos de idade, apresentando síndrome respiratória aguda, suspeita clínica de infecção por COVID19 (amostras positivas), pacientes aparentemente saudáveis (sem doenças/infecções detectadas) do estado de Minas Gerais (amostras negativas) e pacientes com outras infecções, como Dengue, Influenza, tuberculose (amostras de reatividade cruzada). A amostra será constituída de 920 indivíduos, assim divididos: - 240 pacientes positivos para COVID-19; - 310 pacientes com dengue, Influenza, tuberculose; - 370 pacientes negativos para COVID-19. O critério de exclusão é idade menor do que 18 anos. Haverá uso de fontes secundárias (prontuários médico-hospitalares), para coleta de dados de idade, sexo, sintomas e dias de internação. Dos pacientes, será coletado sangue, swab nasal e de orofaringe. Haverá retenção de amostras para estudos subsequentes. O cronograma é adequado, prevendo geração de insumos diagnósticos em um prazo de dois anos. Os recursos serão solicitados ao Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovações. No Projeto de Pesquisa detalham metodologia em pormenores. Informa outras instituições participantes (USP, FIOCRUZ, Instituto Butantã, entre outras), apresentando as respectivas cartas de anuência. Os autores preveem a execução de um orçamento

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2ª Ad S/N 2005

Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901

UF: MG Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4502 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 4.106.014

Outros	Termo_de_anuencia_Flocruz2.pdf	19/06/2020 21:36:33	THICIANY BLENER LOPES	Aceito
Outros	Termo_de_anuencia_Flocruz1.pdf	19/06/2020 21:35:55	THICIANY BLENER LOPES	Aceito
Outros	Termo_de_anuencia_USP.pdf	19/06/2020 21:35:19	THICIANY BLENER LOPES	Aceito
Outros	Termo_de_anuencia_HMT.pdf	19/06/2020 21:28:27	THICIANY BLENER LOPES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Diagnostico_Coronavirus_19Jun 2020.pdf	19/06/2020 21:21:01	THICIANY BLENER LOPES	Aceito
Outros	Parecer_consubiandado.pdf	11/05/2020 19:40:30	THICIANY BLENER LOPES	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Bio Banco	Termo_de_Constituicao_de_Bioreposito rio.pdf	11/05/2020 19:34:33	THICIANY BLENER LOPES	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	11/05/2020 19:28:16	THICIANY BLENER LOPES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Aprovação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 23 de Junho de 2020

Assinado por:
Cristina Garem Palva Fontalnia
(Coordenador(a))

ANEXO E- RESULTADOS DA VALIDAÇÃO EXTERNA DO ELISA COVID-19 IgG CT-VACINAS REALIZADO NO LATED/VDTEC/Bio-Manguinhos

Laboratório de Tecnologia Diagnóstica – LATED/VDTEC/Bio-Manguinhos

Resumo das Atividades Referente às Avaliações do *ELISA COVID-19 IgG CT-Vacinas*

- Racional das Atividades

No âmbito das iniciativas de enfrentamento da pandemia pelo Novo Coronavírus, para as questões de diagnóstico, foram realizadas análises de um conjunto de insumos para a detecção do marcador IgG anti-SARS-CoV-2, enviados pelo CT-Vacinas, tendo como objetivo de ajustar os processos para produção de lotes pilotos, geração de relatório técnico para submissão a ANVISA e escalonamento e estabelecimento, em Bio-Manguinhos, da produção e distribuição do produto.

- Etapa I – Análise do Protótipo Enviado pelo CT-Vacinas

Material Fornecido:

- ✓ Placas sensibilizadas com rPtn;
- ✓ Solução de Lavagem;
- ✓ Diluente de Amostras;
- ✓ Solução de substrato;
- ✓ Conjugado;
- ✓ Solução de Parada;
- ✓ Controles positivos e negativos;
- ✓ Manual de instrução;

Avaliação de um conjunto de amostras caracterizadas por outras metodologias

- ✓ Foram utilizadas 48 amostras positivas (RT-PCR/Sintomas/Teste Rápido) 128 amostras negativas (pré-pandemia).
- ✓ Para a análise dos resultados foram avaliadas duas metodologias para o estabelecimento da linha de corte (cut off): A média mais 3 x DesvPad e Curva ROC, resultados indicados abaixo:

Media mais 3 x DesvPad

Media Neg	SD	CutOff	ZC(-)	ZC(+)
-----------	----	--------	-------	-------

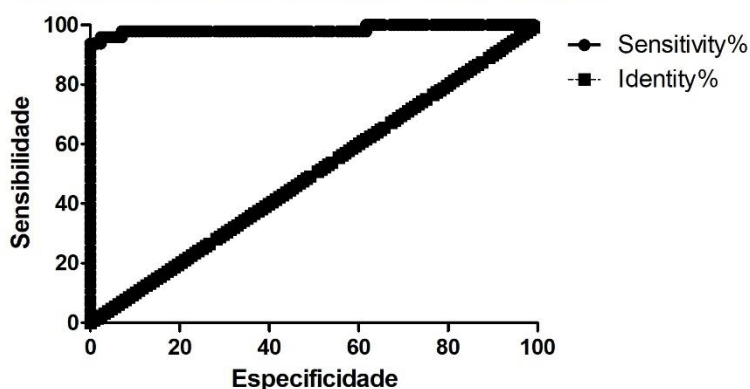
0,1220	0,04786474	0,26562937	0,212503	0,318755
Sensibilidade	IC 95%		Especificidade	IC 95%
94,11%	0,8407-0,9797		97,69%	0,9343-0,9921

Media Neg – Media das Amostras Negativas; SD – Desvio Padrão; Cut Off – Linha de Corte obtida; ZC(-)

Zona Cinza inferior; ZC(+) – Zona Cinza Superior

Curva' ROC

Análise cut-off ELISA COVID-19 CT Vacinas



Media Neg	SD	CutOff	ZC-	ZC+
0,1436	0,01287	0,258	0,2064	0,3096
Sensibilidade	IC 95%		Especificidade	IC 95%
95,73%	85,75% a 99,49		97,66%	93,3% a 99,51%

Media Neg – Media das Amostras Negativas; SD – Desvio Padrão; Cut Off – Linha de Corte obtida; ZC(-)

Zona Cinza inferior; ZC(+) – Zona Cinza Superior

- **Etapa II – Substituição de Insumos**

Com o objetivo de otimização e racionalização na utilização dos insumos e reagentes na composição do teste, foram realizados ensaios visando à comparação e adaptação desses componentes aos similares existentes em Bio-Manguinhos. Abaixo, segue a lista com as principais modificações efetuadas:

- ✓ Placas de poliestireno – Grenier *strips* duplas
- ✓ Estabilizante p/placas sensibilizadas – Kem-Em-Tec

- ✓ Solução Reveladora – TBM Plus Kem-Em-Tec
- ✓ Anti IgG – KPL
- ✓ Peroxidase – Sigma
- ✓ Tampão de amostra Bio-Manguinhos
- ✓ Controle Positivo - Doação
- ✓ Controle Negativo - Doação

- **Etapa III – Padronização de lote protótipo para avaliação ampliada – interna e externa.**

A partir do recebimento de uma partida de proteína recombinante do CT-Vacinas, estamos estabelecendo a confecção de um lote protótipo experimental visando a ampliação das avaliações já na formatação de produto “final”. Também estamos iniciando os processos internos para as formalizações para a construção de árvore de matérias, assim como, os procedimentos e instrução de trabalho para a transferência dessas atividades para a área de produção.

- **Observações & Perspectivas**

Nossas avaliações iniciais do *kit Elisa COVID-19 IgG CT-Vacinas* foram bastante positivas. Frente a um conjunto de amostras previamente caracterizadas, parte com RT-PCR associada a sintomatologia indicativa de infecção por SARS-CoV-2 e sorologia com TR DPP COVID-19 Bio-Manguinhos obtivemos índices de desempenho próximo de 96% de sensibilidade e 98% de especificidade. Em se tratando de experimentos preliminares, com um *n* amostral reduzido, foi possível perceber o potencial para utilização do kit.

Como forma de agilizar a etapa final do desenvolvimento para obtenção do produto, foi possível fazer uma comparação entre os insumos originais e os correspondentes utilizados em Bio-Manguinhos. Estes experimentos comprovaram a viabilidade na utilização de ambos os conjuntos de reagentes como o esperado.

Desta forma, foram iniciados e estão em andamento os ajustes finais em alguns processos, principalmente na conjugação da anti-IgG com peroxidase, afim de confeccionar um lote “protótipo” visando ampliar e finalizar as avaliações internas - com um quantitativo maior de amostras positivas e negativas, assim como painel de amostras de interferentes e de outra doenças infecciosas.

Assim sendo, terminada esta etapa, será possível disponibilizar o kit para avaliações externas cujo *feedback* será de grande importância no entendimento das funcionalidades (desempenho, componentes e instruções de uso) do kit e certamente será de grande valia nos encaminhamentos regulatórios.