



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

**Desenvolvimento e Padronização de um Ensaio Imunoenzimático para
Diagnosticar a COVID-19**

Daniel Ferreira Lair

Novembro/2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

Desenvolvimento e Padronização de um Ensaio Imunoenzimático para Diagnosticar a COVID-19

Daniel Ferreira Lair

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade de Minas Gerais (UFMG) como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti

Coorientador: Prof. Dr. Alexsandro Sobreira Galdino

Coorientadora: Dra. Reysla Maria da Silveira Mariano

Novembro/2022

043

Lair, Daniel Ferreira.

Desenvolvimento e padronização de um ensaio imunoenzimático para diagnosticar a COVID-19 [manuscrito] / Daniel Ferreira Lair. – 2022.
106 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti. Co-orientador: Prof. Dr. Alexsandro Sobreira Galdino. Co-orientadora: Dra. Reysla Maria da Silveira Mariano.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Betacoronavirus. 3. Proteínas Recombinantes. 4. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática. 5. Cromatografia de Afinidade. 6. Bioinformática. I. Giunchetti, Rodolfo Cordeiro. II. Galdino, Alexsandro Sobreira. III. Mariano, Reysla Maria da Silveira. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE DANIEL FERREIRA LAIR

Às **oito horas** do dia **28 de novembro de 2022**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: **"DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE UM ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNOSTICAR A COVID-19"**, requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti	UFMG	Aprovado
Dra. Fernanda Ludolf Ribeiro	Faculdade de Medicina/UFMG	Aprovado
Dra. Roberta Dias Rodrigues Rocha	Centro Universitário Newton Paiva	Aprovado

Pelas indicações, o candidato foi considerado: APROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato 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, 28 de novembro de 2022.

Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti (Orientador)

Dr^a. Fernanda Ludolf Ribeiro

Dr^a. Roberta Dias Rodrigues Rocha

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador



Documento assinado eletronicamente por **FERNANDA LUDOLF RIBEIRO DE MELO, Usuário Externo**, em 29/11/2022, às 16:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Roberta Dias Rodrigues Rocha, Usuário Externo**, em 29/11/2022, às 16:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodolfo Cordeiro Giunchetti, Professor do Magistério Superior**, em 29/11/2022, às 22:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, Coordenador(a)**, em 01/12/2022, às 11:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1928457** eo código CRC **ADBDD859**.

LOCAIS DE REALIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Laboratório de Biologia das Interações Celulares – LBIC – ICB/UFMG

Laboratório de Biotecnologia de Microrganismos – UFSJ

Laboratório de Biologia Estrutural – ICB/UFMG

ORIENTAÇÃO

Orientador: Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti

Coorientador: Dr. Alexsandro Sobreira Galdino

Coorientadora: Dra. Reysla Maria da Silveira Mariano

COLABORADORES

Dra. Reysla Maria da Silveira Mariano (ICB/UFMG)

Dra. Danielle Carvalho de Oliveira Coutinho Martins (ICB/UFMG)

Dra. Mariana Amália Figueiredo Costa (ICB/UFMG)

Dra. Lais Moreira Nogueira (UFSJ)

Dra. Denise da Silveira-Lemos (UNIFENAS/MG)

Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem (ICB/UFMG)

Dr. Kelvinson Fernandes Viana (UNILA)

Dra. Helen Silva Ribeiro (ICB/UFMG)

MSc. Thaiza Aline Pereira Santos (ICB/UFMG)

Ingrid dos Santos Soares Conrado (ICB/UFMG)

Augusto Ventura da Silva (ICB/UFMG)

Dra. Walderez Ornelas Dutra (ICB/UFMG)

AGÊNCIAS FINANCIADORAS

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior

CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa

FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais

CODEMGE – Companhia de Desenvolvimento de Minas Gerais

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti pela oportunidade, orientação e por todos os ensinamentos que contribuíram para meu crescimento acadêmico. Agradeço também a coorientação, apoio e suporte do professor Dr. Alessandro Sobreira Galdino.

Aos colegas do Laboratório de Biologia das Interações Celulares, em especial aos alunos do professor Rodolfo, agradeço pelas parcerias, diálogos, compartilhamento das alegrias, ensinamentos e amizades.

À UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais), em especial ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e seu corpo docente, por todo apoio e ensinamento ao longo do curso.

Agradeço também aos professores que compuseram a banca pelo olhar criterioso sobre o trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) agradeço a concessão de bolsa que permitiu minha dedicação integral aos estudos e a pesquisa. À CODEMG (Companhia de Desenvolvimento de Minas Gerais) agradeço por todo suporte no desenvolvimento deste trabalho. E às demais agências de fomento: CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa) e FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais).

Agradeço, especialmente, a minha família pelo apoio incondicional.

RESUMO

O coronavírus causador da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2) é um novo vírus, que surgiu em Wuhan, província de Hubei na China, no início de dezembro 2019, capaz de causar crises respiratórias leves, moderadas e graves em humanos e, devido a sua alta capacidade de transmissão, rapidamente se tornou uma doença pandêmica, a *Coronavirus disease 2019* (COVID-19). Durante o surto da doença, foi observado que muitos pacientes infectados, apesar de assintomáticos, são capazes de transmitir o vírus para outras pessoas, contribuindo para a disseminação dele. Inicialmente, enquanto não havia vacinas disponíveis para toda a população, a Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs restrição e isolamento social no controle da transmissão do SARS-CoV-2. Como método de diagnóstico, o teste de RT-PCR tem sido empregado, utilizando amostras do trato respiratório superior para a detecção da presença do genoma viral do SARS-CoV-2. Alternativamente, o teste sorológico e testes rápidos reconhecem a presença de anticorpos específicos contra o vírus, depois de pelo menos 14 dias após o aparecimento dos sintomas. Nessa perspectiva, o presente estudo teve por objetivo desenvolver um teste diagnóstico sorológico de baixo custo, alta sensibilidade e alta especificidade, baseando-se em um ensaio imunoenzimático de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Para isso, por meio de abordagens de bioinformática, e expressão heteróloga foram triados antígenos provenientes de proteínas estruturais do SARS-CoV-2 para compor o teste sorológico. Após a sua produção, os antígenos foram validados utilizando-se um painel de amostras de voluntários negativos (RT-PCR negativos) e positivos (amostras obtidas a partir do 15º dia após o diagnóstico positivo por RT-PCR) no qual, foi avaliada a presença de anticorpos específicos IgA, IgM e IgG anti-SARS-CoV-2. Da mesma forma, foram realizados testes comparativos frente aos kits diagnósticos já comercializados e a análise da reatividade de anticorpos após a vacinação com os imunizantes CoronaVac e AstraZeneca. Além disso, foi desenvolvido uma prova de conceito para um teste imunocromatográfico utilizando o antígeno proteico. Dentre os resultados obtidos, destaca-se que a identificação de antígenos peptídicos triados por bioinformática, demonstraram excelente desempenho diagnóstico por ELISA na identificação de anticorpos IgA, IgM e IgG anti-Sars-Cov-2. De forma semelhante, o Antígeno Recombinante 1 demonstrou resultados da reatividade de anticorpos IgA, IgM e IgG anti-Sars-Cov-2, por ELISA, equivalente aos testes sorológicos comerciais (EUROIMMUN, BIOLISA, Allserum, ErbaLisa e Labtest). Além disto, o Antígeno Proteína Recombinante 1 foi capaz de detectar a soroconversão de indivíduos imunizados com a CoronaVac. Estes resultados estimularam a confecção do protótipo do teste rápido imunocromatográfico para detecção de IgG contra Sars-Cov-2 empregando-se o Antígeno Recombinante 1, demonstrando resultados promissores. Diante do exposto, o presente estudo foi capaz desenvolver e padronizar um teste diagnóstico capaz de identificar anticorpos contra a infecção pelo SARS-CoV-2, que se encontra em processo de transferência tecnológica para a iniciativa privada.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; proteínas triadas por bioinformática; proteína recombinante; ELISA; diagnóstico imunocromatográfico.

ABSTRACT

Severe Acute Respiratory Syndrome 2 coronavirus (SARS-CoV-2) is a new virus, which emerged in Wuhan, Hubei Province, China, in early December 2019, capable of causing mild, moderate, and severe respiratory crises in humans. and, due to its high transmission capacity, it quickly became a pandemic disease, the Coronavirus disease 2019 (COVID-19). During the outbreak of the disease, it was observed that many infected patients, despite being asymptomatic, are able to transmit the virus to other people, contributing to the spread of the virus. Initially, while vaccines were not available for the entire population, the World Health Organization (WHO) proposed restriction and social isolation in controlling the transmission of SARS-CoV-2. As a diagnostic method, the RT-PCR test has been used, using samples from the upper respiratory tract to detect the presence of the SARS-CoV-2 viral genome. Alternatively, serological testing and rapid tests recognize the presence of specific antibodies against the virus, after at least 14 days after infection. In this perspective, the present study aimed to develop a low-cost, high-sensitivity and high-specificity diagnostic test, based on an ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) enzyme immunoassay. For this, through bioinformatics approaches, and heterologous expression, antigens from structural proteins of SARS-CoV-2 were screened to compose the serological test. After their production, the antigens were validated using a panel of samples from negative (RT-PCR negative) and positive (samples obtained from the 15th day after positive diagnosis by RT-PCR) volunteers, in which the presence of specific anti-SARS-CoV-2 IgA, IgM and IgG antibodies. Likewise, comparative tests were carried out against the diagnostic kits already marketed and the analysis of antibody reactivity after vaccination with the immunizers CoronaVac and AstraZeneca. In addition, a proof of concept was developed for an immunochromatographic test using the protein antigen. Among the results obtained, it is noteworthy that the identification of peptide antigens screened by bioinformatics showed excellent diagnostic performance by ELISA in the identification of IgA, IgM and IgG anti-Sars-Cov-2 antibodies. Similarly, Recombinant Antigen 1 demonstrated the reactivity of anti-Sars-Cov-2 IgA, IgM and IgG antibodies by ELISA, equivalent to commercial serological tests (EUROIMMUN, BIOLISA, Allserum, ErbaLisa and Labtest). In addition, Recombinant Protein Antigen 1 was able to detect the seroconversion of individuals immunized with CoronaVac. These results stimulated the making of the prototype of the rapid immunochromatographic test for the detection of IgG against Sars-Cov-2 using the Recombinant Protein Antigen 1, showing promising results. Given the above, the present study was able to develop and standardize a diagnostic test capable of identifying antibodies against SARS-CoV-2 infection, which is in the process of technological transfer to the private sector.

Keywords: SARS-CoV-2; bioinformatically screened proteins; recombinant protein; ELISA; immunochromatographic diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. Desenho esquemático da estrutura dos coronavírus.	15
Figure 2. Sequência nucleotídica.	34
Figure 3. Estrutura primária da região C-terminal da proteína N de SARS-CoV-2.	35
Figure 4. Desenho esquemático da Proteína Recombinante 1.	36
Figure 5. Análise de desempenho das placas de ELISA das marcas Costar e Sarstedt.	50
Figure 6. Teste de concentração de antígeno adsorvido em placa de ELISA.	50
Figure 7. Ensaio de reatividade do antígeno #1.12.8.	53
Figure 8. Ensaio de reatividade do antígeno #1.13.9.	54
Figure 9. Ensaio de reatividade do antígeno #1.14.10.	55
Figure 10. Ensaio de reatividade do antígeno #1.15.11.	56
Figure 11. Ensaio de combinação de entre as sequências antigênicas #1.11.7 e 1.21.17.	58
Figure 12. Ensaio de combinação de entre as sequências antigênicas #1.11.7 e 1.22.18.	59
Figure 13. Ensaio de reatividade do antígeno Proteína Recombinante 1 fração insolúvel.	61
Figure 14. Ensaio de reatividade do antígeno Proteína Recombinante 1 fração solúvel.	63
Figure 15. Análise comparativa entre o Kit diagnóstico EUROIMMUN Anti-SARS- CoV-2 ELISA IgA e o antígeno Proteína Recombinante 1 (fração solúvel e insolúvel).	66
Figure 16. Análise comparativa entre o Kit diagnóstico BIOLISA SARS-CoV-2 IgM e o antígeno Proteína Recombinante 1 (fração solúvel e insolúvel).	67
Figure 17. Análise comparativa entre o Kit diagnóstico Allserum SARS-CoV-2 IgM e o antígeno Proteína Recombinante 1 (fração solúvel e insolúvel).	68
Figure 18. Análise comparativa entre o Kit diagnóstico ErbaLisa SARS-CoV-2 IgM e o antígeno Proteína Recombinante 1 (fração solúvel e insolúvel.	69
Figure 19. Análise comparativa entre o Kit diagnóstico BIOLISA SARS-CoV-2 IgG e o antígeno Proteína Recombinante 1 (fração solúvel e insolúvel).	70
Figure 20. Análise comparativa entre o Kit diagnóstico Labtest Anti-SARS-CoV-2 IgG e o antígeno Proteína Recombinante 1 (fração solúvel e insolúvel).	71
Figure 21. Análise comparativa de sorologia anti-SARS-CoV-2 durante o período pré e pós imunização completa pela Coronavac.	73
Figure 22. Análise comparativa de sorologia anti-SARS-CoV-2 durante o período pré e pós imunização completa pela Coronavac.	74
Figure 23. Análise comparativa de sorologia anti-SARS-CoV-2 durante o período pré e pós imunização completa pela AstraZeneca.	76
Figure 24. Análise comparativa de sorologia anti-SARS-CoV-2 durante o período pré e pós imunização completa pela AstraZeneca.	77

Figure 25. Protótipo desenvolvido para a prova de conceito do teste imunocromatográfico rápido.----- 79

Figure 26. Protótipo desenvolvido para a prova de conceito do teste imunocromatográfico rápido.----- 80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Microplacas de poliestireno selecionadas para avaliação. -----	37
Tabela 2. Anticorpos secundários conjugados com Peroxidase (HRP) para avaliação de desempenho no ensaio de ELISA. -----	39
Tabela 3. Combinações antigênicas. -----	42
Tabela 4. Kits diagnósticos sorológicos comerciais contra COVID-19 utilizados para comparar o desempenho da Proteína Recombinante 1. -----	44
Tabela 5. Antígenos provenientes de diferentes regiões do SARS-CoV-2. -----	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CoVs – Coronavírus

RNA – Ribonucleic acid

S – Spike

M – Glicoproteínas de membrana

N – Glicoproteínas de nucleocapsídeo

SARS – Síndrome respiratória aguda grave

MERS – Síndrome respiratória do Oriente Médio

OMS – Organização mundial de saúde

COVID-19 – *Coronavirus disease* 2019

ACE 2 – Enzima conversora de angiotensina II

TMPRSS2 - protease serina transmembranar 2

HLHs - Linfocitose hemofagocítica secundária

IgA – Imunoglobulina A

IgM – Imunoglobulina M

IgG – Imunoglobulina G

SP – São Paulo

MS – Ministério da Saúde do Brasil

JHU – Universidade de medicina John Hopkins

EIB – Instituto Europeu de Bioinformática

NCBI - National Center for Biotechnology Information

CCPD – Centros de Controle de Prevenção a Doença

RT-PCR – Transcrição Reversa Seguida de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

OPAS – Organização Pan-americana de Saúde

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Aspectos gerais relacionados aos Coronavírus.....	15
1.2. O SARS-CoV-2 e a COVID-19	16
1.3. Imunologia relacionado à infecção pelo Coronavírus	18
1.4. Epidemiologia.....	20
1.5. Diagnósticos	22
1.5.1. Diagnóstico molecular	23
1.5.2. Kit autoteste COVID-19.....	24
1.5.3. Diagnóstico sorológico	25
1.6. Programa de vacinação.....	27
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVOS.....	30
3.1. Objetivo geral	30
3.2. Objetivos específicos	30
4. MATERIAL E MÉTODO	31
4.1. Identificação e seleção das sequências antigênicas por Bioinformática.....	31
4.1.1. Obtenção das sequências	31
4.1.2. Predição de epítomos lineares com afinidade pelos receptores de antígenos de células B	31
4.1.3. Predição de antigenicidade	31
4.1.4. Análise de similaridade	31
4.1.5. Síntese das sequências	32
4.1.6. Seleção dos melhores antígenos para compor o teste diagnóstico	32
4.2. Identificação e seleção de sequência antigênica por expressão heteróloga.....	33
4.2.1. Identificação de proteínas do SARS-CoV-2 e seleção dos epítomos	33
4.2.2. Construção da proteína recombinante	33
4.2.3. Expressão e purificação da proteína recombinante	35
4.3. Padronização do ensaio imunoenzimático.....	37
4.3.1. Microplacas	37
4.3.2. Sensibilização da placa com os antígenos selecionados.....	37
4.3.3. Solução para bloqueio	38
4.3.4. Anticorpo primário (amostra de soro)	38

4.3.5. Anticorpo secundário (anti-IgA, anti-IgM e anti-IgG conjugados com HRP)	39
4.3.6. Substrato e cromógeno	39
4.3.7. Leitura da microplaca	39
4.4. Determinação do limiar de positividade (<i>cut-off</i>).....	40
4.5. Determinação da curva ROC.....	40
4.6. Ensaio de validação das sequências antigênicas.....	41
4.7. Ensaio de validação da sequência antigênica por expressão heteróloga em <i>Escherichia Coli</i>	42
4.8. Análise comparativa Proteína Recombinante 1 e kits diagnósticos comercializados	43
4.9. Ensaio de soroconversão de voluntários imunizados com a CoronaVac utilizando o antígeno Proteína Recombinante 1	44
4.10. Ensaio de soroconversão de voluntários imunizados com a AstraZeneca utilizando o antígeno Proteína Recombinante 1	45
4.11. Prova de conceito para o teste imunocromatográfico rápido de fluxo lateral	46
5. RESULTADOS	49
5.1. Protocolo otimizado do ensaio imunoenzimático para validação dos antígenos selecionados.....	49
5.2. Ensaio de identificação das sequências antigênicas por análise de bioinformática	51
5.3. Ensaio de validação da sequência antigênica por expressão heteróloga em <i>E. coli</i>	60
5.4. Análise comparativa Proteína recombinante 1 e kits diagnósticos comerciais ...	64
5.5. Ensaio de soroconversão de voluntários imunizados com a CoronaVac	72
5.6. Prova de conceito para o desenvolvimento do teste imunocromatográfico rápido de fluxo lateral.....	78
6. DISCUSSÃO	81
7. RESUMO DOS RESULTADOS	89
8. CONCLUSÃO.....	91
9. PERSPECTIVAS	92
10. PRODUÇÕES	93
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
12. ANEXOS	105

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais relacionados aos Coronavírus

Os coronavírus (CoVs) compreendem um grupo de organismos submicroscópicos e acelulares pertencentes ao gênero *Coronavirus*, família Coronaviridae (Sahin *et al.*, 2020). Quanto a sua morfologia, os CoVs são envelopados e apresentam uma única fita de RNA⁺. Além disso, apresentam estruturas proeminentes em sua superfície que conferem a esse grupo uma característica semelhante a uma coroa (do latim *corona*) (Baloch *et al.*, 2020). Estas estruturas mencionadas são chamadas de glicoproteínas *Spike* (S) e possuem um papel importante na transmissão e no curso da infecção na célula hospedeira (Shi *et al.*, 2020). Além das glicoproteínas S, os CoVs também apresentam outras estruturas proteicas denominadas glicoproteínas de membrana (M) e glicoproteínas do nucleocapsídeo (N), representadas na Figura 1. Estes vírus apresentam tamanho que varia entre 80 e 160nm (Kannan *et al.*, 2020; Sahin *et al.*, 2020.; Dae-Gyun Ahn *et al.*, 2020).

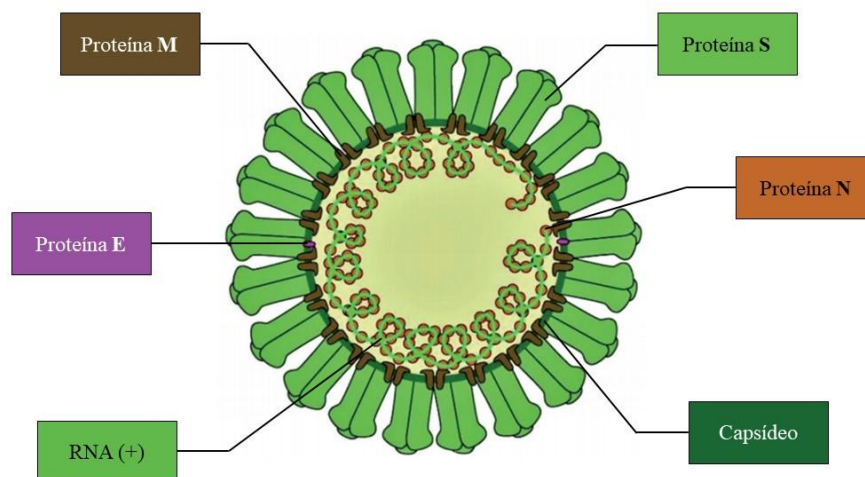


Figure 1. Desenho esquemático da estrutura dos coronavírus. Representação das glicoproteínas: do envelope (E), *Spike* (S), de membrana (M), do nucleocapsídeo (N), RNA e capsídeo. Adaptada de Kannan *et al.* (2020).

Existem quatro principais subgrupos dentro do grupo dos coronavírus: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus* (Woo *et al.*, 2010). Os subgrupos *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus* possuem a capacidade de infectar espécies de mamíferos, sendo o subgrupo *Alphacoronavirus* restrito à infecção em humanos, enquanto o subgrupo *Betacoronavirus* infecta, além de humanos, também morcegos, roedores, suínos e bovino. O subgrupo *Gammacoronavirus* se restringe à infecção em aves e o *Deltacoronavirus* a suínos (Li, 2016).

Os CoVs estão amplamente associados às causas de diversas síndromes respiratórias, tanto em humanos quanto em outros animais, que incluem a Síndrome Respiratória Aguda Severa (SARS) e a Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS). A SARS surgiu no ano de 2002 e, rapidamente, se dispersou pelo mundo. A MERS teve seu primeiro caso reportado no ano de 2012. Ambos os vírus causadores da SARS e MERS podem ser transmitidos de uma pessoa infectada para uma pessoa saudável através de secreções respiratórias (Baloch *et al.*, 2020).

Durante os primeiros surtos da SARS e da MERS, houve um aumento significativo na descoberta e sequenciamento de genomas de coronavírus. Agora é possível a realização de análises genômicas, filogenéticas, evolutivas e de divergência, recombinação e outras análises de bioinformática baseados na família Coronaviridae (Woo *et al.*, 2010).

1.2. O SARS-CoV-2 e a COVID-19

Ao final do ano de 2019, após um grupo de pessoas em Wuhan, China, apresentarem sinais de infecção no trato respiratório com sintomas similares aos causados por vírus da família dos SARS-CoV, a Organização Mundial de Saúde (OMS) anunciou a descoberta de um novo vírus, o SARS-CoV-2. Inicialmente, em janeiro de 2020, a doença causada por este vírus foi nomeada nCoV-2019. Um mês depois, a doença passou a ser conhecida como *Coronavirus disease 2019* (COVID-19) (Pal *et al.*, 2020) e no dia 11 de março de 2020 a OMS declarou a COVID-19 uma pandemia (Samui, Mondal & Khajanchi, 2020). Desde o início do surto, pacientes infectados relataram sintomas como febre, tosse seca, indisposição, dores de cabeça, e dificuldades para respirar, principalmente nos primeiros dias de sintomas, durante a primeira semana de infecção (Vieira *et al.*, 2020). Outros pacientes relataram sintomas não tão comuns, como hemoptise (tosses com sangue) e diarreia (Li *et al.*, 2020).

O SARS-CoV-2 é um vírus membro do gênero *Sarbecovirus*, e possui 79% de semelhança de sequência com o SARS-CoV (Lamers, 2022). As proteínas estruturais que este vírus codifica incluem proteínas de membrana, proteínas do nucleocapsídeo, proteínas de envelope e glicoproteínas *Spike*. Também codifica proteínas não estruturais, a maioria das quais compõem o complexo de replicação e transcrição viral. Um virion encapsulado (ou partícula de vírus) composto de proteínas estruturais e uma bicamada lipídica derivada do hospedeiro, que transporta o RNA genômico viral para a célula (Lamers, 2022).

Os "*Spikes*" na superfície dos coronavírus, que dão a essa família de vírus sua aparência distinta de coroa sob microscopia eletrônica, são constituídos pelas proteínas S. As proteínas S são glicoproteínas de membrana do tipo I contendo peptídeos sinal. Pequenas proteínas transmembranas, conhecidas como envelope, e membrana estão conectadas aos envelopes dos coronavírus. Outro alvo típico para a pesquisa filogenética é o seu nucleocapsídeo, que é semelhante às proteínas conservadas codificadas pelo ORF1ab. Também é um alvo popular para clonagem e produção de proteínas recombinantes para testes sorológicos devido à sua imunogenicidade (Woo *et al.*, 2010).

O contágio pelo SARS-CoV-2, normalmente, acontece por meio de contato direto com amostras biológicas infectadas, comumente representada por gotículas de saliva, e, após inalação, o vírus invade células epiteliais do tecido mucoso da cavidade nasofaríngea (Batty *et al.*, 2021). A nasofaringe, traqueia ou células da mucosa nasal olfativa provavelmente serão as primeiras células que o SARS-CoV-2 terá como alvo durante uma infecção natural em humanos (Lamers, 2022).

A infecção do SARS-CoV-2 em células hospedeiras é permitida devido a ligação das estruturas *Spikes* presentes na superfície do vírus e o nos receptores de enzima conversora de angiotensina II (ACE2), que posteriormente irá induzir a protease da superfície celular do tipo TMPRSS2 (protease serina transmembranar 2) provocando a fusão entre a membrana celular e a membrana viral (Batty *et al.*, 2021). Através da ligação do vírus ao ACE2 há a conversão desse receptor para a síntese do hormônio peptídico angiotensina, acarretando muitos efeitos anti-inflamatórios, podendo implicar na redução da hipertensão, hipertrofia cardíaca, insuficiência cardíaca, dentre outras complicações cardíacas (Batty *et al.*, 2021).

1.3. Imunologia relacionado à infecção pelo Coronavírus

A primeira linha de defesa contra a infecção viral é o reconhecimento do agente a partir de receptores moleculares presentes em sua estrutura proteica a partir de receptores de reconhecimento do sistema imune inato (Lei *et al.*, 2020). Dessa forma, o sistema imune inato sintetiza citocinas pro-inflamatórias que podem iniciar uma resposta inflamatória exacerbada, responsável pelos sintomas da COVID-19 (Azkur *et al.*, 2020). O início habitual dos sintomas do COVID-19 é de 5 a 6 dias após a infecção, embora possa se manifestar entre 2 e 14 dias após a exposição ao vírus (Drain, 2022). Entre os fatores de risco para o desenvolvimento de casos graves para a doença se destacam a idade avançada, hipertensão, diabetes mellitus, doença cardíaca ou pulmonar crônica e imunodeficiência (Salzberger, 2021).

A liberação de citocinas pró-inflamatórias, resultante do contato com o vírus SARS-CoV-2, está relacionada a um evento caracterizado como tempestade de citocinas que, frequentemente, está presente nos casos mais graves e fatais da doença (Pum *et al.*, 2021). Os pacientes com COVID-19 apresentam um perfil de citocinas semelhante ao da linfocitose hemofagocítica secundária (HLHs), uma síndrome hiperinflamatória subestimada, caracterizada por uma hipercitocinemia fulminante e fatal, com falência de múltiplos órgãos. Além disso, níveis mais altos de ferritina e IL-6 encontrados em diversos casos confirmados de COVID-19 revelaram que a hiperinflação induzida por vírus pode ser uma das causas mais comuns de morte (Siracusano, 2020).

Os alvéolos pulmonares, que estão repletos de receptores ACE2, são a próxima parada da infecção viral se o sistema imunológico não conseguir conter seu avanço. A migração de leucócitos nos alvéolos é desencadeada por citocinas, que interrompem as trocas gasosas e causam pneumonia, caracterizada por tosse produtiva, febre e dispneia (Vieira *et al.*, 2020). Pacientes com casos graves da COVID-19 recebem oxigenoterapia utilizando uma cânula nasal de oxigênio de alto fluxo ou intubação orotraqueal e ventilação mecânica como estratégia inicial de tratamento (Lamers, 2022).

Mais recentemente, foi descrito a importância da presença de células Treg circulantes como marcador de sobrevivência à COVID-19 (Gonçalves-Pereira *et al.*, 2022). De forma interessante, pacientes que não sobrevivem a doença apresentaram disfunção das células Treg nos pulmões, com limitada capacidade na produção de IL-10 e altos níveis de IL-17A (Gonçalves-Pereira *et al.*, 2022).

Acerca da resposta imune humoral, similar às infecções virais agudas comuns, o padrão de resposta imunológica se baseia na produção das imunoglobulinas, inicialmente IgA, IgM e, na sequência, os da classe imunoglobulina IgG específicas (Velikova *et al.*, 2020).

A imunoglobulina IgA, é uma subclasse de anticorpo da fase aguda da infecção, e está diretamente relacionada a infecções nos tecidos mucosos do organismo, incluindo os tecidos do trato respiratório, tanto superior quanto inferior, desempenhando um papel fundamental na neutralização de agentes externos ao organismo e na proteção do tecido mucoso através da imunidade (Siracusano, 2020). Também compondo os anticorpos da fase aguda da infecção estão a subclasse de anticorpo IgM. Diferente da classe de anticorpo IgA, o anticorpo IgM possuem alta avidéz por antígenos e se encontra circulante no organismo facilitando a opsonização dos agentes patológicos externos (Galipeau *et al.*, 2020). Ensaio imunodiagnósticos mostram que o acréscimo de resposta humoral IgM específica anti estruturas do nucleocapsídeo e anti estruturas *Spikes* do SARS-CoV-2 chegam ao pico com quatro semanas e não são mais detectáveis após três meses do início da infecção (Siracusano, 2020). Durante a fase crônica ou tardia da infecção, há o acréscimo de anticorpos da subclasse IgG. São anticorpos com alta afinidade por antígenos alvos com a capacidade de neutralizá-los, além de ser uma classe de anticorpo relacionado a imunidade adquirida associado a células B de memória (Galipeau *et al.*, 2020). Testes sorológicos ou imunoensaios revelam a síntese de anticorpos de classe IgG específicos a partir do 14º dia do início da infecção, podendo permanecer circulante na corrente sanguínea por até 36 meses (Galipeau *et al.*, 2020; Siracusano, 2020).

Os anticorpos neutralizantes são importantes para prevenir infecções virais e para limitar a progressão da doença ao longo da fase crônica. Como resultado, esses anticorpos são capazes de prevenir novas infecções virais, com grande potencial de serem implementados como tratamento (Siracusano, 2020).

1.4.Epidemiologia

Desde o primeiro caso da COVID-19 relatado pela OMS na China, em dezembro de 2019, o número de casos de infecção por SARS-CoV-2 aumentou drasticamente. O vírus se espalhou do mercado atacadista de frutos do mar de Huanan, em Wuhan na China. Entretanto, o caminho exato de transmissão do primeiro caso permanece desconhecido (Pekar *et al.*, 2022). Até meados de fevereiro de 2020, frente ao aumento de casos da COVID-19, a China decretou *lockdown*, contribuindo para a drástica redução do número de casos a partir de final de fevereiro de 2020 (Dae-Gyun Ahn *et al.*, 2020).

No final de fevereiro de 2020, o SARS-CoV-2 se espalhou para várias partes da China e do mundo inteiro. A transmissão comunitária aumentou rapidamente em muitas outras nações, apesar do fato de que algumas, como Nova Zelândia e Vietnã, controlaram a disseminação precocemente por meio de medidas intensivas de vigilância epidemiológica. Os modelos de cenários matemáticos previam o desastre que ocorreria na ausência de mecanismos de controle. As previsões desses modelos, juntamente com relatórios do norte da Itália, Londres, Nova York e outras áreas afetadas pela primeira onda, rapidamente levaram as autoridades a decretar *lockdown* para retardar a transmissão viral (Koelle *et al.*, 2022).

Bloqueios, medidas de isolamento social e, eventualmente, o uso de máscaras estavam entre as intervenções não farmacêuticas. Inicialmente o uso de equipamentos de proteção na pandemia ajudou a achatar a curva de novos casos ou alongar o período durante o qual estes casos ocorreram. Havia três benefícios em achatar a curva de novos casos de COVID-19: (i) reduziria o número máximo de leitos que seriam preenchidos a qualquer momento, evitando que o sistema de saúde ficasse sobrecarregado; (ii) reduziria o excesso de casos após o pico do surto, diminuindo a velocidade de transmissão do vírus; (iii) deu tempo para avaliar os medicamentos e aprimorar os planos e a capacidade de atendimento clínico (Koelle *et al.*, 2022).

A maioria dos países europeus registraram uma primeira onda de COVID-19 entre fevereiro e maio de 2020, o que resultou em uma taxa de mortalidade excessivamente significativa. Em muitos países, medidas de controle demonstraram eficácia ao limitar as interações sociais, viagens e comércio, assim ajudando a conter o surto (Salzberger, 2021).

A partir de um brasileiro voltando da Itália que contraiu o SARS-CoV-2, foi relatado o primeiro caso no Brasil, em 26 de fevereiro de 2020 no Estado de São Paulo

(SP). A primeira morte relacionada ao COVID-19, um homem de 61 anos, foi relatada no mesmo estado em 17 de março de 2020. Quatro dias depois, o Ministério da Saúde do Brasil (MS) anunciou um surto generalizado da transmissão comunitária pela COVID-19, após cada estado brasileiro reportar pelo menos um caso confirmado. O vírus já havia se espalhado para áreas remotas em 10 de abril de 2020, incluindo o grupo tribal Yanomami no estado brasileiro de Roraima (Geovanetti *et al.*, 2022). A Organização Mundial da Saúde definiu o surto de SARS-CoV-2 como uma emergência de saúde pública de preocupação global em 30 de janeiro de 2020, e o governo do Brasil decretou restrições para retardar a propagação do vírus. A primeira ação foi distanciamento social, seguido pelo fechamento das escolas, universidades e trabalhos não essenciais (Geovanetti *et al.*, 2022, WHO, 2022).

Manaus, a maior cidade da Amazônia, capital do Estado do Amazonas, serviu como local de destaque para a cobertura da mídia dos efeitos desastrosos do SARS-CoV-2 no Brasil. No início do surto, a cidade registrou um número explosivo de casos com taxas de mortalidade expressivas (Estofolete *et al.*, 2021).

Segundo os dados de pesquisa, até 75% da população do país contraiu SARS-CoV-2 nos primeiros meses de 2020, o que levou os epidemiologistas a levantarem a hipótese de que o surto pode ter sido controlado por imunidade coletiva (Estofolete *et al.*, 2021).

Até o final de 2021, o Brasil teve duas ondas do surto de COVID-19, a primeira de julho a setembro de 2020 e a segunda de fevereiro a junho de 2021. (Cerqueira *et al.*, 2022). O sistema de saúde local entrou em colapso como resultado da segunda onda de casos de COVID-19 que foram causados pelo aparecimento de uma nova cepa do SARS-CoV-2 (Estofolete *et al.*, 2021).

De acordo com a OMS e a Universidade de Medicina Johns Hopkins (JHU), até novembro de 2022, foram relatos mais de 632.953.782 de casos de COVID-19 no mundo. Dentre estes números, cerca de 34.921.054 de casos foram relatados no Brasil. Mundialmente, o número de óbitos ultrapassa 6.593.715. No Brasil, foram reportadas mais de 688.694 mortes causadas pela COVID-19 (Johns Hopkins; WHO, 2022).

Segundo Mahase (2020), a taxa de mortalidade pela doença aumenta de acordo com a idade do paciente, sendo os idosos os mais acometidos, chegando a um percentual de 7,8% nas pessoas acima de 80 anos. Porém, esse número cai substancialmente nos jovens e adultos (0,66%) e nas crianças de 1 a 10 anos de idade (0,0016%). Também se estima que 1% dos pacientes com idade de até 30 anos podem precisar de internação

hospitalar, no mesmo momento em que 1 a cada 5 pacientes acima de 80 anos de idade vão precisar de internação hospitalar (Mahase, 2020).

1.5. Diagnósticos

Inúmeras ferramentas foram criadas ao longo dos anos para analisar o enorme e complicado campo multidisciplinar da bioinformática, onde os dados estão sendo gerados a uma taxa que aumenta continuamente. Desde 1998, o Instituto Europeu de Bioinformática (EIB) tornou o aplicativo mais popular de análise de sequências acessíveis ao público em geral (Goujon *et al.*, 2010). Muitas vezes, as interconexões entre buscas em bancos de dados biológicos moleculares são baseadas em inferências computacionais de similaridade, como conexões entre sequências homólogas em bancos de dados de proteínas e nucleotídeos (Geer *et al.*, 2010).

Atualmente, o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI BioSystems) contém mais de 100.000 dados do BioSystem para busca de banco de dados *online* que lida com genoma, Human Reactome e EcoCyc. Esses registros do BioSystems se conectam a quase 900.000 registros de genes, mais de dois milhões de registros de proteínas e milhares de entradas do PubChem (Geer *et al.*, 2010). Estes dados são fonte importante de informações para a identificação de antígenos aplicados ao desenvolvimento de novas vacinas e diagnósticos contra diversas doenças.

Para o desenvolvimento de novas alternativas diagnósticas, há duas condições fundamentais que devem ser consideradas: a capacidade de detecção de casos verdadeiramente positivos (sensibilidade do teste), bem como a capacidade de definir os verdadeiros negativos (especificidade do teste) (Shapiro, 1999).

Os testes de triagem são frequentemente utilizados para identificar pessoas assintomáticas dentro de áreas com alta probabilidade de endemia. Na maioria dos casos, os testes de triagem são efetivos na detecção de doenças em pessoas assintomáticas (Zanella, 2022).

A coleta de amostras é uma etapa importante no diagnóstico laboratorial da COVID-19. Inicia-se com a captação adequada da amostra, originária do local adequado e no momento perfeito da infecção (fase pré-analítica). Essas medidas de segurança garantem um diagnóstico preciso e resultados confiáveis (Figueiredo, 2022).

O COVID-19 pode ser diagnosticado utilizando dados clínicos, analíticos e radiográficos. A infecção por SARS CoV-2 deve ser verificada por testes laboratoriais

porque os sintomas inespecíficos e as características radiológicas do COVID-19 dificultam o seu diagnóstico (Zanella, 2022).

Como o SARS-CoV-2 é um vírus de RNA, qualquer método de detecção de RNA é, teoricamente, aplicável à sua detecção. Uma estratégia de teste baseada em PCR para SARS-CoV-2 foi uma escolha óbvia, uma vez que esses testes já haviam sido estabelecidos durante o surto do SARS-CoV e do coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (Vanderberg *et al.*, 2021).

A rápida adoção de testes para diagnosticar a COVID-19 exige avaliação crítica e suficiente sobre as barreiras iniciais encontradas ao longo dos processos regulatórios e de desenvolvimento. Exemplos de tais desafios incluem projeto de teste, validação e verificação, permissão para uso emergencial e a produção de kits de teste em grandes quantidades (Vanderberg *et al.*, 2021).

De acordo com as recomendações da OMS e dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CCPD), existem três indicações essenciais para a realização de testes diagnósticos para SARS-CoV-2: (i) independentemente do histórico de vacinação, qualquer pessoa que apresente sintomas de COVID-19 deve fazer o teste para SARS-CoV-2; (ii) os indivíduos assintomáticos que são contatos próximos de alguém com infecção conhecida ou suspeita por SARS-CoV-2 devem ser submetidos a testes de diagnóstico, independentemente de seu *status* de vacinação; (iii) os testes devem ser levados em consideração em indivíduos assintomáticos que estiveram em um ambiente onde há alto risco de transmissão, como uma companhia aérea ou um evento esportivo (Drain, 2022).

1.5.1. Diagnóstico molecular

Dentre os atuais métodos diagnósticos para COVID-19 está a metodologia baseada na técnica de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), a técnica de melhor desempenho para detectar o vírus SARS-CoV-2, que utiliza amostras de secreção coletadas no trato respiratório superior nasofaringe ou orofaringe do paciente (utilizando um *swab*) (Guo *et al.*, 2020). Os genes N, E, S e RdRP são levados em consideração para identificação, e a maioria dos países utiliza o protocolo internacional criado pelo Instituto Charité/Berlim e aconselhado pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS/OMS). Devido à alta taxa de circulação do vírus, a confirmação laboratorial agora é possível com a detecção de apenas um marcador genético em vez do requisito inicial da detecção de dois marcadores genéticos. O gene E

deve ser o gene alvo, de acordo com o Ministério da Saúde do Brasil, devido a sua alta sensibilidade (Vieira *et al.*, 2020).

O ensaio de RT-PCR depende diretamente da presença do genoma viral em quantidades satisfatórias e na coleta correta da amostra no início da infecção, logo nos primeiros dias de sintomas, com o propósito de evitar que se passe o período da replicação viral no organismo e o teste resultar em falso-negativo (Guo *et al.*, 2020). Como mencionado, amostras biológicas de alta qualidade são cruciais para um diagnóstico preciso, e mesmo pequenas variações de qualidade podem levar a resultados falsos negativos ou falsos positivos (Vanderberg *et al.*, 2021). Além de ser uma metodologia trabalhosa, com a realização do teste de forma manual, fazendo com que seja acumulado muitos testes duvidosos, com a necessidade de repetições confirmatórias, impactando principalmente na rede pública de laboratórios. O exame é difícil de administrar e os resultados não estão disponíveis imediatamente (Zanella, 2022). Além disso, de acordo com Yang *et al.* (2020), embora o SARS-CoV-2 possa ser encontrado em todo o trato respiratório (vias aéreas superior e inferior), o vírus possui maior afinidade por células presentes no trato respiratório inferior, constituindo uma limitação do teste. Escarro e lavado bronco alveolar são exemplos de materiais do trato respiratório inferior que são conhecidos por serem mais positivos do que aqueles do trato respiratório superior (swab nasofaríngeo combinado) (Vieira *et al.*, 2020).

Os testes de RT-PCR, em alguns indivíduos, podem continuar positivos por semanas ou meses após a infecção SARS-CoV-2. No entanto, essa positividade raramente denota um vírus que seja competente para replicação e capaz de infectar pessoas (Drain, 2022).

O "padrão ouro" para o diagnóstico da infecção por SARS-CoV-2 é o RT-PCR, considerado extremamente específico. Ainda assim, o resultado negativo não o descarta, porém, pode ser necessário repetir o teste utilizando outra amostra coletada, em outro período de coleta, devido aos problemas de tempo correto da presença do vírus, mencionado acima (Vieira *et al.*, 2020, Guo *et al.*, 2020, Figueiredo, 2022)

1.5.2. Kit autoteste COVID-19

A progressão clínica do COVID-19, a fisiopatologia da infecção aguda por SARS-CoV-2 e a resposta imune do hospedeiro servem de base para os procedimentos do teste diagnóstico (Drain, 2022). Devido à grande expansão dos casos de infecção por SARS-

CoV-2 no mundo, provocando grande colapso sanitário, social e econômico durante a pandemia, principalmente em países mais pobres onde o acesso ao teste molecular de RT-PCR foi insuficiente para atender grande parte da população, surgiu a necessidade do desenvolvimento de kits autoteste. Estes testes são capazes de realizar a detecção da infecção de forma rápida, entre 15 e 30 minutos, além de serem facilmente manipulados pelo próprio usuário em casa, sem a necessidade do auxílio de um profissional da saúde (Rincon, 2021).

Testes diagnósticos rápidos, como testes de urina para detectar gonadotrofina coriônica humana e testes para identificar o vírus da imunodeficiência humana, tornaram-se mais populares nas últimas décadas em locais com muitos ou poucos recursos na área da saúde (Drain, 2022).

Estudos anteriores e o desenvolvimento de ensaios de fluxo lateral realizados durante a pandemia para identificar anticorpos específicos contra o SARS-CoV-2 tem demonstrado ser uma ferramenta confiável para diagnósticos, utilizando amostras de sangue coletadas após 14 dias do início da infecção, e com fácil aceitação social (Tonen-Wolyec, *et al.*, 2020).

A partir disso, em 2021, testes diagnósticos rápidos de detecção de antígeno começaram a ser desenvolvidos. A realização do teste consiste na coleta e utilização de amostras do trato respiratório superior, secreção das mucosas ou saliva, nos primeiros dias de sintomas, no início da infecção, com o objetivo de buscar presença do genoma viral na amostra coletada. A Organização Mundial de Saúde sugere que, para o teste ser realizado, ele deve ser capaz de ter um desempenho superior a 80% de sensibilidade e 97% de especificidade nas amostras testadas (Ramos, *et al.*, 2021).

Agora, comercialmente acessíveis em todo o mundo, há mais de 1.000 diferentes tipos de ensaios moleculares baseados em antígenos para detecção de SARS-CoV-2, incluindo pelo menos 400 tipos de testes diagnósticos rápidos (Drain, 2022).

1.5.3. Diagnóstico sorológico

Um método crucial para determinar a prevalência de COVID-19 em uma população e identificar aqueles que estão imunes e, portanto, potencialmente "protegidos" de contrair a doença é o diagnóstico sorológico (Sethuraman, 2022). Testes diagnósticos baseados em sorologia e investigação de anticorpos específicos representam uma ferramenta essencial para a detecção da COVID-19 (Rashid *et al.*, 2020). As empresas

que produzem reagentes e insumos de diagnóstico laboratoriais começaram a desenvolver testes para pesquisar anticorpos e antígenos relacionados ao vírus, após levar em conta as recomendações da OMS sobre a necessidade de testagem em massa na população, com a disseminação do surto e os desafios atuais para a realização de RT-PCR compatível com a demanda do vírus (Vieira *et al.*, 2020).

A identificação de infecções prévias e imunidade adquirida é possibilitada pela detecção de anticorpos SARS-CoV-2, que é importante para estudos epidemiológicos e de vacinas, vigilância contínua e avaliação do risco para os profissionais de saúde (Xu, 2020).

O organismo responde à presença do vírus da mesma forma que faz com todas as outras infecções virais, gerando anticorpos específicos, inicialmente da classe da imunoglobulina A (IgA), da imunoglobulina M (IgM) e depois os da classe da imunoglobulina G (IgG). Embora a ocorrência de reações cruzadas com outros coronavírus em circulação comunitária não possa ser descartada, a presença de anticorpos específicos contra determinantes antigênicos do SARS-CoV-2 indica que houve infecção prévia. No entanto, por se tratar de um agente infeccioso recém-introduzido na comunidade, essa possibilidade não pode ser descartada o que pode reduzir a sensibilidade dos testes (Galipeau *et al.*, 2020, Vieira *et al.*, 2020)

Quando comparado ao teste molecular, o teste sorológico demanda menos tempo para execução, requer menos experiência técnica e não necessita de equipamentos com tecnologia de ponta. Além disso, utiliza-se amostras de sangue coletadas em tubos, que não expõem o manipulador ao risco de contaminação. Somado ao teste de RT-PCR, o sorodiagnóstico atua de maneira conjunta para confirmar ou não, o contato do paciente com o vírus. Além de oferecer uma alternativa mais acessível aos laboratórios e hospitais públicos menores que não tem acesso a equipamentos e aos conhecimentos necessários para realizar um ensaio molecular. A vantagem dos testes imunológicos baratos é permitir monitorar a população e, em especial os profissionais de saúde, possibilitando que fossem liberados da quarentena e voltassem a sua rotina de trabalho (Rashid *et al.*, 2020)

A atividade da resposta de anticorpos ao SARS-CoV-2 se torna um importante objeto de estudo, pois os anticorpos podem ser ferramentas de diagnóstico úteis, além do diagnóstico molecular baseado em RT-PCR (Siracusano, 2020).

O *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) indireto é uma técnica de detecção qualitativa ou semiquantitativa que imobiliza o antígeno alvo em uma superfície sólida, como por exemplo uma placa de 96 poços, para identificar seu anticorpo

específico. Um anticorpo secundário, marcado com enzima, que muda de cor quando um substrato catalisado por esta enzima está presente, é frequentemente usado para detectar a ligação do anticorpo. A mudança de cor é então observada usando um equipamento de leitura de placas, um espectrofotômetro. A simplicidade e acessibilidade do ensaio ELISA são suas vantagens (Gaspar *et al.*, 2015; Xu, 2020; Pattinson *et al.*, 2022).

1.6. Programa de vacinação

A produção de vacinas contra a COVID-19, capazes de conter esta pandemia sem precedentes, foi marcada por um período com altas taxas de morbidade e mortalidade nos últimos anos, e tornou-se uma prioridade em todo o mundo (Estofolete *et al.*, 2021). Geralmente, existem várias etapas envolvidas no desenvolvimento de vacinas: descoberta, testes pré-clínicos, ensaios clínicos (fases I, II e III), registro e monitoramento do desempenho do produto no mercado (Kanno *et al.*, 2021).

Em 18 de janeiro de 2021, começou o programa nacional de imunização contra COVID-19 no Brasil. Os planos para a implantação foram desenvolvidos nos níveis estadual e local. Os primeiros grupos a serem imunizados foram os idosos e profissionais de saúde, com os requisitos de idade para participação no programa diminuindo ao longo do tempo (Cerqueira *et al.*, 2022). Em meados de abril de 2021, a OMS anunciou o desenvolvimento de 96 imunizantes em diferentes etapas de desenvolvimento (Estofolete *et al.*, 2021).

Um exemplo de vacina empregada é a CoronaVac. Um imunizante desenvolvido e produzido pela empresa chinesa Sinovac utilizando o vírus SARS-CoV-2 na forma inativada (Peiris *et al.*, 2022). Estudos pré-clínicos em macacos da CoronaVac revelaram uma resposta celular de pouca magnitude, sem alterações discerníveis na produção de citocinas de células T e sem alterações nos tecidos do pulmão, coração, baço, fígado, rim e cérebro. Mais significativamente, foi observado uma produção proeminente de anticorpos específicos para o vírus em macacos inoculados com 6 g/dose de CoronaVac demonstrando imunidade frente ao desafio SARS-CoV-2 (Kanno *et al.*, 2021). A imunização em humanos se dá pela aplicação de 0,5mL por dose contendo 600 SU do antígeno do vírus (Coronavac [bula], 2021).

Outro exemplo é a vacina ChAdOx1 nCoV-19 desenvolvida pela Universidade de Oxford (AZD1222). É composta por um vetor adenovírus de chimpanzé com deficiência

de replicação chamado ChAdOx1 que carrega o gene para o antígeno oriundo da glicoproteína de superfície estrutural *Spike* do SARS-CoV-2 (Voysey *et al.*, 2021).

Ambas as vacinas CoronaVac-Sinovac e Oxford-AstraZeneca/Fiocruz tiveram o seu uso autorizado pelo Ministério da Saúde do Brasil (Alencar *et al.*, 2021).

Após uma única dose da vacina Oxford-AstraZeneca, em um estudo recente na Inglaterra envolvendo mais de 160.000 pessoas com mais de 70 anos, mostrou uma diminuição significativa nos casos sintomáticos de COVID-19 e sintomas graves (Alencar *et al.*, 2021).

A incidência da COVID-19 caiu significativamente com a introdução de vacinas eficazes em países desenvolvidos e, na época, o único método para interromper essa pandemia foi um esforço global para a distribuição do imunogênico de forma igualitária (Lamers, 2022).

2. JUSTIFICATIVA

O SARS-CoV-2, agente etiológico da COVID-19, é o mais novo coronavírus que surgiu na província de Wuhan, China, no final de 2019, e que devido a sua alta capacidade de transmissibilidade, rapidamente se espalhou pelo mundo, ocasionando uma pandemia. Até o momento, a doença já afetou mais de 220 países com cerca de 632.953.782 pessoas infectadas e 6.593.715 de óbitos confirmados (OMS, 2022). A pandemia da COVID-19 causou grande impacto social e econômico, devido às restrições e isolamentos sociais preconizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), além do grande número de casos confirmados que sobrecarregaram os sistemas de saúde em todo o mundo.

Atualmente, estão sendo realizados programas de vacinação e o desenvolvimento de novos métodos de tratamento contra a COVID-19. Associado a isso, os testes diagnósticos representam uma ferramenta importante no controle da doença, reduzindo o contágio e, conseqüentemente, evitando que mais pessoas adquiram a doença e necessitem de internação médica.

Levando-se em consideração que o teste diagnóstico molecular não é um procedimento acessível devido à complexidade da técnica e ao seu custo, o teste sorológico representa uma alternativa interessante, especialmente no início deste surto epidêmico, devido a sua praticidade e custo-benefício. Além disto, possibilita o monitoramento de indivíduos infectados assintomáticos, pois mesmo na ausência de sintomas da doença, a transmissão do vírus pode ocorrer nesses indivíduos, contribuindo para a disseminação do SARS-CoV-2. Não menos importante é o fato de o teste sorológico ser capaz de permitir o monitoramento e a confirmação da imunidade adquirida através de vacinação.

Neste contexto, o presente trabalho buscou contribuir para o desenvolvimento de um teste diagnóstico imunoenzimático que possa ser acessível a toda a população, devido ao seu custo reduzido, e que, ainda assim, demonstre um desempenho adequado no diagnóstico sorológico da COVID-19.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Desenvolver um teste diagnóstico imunoenzimático de baixo custo e alto desempenho para a detecção da COVID-19.

3.2. Objetivos específicos

- Identificar potenciais antígenos por análises de bioinformática;
- Identificar potenciais antígenos através da expressão heteróloga por *Escherichia coli*;
- Estabelecer e otimizar um protocolo de ensaio imunoenzimático para validação dos antígenos selecionados;
- Selecionar os melhores antígenos por meio da avaliação de parâmetros de especificidade, sensibilidade e área sob a curva ROC empregando-se um painel de amostras;
- Avaliar o desempenho do ensaio utilizando o antígeno recombinante frente a kits diagnósticos sorológicos comerciais;
- Analisar a soroconversão em amostras de soro de voluntários vacinados com o imunizante CoronaVac e AstraZeneca;
- Desenvolver e padronizar uma prova de conceito de um teste imunocromatográfico de fluxo lateral.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. Identificação e seleção das sequências antigênicas por Bioinformática

4.1.1. Obtenção das sequências

As sequências de aminoácidos da glicoproteína S e do nucleocapsídeo foram obtidas no NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>). As sequências foram convertidas no formato FASTA para posteriores análises. Por motivo de sigilo envolvendo produtos tecnológicos e propriedade intelectual, a identidade dos diferentes antígenos não serão reveladas, conforme recomendação da Coordenadoria de Transferência e Inovação Tecnológica (CTIT) da UFMG.

4.1.2. Predição de epítomos lineares com afinidade pelos receptores de antígenos de células B

As sequências das proteínas selecionadas foram analisadas pelo programa ABCpred (http://crdd.osdd.net/raghava/abcpred/ABC_submission.html) (Saha; Raghava, 2006) para a predição de antígenos com afinidade pelo receptor de antígenos de células B (BCR, do inglês: *B cell antigen receptor*). O programa faz a predição de epítomos contendo 10, 12, 14, 16, 18 e 20 aminoácidos com *threshold* de 0,51 e acurácia de 65,93%. Para a triagem em questão, foi ajustado o parâmetro de busca para epítomos contendo 16 aminoácidos e, para aumentar a especificidade da análise, foram considerados epítomos com um *threshold* acima de 0,85.

4.1.3. Predição de antigenicidade

Após a predição dos epítomos, o programa VaxiJen v2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>) (Doytchinova; Flower, 2008) foi utilizado para determinar a antigenicidade dos epítomos selecionados na última etapa. O programa faz a análise baseado com valor de corte de 0.4 e acurácia de 78% para vírus. Somente epítomos preditos antigênicos foram considerados.

4.1.4. Análise de similaridade

Com a finalidade de impedir a ocorrência de possíveis reações cruzadas e falso-negativos em kits diagnósticos, foi verificado, por meio do programa NCBI Blast+ (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/ncbiblast/>) (Camacho *et al.*, 2009) se os epítomos

selecionados apresentavam similaridade com proteínas de organismos filogeneticamente relacionadas ou não. Foram desconsiderados os epítomos que apresentaram similaridade acima de 60% com proteínas humanas (Carvalho *et al.*, 2011).

4.1.5. Síntese das sequências

As sequências selecionadas através das análises *in silico* foram encaminhadas para uma empresa de síntese de peptídeos (GenOne Biotech, Rio de Janeiro - RJ). Os antígenos já foram recebidos individualmente em criotubos de 1mL (5mg/antígeno) e solubilizados na concentração de 1mg/mL, para então serem armazenados em freezer -20°C. A ressuspensão foi realizada utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) e água Milli-Q e em seguida armazenado em freezer a -20°C.

4.1.6. Seleção dos melhores antígenos para compor o teste diagnóstico

Uma vez que o protocolo imunoenzimático foi estabelecido, foram testados diferentes antígenos. Destes antígenos, os que apresentarem melhor desempenho na curva ROC (parâmetros de área sob a curva, sensibilidade e especificidade) foram triados para uma validação empregando um painel de amostras negativas e amostras positivas. Os antígenos que não apresentarem curva ROC satisfatória, foram combinados a outros antígenos com o objetivo de verificar a ocorrência de melhora no desempenho no teste.

4.2. Identificação e seleção de sequência antigênica por expressão heteróloga

4.2.1. Identificação de proteínas do SARS-CoV-2 e seleção dos epítomos

As sequências de aminoácidos da glicoproteína do nucleocapsídeo foram obtidas do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>). As sequências foram convertidas no formato FASTA para posterior análise.

As sequências das proteínas selecionadas foram analisadas pelo programa ABCpred (http://crdd.osdd.net/raghava/abcpred/ABC_submission.html) (Saha, 2006) para a predição de antígenos com afinidade pelo receptor de antígeno de célula B (BCR, do inglês: *B cell antigen receptor*). Para a triagem em questão, foi ajustado o parâmetro de busca para epítomos contendo 16 aminoácidos e, para aumentar a especificidade da análise, foram considerados epítomos com um *threshold* acima de 0,85.

Feita a seleção dos epítomos com afinidade pelo BCR, o programa VaxiJen v2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>) foi utilizado para determinar a antigenicidade dos epítomos selecionados (Doytchinova, 2008). O programa faz a análise baseado no valor de corte de 0,4 e acurácia de 78%. Somente os epítomos preditos como antigênicos foram considerados. Por fim, com a finalidade de impedir a ocorrência de possíveis reações cruzadas e falsos-negativos em kits de diagnóstico, foi verificado, por meio do programa NCBI Blast+ (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/ncbiblast/>), se os epítomos selecionados apresentavam similaridade com proteínas de outros vírus filogeneticamente relacionados ou não (Camacho *et al.*, 2009).

4.2.2. Construção da proteína recombinante

Foi proposta a utilização do domínio C-terminal da proteína do nucleocapsídeo do SARS-COV-2 para a construção da proteína recombinante. Para a determinação da sequência de resíduos de aminoácidos a ser utilizada, foi considerada a região empregada no trabalho de Qiu *et al.*, (2005). Assim como foram analisadas as regiões dos principais epítomos já evidenciadas para a proteína N do SARS-CoV.

O alinhamento da proteína N do SARS-CoV com a proteína N do SARS-CoV-2 foi realizado com o programa BLAST. Verificou-se que o resíduo de aminoácido 221 do SARS-CoV corresponde ao resíduo de aminoácido 220 do SARS-CoV-2. Além disso, a partir da análise dos principais epítomos identificados na proteína N de SARS-CoV,

verificou-se que um desses é constituído pelos resíduos de aminoácidos 218 a 227 (Wang, *et al.*, 2003). De acordo com o alinhamento das estruturas primárias da proteína do nucleocapsídeo do SARS-CoV e do SARS-CoV-2, evidencia-se que o resíduo de aminoácido 218 do primeiro corresponde ao resíduo de aminoácido 217 do agente etiológico da COVID-19. Portanto, de forma a englobar o epítipo descrito, a região C-terminal da proteína N produzida neste trabalho, consiste dos resíduos de aminoácidos 217 a 419 do SARS-CoV-2, apresentando 203 resíduos de aminoácidos e peso molecular teórico de 22.572,51 (Valor calculado no programa ProtParam (Gasteiger, *et al.*, 2005).

A sequência nucleotídica codificante da proteína N do SARS-CoV-2 foi obtida no banco de dados públicos de sequências genéticas (GenBank) (Benson *et al.* 2013). do National Institutes of Health (NIH) dos Estados Unidos, a partir do genoma referência do SARS-CoV-2, código de acesso NC_045512.2. Dessa sequência, utilizou-se a região codificante dos resíduos de aminoácidos 217 a 419, compreendendo 609 nucleotídeos (Figura 2).

```
GCGGCACTAGCTCTGTTATTGCTTGATAGGTTGAACCAGCTGGAAAGCAAGATGTCC
GGTAAAGGTCAGCAACAACAAGGCCAAACCGTTACTAAGAAGAGTGCTGCGGAAGC
GAGCAAGAAGCCGCGTCAGAAACGTACCGCTACCAAGGCGTATAACGTGACCCAAG
CGTTCCGGCCGTCGTGGTCCGGAACAGACCCAGGGCAACTTCGGTGATCAAGAGCTT
ATCCGCCAAGGTACGGATTACAAACATTGGCCGCAGATTGCGCAGTTTGCACCGTCT
GCCAGCGCCTTCTTTGGCATGTCGCGCATTGGTATGGAGGTGACTCCGTCCGGCAC
CTGGCTGACGTACACCGGTGCGATCAAACCTGGATGATAAAGACCCGAATTTCAAAGA
CCAGGTTATTCTGTTGAATAAACACATCGACGCATATAAACCTTTCTCCGACCGAG
CCGAAAAAGGACAAGAAGAAGAAGGCGGACGAGACACAAGCTCTGCCACAGAGACA
GAAAAAGCAGCAAACCGTCACGCTGTTGCCGGCAGCCGACCTGGACGATTTTAGCA
AACAGTTACAGCAAAGCATGTCTAGCGCGGATTCCACCCAGGCT
```

Figure 2. Sequência nucleotídica. Sequência otimizada para expressão em *Escherichia coli* da região C-Terminal da proteína N de SARS-CoV-2.

Objetivando-se otimizar a expressão da proteína recombinante na célula hospedeira selecionada, os códons originais foram substituídos por códons mais utilizados em *Escherichia coli* (Figura 3).

A sequência nucleotídica otimizada para expressão em *Escherichia coli* foi sintetizada pela empresa GenScript (Central, Hong Kong) específica e clonada no vetor pET29a (+) entre os sítios das enzimas de restrição NdeI e XhoI pela mesma empresa. O

vetor pET29a (+) adiciona uma cauda de histidinas C-terminal à proteína recombinante produzida e confere resistência ao antibiótico Canamicina às bactérias transformadas.

O plasmídeo recombinante foi transformado em *Escherichia coli* BL21(DE3) e o clone foi selecionado em placas de meio LB-ágar contendo o antibiótico Canamicina (50µg/mL). Posteriormente, as bactérias transformadas foram cultivadas em meio LB líquido contendo Canamicina, armazenadas em glicerol a -80°C e utilizadas para expressão da proteína recombinante (Figura 4).

```

AALALLLDRLNQLESKMSGKGQQQGGQTVTKKSAAEASKKPRQKRTATKAYNVTQAF
GRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTDYKHWPIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLT
YTGAIKLDDKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPTEPKDKKKKADETQALPQRQKKQQTV
TLLPAADLDDFSKQLQQSMSSADSTQA

```

Figure 3. Estrutura primária da região C-terminal da proteína N deSARS-CoV-2. Resíduos de aminoácidos 417 a 419.

4.2.3. Expressão e purificação da proteína recombinante

A partir do estoque em glicerol da bactéria transformada com o plasmídeo recombinante, foi realizado um pré-inóculo em meio LB (peptona 1% w/v; extrato de levedura 0,5% w/v; NaCl 0,5% w/v) contendo 50 µg/mL de Canamicina. Após incubação por aproximadamente 16 horas, essa cultura foi transferida em uma diluição de 2.000X para meio auto indutor (Na₂HPO₄ 0,6% w/v; KH₂PO₄ 0,3% w/v; triptona 2% w/v; extrato de levedura 0,5% w/v; NaCl 0,5% w/v; glicerol 0,6% v/v; glicose 0,05% w/v; lactose 0,2% w/v) suplementado com Canamicina. A cultura foi incubada a 37°C e 200 rpm por 24 horas. Em seguida, as células foram recuperadas por centrifugação a 10.000 g por 5 minutos a 4°C e armazenadas a -20°C.

Para a lise, inicialmente as células foram ressuspensas em tampão (Tris 50mM pH 7,5; sacarose 1% w/v; glicerol 1% v/v; Tween 20 1% v/v). A lise foi realizada através de 3 ciclos de homogeneização a uma pressão entre 15.000 e 20.000 psi no equipamento Emulsiflex-C3 (Avestin). O material obtido foi centrifugado a 10.000g, 4°C por uma hora. O sobrenadante (correspondente à fração solúvel) foi diretamente utilizado para purificação da proteína a partir da fração solúvel após filtração do material em membrana de 0,45 µm. Já o *pellet* (correspondente à fração insolúvel) foi solubilizado em tampão contendo 8M de ureia por 16 horas em agitação. Esse procedimento foi seguido de centrifugação a 10.000g, 4°C por uma hora e o sobrenadante dessa última centrifugação

foi filtrado a 0,45 μ m para purificação da proteína recombinante a partir da fração insolúvel.

Para purificação da proteína recombinante, tanto a partir da fração solúvel quanto insolúvel, as amostras provenientes dos procedimentos de centrifugação citados anteriormente foram aplicadas, um de cada vez, em coluna de níquel previamente equilibrada com tampão de ligação (20 mM fosfato de sódio pH 7,4; 500 mM NaCl; 10 mM Imidazol, 1mM PMSF). Para eluição da proteína alvo, foi aplicado um gradiente de tampão de eluição (20 mM Fosfato de sódio pH 7,4; 500 mM NaCl; 500mM Imidazol, 1mM PMSF). Em seguida foi realizada a etapa de dessalinização com a finalidade de retirar o excesso de NaCl e de Imidazol da amostra.

A síntese dos antígenos, bem como todo o projeto foi custeado através de um projeto aprovado em parceria com a Companhia de Desenvolvimento de Minas Gerais (CODEMGE) (Anexo 1).

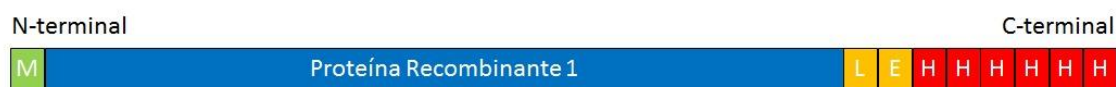


Figure 4. Desenho esquemático da Proteína Recombinante 1. Representação da Proteína Recombinante 1. metionina (M), leucina (L), ácido glutâmico (E) e histidina (H).

4.3. Padronização do ensaio imunoenzimático

O teste diagnóstico é baseado no ensaio de ELISA indireto.

4.3.1. Microplacas

Foram utilizadas microplacas de poliestireno de 96 poços em fundo chato, específicas para ensaios de ELISA, de diferentes fabricantes (Tabela 1), com o objetivo de avaliar o desempenho do teste em microplacas distintas e, assim, buscar alternativas mais baratas para o desenvolvimento do teste. Para a análise de desempenho das placas de ELISA, foram utilizadas pool de amostras: pré-pandemia, IgM positivo, duplo positivo IgM/IgG e PCR+.

Tabela 1. Microplacas de poliestireno selecionadas para avaliação. Placas de 96 poços de fundo chato dos fabricantes Sarstedt e Costar utilizadas durante a padronização do teste imunoenzimático.

Fabricante	Referência	Lote	Custo (R\$) de cada unidade
Sarstedt ELISA-Platte High Bind	82.1582.200	7024611	15,60
Costar Corning Incorporated High Binding	3590	-	43,49

4.3.2. Sensibilização da placa com os antígenos selecionados

A placa foi sensibilizada com diferentes concentrações dos antígenos. As placas sensibilizadas com os antígenos triados por bioinformática foram sensibilizadas partindo de 50ng até 300ng/ poço e as placas sensibilizadas com a proteína recombinante foram sensibilizadas partindo de 1µg até 4 µg/poço, visando estabelecer a menor concentração ideal de antígeno capaz de detectar a presença de anticorpos específicos na amostra a ser testada. Após a sensibilização, a placa permaneceu em geladeira a 4°C *overnight* (16 horas) para a adsorção dos antígenos à placa. Após o período de incubação, a placa foi lavada 3 vezes com 200µL de tampão de lavagem (PBS-T + 0,05% de Tween) por poço com o objetivo de retirar as ligações fracas e antígenos que não se ligaram ao substrato. O procedimento de lavagem se repetiu, quando necessário, após os períodos de incubação. Para o teste de concentração de antígeno adsorvido em placa de ELISA, foram utilizadas pool de amostras: pré-pandemia, IgM positivo, duplo positivo IgM/IgG e PCR+.

4.3.3. Solução para bloqueio

Para o bloqueio da placa, que consiste no preenchimento de regiões nos poços onde não houve adsorção do antígeno a fim de evitar ligações inespecíficas, foram testadas soluções de BSA (*bovine serum albumin*), caseína e leite em pó em diferentes concentrações, partindo de 2%, e em diferentes tempos de incubação, partindo de 30 minutos.

4.3.4. Anticorpo primário (amostra de soro)

Para desenvolver um teste diagnóstico, é fundamental a presença de soros negativos e positivos no intuito de avaliar o quão específico e sensível será o teste. Para tal, foram utilizadas amostras de soro ou plasma coletadas de voluntários no período pré pandemia e, posteriormente, de voluntários previamente triados e caracterizados como negativos por ensaio de RT-PCR específico para a detecção do SARS-CoV-2 para compor o grupo de amostras negativas. Para o grupo de amostras positivas, foram utilizadas amostras de soro ou plasma coletadas de pacientes que apresentaram resultado positivo no teste diagnóstico por RT-PCR (conforme descrito no tópico a seguir “4.6. *Ensaio de validação das sequências antigênicas*”). Tais amostras foram diluídas nas concentrações de 1:50 e 1:100. É importante ressaltar que os soros foram manipulados em cabine de fluxo laminar (modelo Beta CIIA1 – Gransafe) e em sala com circulação de pessoal restrita.

4.3.5. Anticorpo secundário (anti-IgA, anti-IgM e anti-IgG conjugados com HRP)

Para detectar a presença de anticorpos IgA, IgM e IgG específicos na amostra, foram empregados reagentes de diferentes fabricantes (Sigma, Rhea, Abcam, Invitrogen) (Tabela 2) em diferentes diluições de acordo com as informações apresentadas nos *data sheets* dos fabricantes.

Tabela 2. Anticorpos secundários conjugados com Peroxidase (HRP) para avaliação de desempenho no ensaio de ELISA. Anticorpos secundários conjugados com enzima HRP dos fabricantes Sigma, Rhea, Abcam, e Invitrogen de diferentes classes de anticorpos anti-humanos (IgA, IgM e IgG) utilizados para a padronização do ensaio imunoenzimático.

Fabricantes	Referência	Lote
Sigma anti-IgA humano-HRP	SAB3701229	-
Sigma anti-IgM humano-HRP	A6907	SLC6480
Sigma anti-IgG humano-HRP	A8667	089M4847V
Rhea anti-IgA humano-HRP	IM-0831	20120
Rhea anti-IgM humano-HRP	IM-0107	20062
Rhea anti-IgG humano-HRP	IC-1H01	20047
Abcam anti-IgA humano-HRP	ab7220	GR3326090-2
Abcam anti-IgG humano-HRP	ab6759	GR 3238922-7
Invitrogen anti-IgM humano-HRP	A18835	69-42-062819
Invitrogen anti-IgG humano-HRP	62-8420	AU276815
Invitrogen anti-IgG humano-HRP	62-8420	AU276810

4.3.6. Substrato e cromógeno

O cromógeno utilizado com o substrato peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi a tetrametilbenzidina (TMB), fabricado pela empresa Scienco™. No fim do tempo determinado, a reação foi interrompida adicionando-se solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 2M.

4.3.7. Leitura da microplaca

Ao término do ensaio, após adicionar à solução de ácido sulfúrico, a leitura da placa foi realizada através da utilização de um espectrofotômetro com o comprimento de onda ajustado a 450nm (modelo Multiskan Sky - Thermo Scientific).

4.4. Determinação do limiar de positividade (*cut-off*)

O *cut-off* foi determinado pelo *software* MedCalc que, a partir da média dos valores de densidade óptica das amostras negativas e positivas, estabeleceu o ponto de corte. As amostras que apresentaram valor de densidade óptica (DO) maior do que o limiar de positividade foram classificadas como amostras positivas; enquanto as negativas apresentaram valor de DO menor do que o limiar de positividade. O *software* MedCalc® é uma ferramenta amplamente utilizada na medicina laboratorial para fins estatísticos (Garber, 1998). O *software* MedCalc® versão 7.3.0.0 (*MedCalc® Software Ltd*, Ostend, Flandres Ocidental, BE) foi utilizado em todas as análises.

4.5. Determinação da curva ROC

Assim como o *cut-off*, a curva ROC (*Receiver Operating Characteristic Curve*) foi estabelecida através do *software* MedCalc. A curva ROC foi empregada para avaliar o desempenho de testes diagnósticos através dos parâmetros de especificidade (mensura a probabilidade de uma amostra negativa se manter negativa) e sensibilidade (mensura a probabilidade de uma amostra positiva se manter positiva), que variam de 0 a 100%. Além destes parâmetros, a curva ROC utiliza a área sob a curva (sensibilidade *versus* especificidade), que varia de 0 a 1, atuando como uma medida global de desempenho do antígeno utilizado no teste diagnóstico (Hoo, 2017). Os resultados foram organizados em gráficos com auxílio do *software* GraphPad Prism 8.0 (*Prism Software*, Irvine, CA, USA).

4.6. Ensaio de validação das sequências antigênicas

O projeto iniciou-se a partir da obtenção de sequências antigênicas estruturais do vírus SARS-CoV-2 no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>). A partir da predição das sequências e através das análises *in silico*, os antígenos foram produzidos.

Durante a padronização do teste, com o objetivo de minimizar custos e ainda assim oferecer um teste de alta confiabilidade, vários reagentes e insumos foram testados, bem como microplacas de diferentes fabricantes, conjugados anti-IgA, anti-IgM e anti-IgG de diferentes marcas, tempo de incubação, dentre outros.

O critério adotado para avaliar a eficácia dos antígenos se baseou na análise de *Receiver Operating Characteristic Curve* (curva ROC), uma ferramenta bastante utilizada para medir e especificar o desempenho de diagnósticos e fornecer os valores de sensibilidade e especificidade dos antígenos testados (Metz, 1978; Swets, 1988). Os antígenos que demonstraram valores acima de 70% na curva ROC foram considerados de bom desempenho. Assim como o *cut-off*, a curva ROC foi estabelecida através do *Software MedCalc®*.

Todos os ensaios de experimentos realizados neste trabalho estão de acordo com o Comitê de Ética nº 4.124.008 vigente.

Inicialmente, para a realização do projeto, foram avaliados quatro antígenos: #1.12.8, #1.13.9, #1.14.10, #1.15.11. Foram utilizadas amostras de soro de N=46 voluntários adultos (homens/mulheres), sendo N=23 amostras de soro coletadas no período pré-pandemia e N=23 amostras de soro de pacientes que tiveram COVID-19 confirmados pelo teste RT-PCR. As amostras de soro dos pacientes positivos foram coletadas 15 dias após o início dos sintomas. Os antígenos foram avaliados através de três classes de anticorpos: IgA, IgM e IgG.

Com o objetivo de melhorar o desempenho dos antígenos, foram realizadas combinações antigênicas entre os antígenos #1.11.7, #1.21.17 e #1.22.18, avaliados através dos anticorpos secundários anti-IgA e anti-IgG (Tabela 3). Para a realização do ensaio foram utilizadas N= 6 amostras de soro coletadas no período pré-pandemia e N=10 amostras de soro previamente confirmadas como positivo por teste molecular. As amostras de soro dos pacientes positivos foram coletadas 15 dias após o início dos sintomas.

Tabela 3. Combinações antigênicas. Código e fonte das combinações de antígenos de diferentes estruturas do SARS-CoV-2. GN- Glicoproteína *Spike*. GS- Glicoproteína do Nucleocapsídeo.

Código	Fonte	Código	Fonte	Código da Combinação
1.11.7	GS	1.21.17	N	1.11.7 + 1.21.17
1.11.7	GS	1.22.18	N	1.11.7 + 1.22.18

4.7. Ensaio de validação da sequência antigênica por expressão heteróloga em *Escherichia Coli*

Com base nos resultados alcançados utilizando antígenos oriundos de estruturas do SARS-CoV-2 previamente triados, foi realizado uma investigação de novos antígenos, através da expressão heteróloga em *E. coli*. Nesta etapa, o objetivo central foi caracterizar os parâmetros de sensibilidade e especificidade na plataforma diagnóstica de ELISA para detectar anticorpos anti-SARS-CoV-2, empregando-se a Proteína Recombinante 1.

Assim, o antígeno utilizado foi uma proteína recombinante oriunda de proteínas do nucleocapsídeo do SARS-CoV-2. Essa proteína é descrita como uma macromolécula constituída por um domínio N-terminal: responsável pela interação do RNA e um domínio C-terminal que promove a dimerização e uma região flexível de ligação entre esses domínios. Estudos anteriores demonstram que a proteína do nucleocapsídeo é altamente imunogênica e bastante utilizada para a detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2. Porém, esses estudos demonstram que a utilização da proteína do nucleocapsídeo inteira gera reatividade cruzada com soro de voluntários infectados com outros coronavírus. Além disso, estudos demonstram que a porção recombinante C-terminal da proteína do nucleocapsídeo é mais específica e sensível para a detecção de anticorpos contra o SARS-CoV-2 em comparação com a proteína do nucleocapsídeo inteira (Li *et al.*, 2020).

Dessa forma, ocorreu a produção da proteína recombinante através da expressão heteróloga em *Escherichia coli* de uma sequência de domínio de aminoácidos da proteína N somados a porção C-terminal, resultando em duas frações de antígenos, solúvel e insolúvel, da mesma sequência. Após o processo de lise das bactérias, uma parte da proteína recombinante produzida foi detectada na fração solúvel. Entretanto, a maior parte da proteína produzida foi obtida na forma insolúvel, como corpos de inclusão, um processo comum na produção de proteínas recombinantes.

Para a realização da validação das duas frações do antígeno recombinante foi utilizado um painel de amostras de soro de voluntários. Para compor o controle negativo e positivo, foram selecionadas amostras de soro previamente identificadas como negativo e positivo para a infecção por SARS-CoV-2 por teste molecular de RT-PCR respectivamente.

Para o teste de validação da fração insolúvel do antígeno Proteína Recombinante 1 foi utilizado um painel de N=63 amostras de soro de voluntários adultos (homens/mulheres). Dessas amostras, N=21 foram amostras de voluntários previamente identificados pelo teste molecular de RT-PCR como negativo para SARS-CoV-2. Enquanto, N=42 voluntários foram confirmados previamente por teste molecular de RT-PCR como positivos para o vírus. As amostras foram coletadas 15 dias após a confirmação pelo teste molecular.

Para a avaliação da fração solúvel do antígeno Proteína Recombinante 1, foi realizado um ensaio com um painel de N=55 amostras de soro de voluntários adultos (homens/mulheres). Destas amostras, N=16 foram amostras de voluntários previamente identificados pelo teste molecular de RT-PCR como negativo para SARS-CoV-2. Enquanto, N=39 são amostras de voluntários previamente confirmados como positivos pelo teste molecular para SARS-CoV-2.

4.8. Análise comparativa Proteína Recombinante 1 e kits diagnósticos comercializados

Após os resultados obtidos com o antígeno Proteína Recombinante 1 (fração solúvel e fração insolúvel), utilizando amostras de soro de voluntários previamente identificados como negativos e positivos para infecção por SARS-CoV-2 por teste molecular de RT-PCR, foram realizados testes comparativos entre o antígeno Proteína Recombinante 1 fração solúvel e insolúvel e kits diagnósticos comercializados para diagnóstico sorológico por infecção por SARS-CoV-2.

Os ensaios, utilizando os Kits diagnósticos comercializados, foram realizados de acordo com o protocolo recomendado por cada fabricante. Além disso, o protocolo de ensaio do antígeno Proteína Recombinante 1 fração solúvel e insolúvel foi realizado de acordo com a padronização previamente estabelecida.

Para a realização do teste comparativo do antígeno Proteína Recombinante 1 frente a kits diagnósticos comercializados, foram utilizadas painel de N=57 amostras de

soro de voluntários humanos. Para o grupo controle negativo, foram empregadas N=17 amostras de soro de voluntários adultos (homens/mulheres) previamente identificados como negativos para infecção por SARS-CoV-2 por teste molecular de RT-PCR. No grupo positivo, foram utilizadas N= 40 amostras de soro de voluntários previamente confirmados como positivos para a infecção por SARS-CoV-2 por teste molecular de RT-PCR. A linha pontilhada, existente em todos os gráficos, define o limiar de positividade (*cut-off*) do teste, obtido pela análise estatística para estabelecimento da curva ROC, bem como de sensibilidade (demonstrado no gráfico como “SEN”) e especificidade (demonstrado no gráfico como “ESP”) do antígeno avaliado, conforme ilustrados no canto esquerdo superior dos gráficos.

Os kits diagnósticos comercializados testados foram: “EUROIMMUN Anti SARS-CoV-2 IgA” buscando classes de anticorpos IgA específicos para infecção por SARS-CoV-2; “BIOLISA SARS-CoV-2 IgM”, “Allserum SARS-CoV-2 IgM”, e “ErbaLisa SARS-CoV-2 IgM” investigando classes de anticorpos IgM específicos para infecção por SARS-CoV-2; “BIOLISA SARS-CoV-2 IgG” e “Labtest Anti-SARS-CoV-2 IgG” investigando classes de anticorpos IgG específicos para infecção por SARS-CoV-2, conforme a Tabela 4.

Tabela 4. Kits diagnósticos sorológicos comerciais contra COVID-19 utilizados para comparar o desempenho da Proteína Recombinante 1.

Fabricante	Conjugado	Lote
EUROIMMUN	Anti-SARS-CoV-2 IgA	E201127AU
BIOLISA	Anti-SARS-CoV-2 IgM	0009
Allserum	Anti-SARS-CoV-2 IgM	1A21
ErbaLISA	Anti-SARS-CoV-2 IgM	CVM6181
BIOLISA	Anti-SARS-CoV-2 IgG	0009
Labtest	Anti-SARS-CoV-2 IgG	032021

4.9. Ensaio de soroconversão de voluntários imunizados com a CoronaVac utilizando o antígeno Proteína Recombinante 1

A partir dos resultados obtidos pela análise de validação com o antígeno Proteína recombinante 1 utilizando amostras de soro de voluntários humanos caracterizados pelo teste molecular de RT-PCR como negativos e positivos, e posteriormente a análise comparativa entre o antígeno e kits diagnósticos comercializados, surgiu a hipótese que

o antígeno recombinante 1 seria capaz de indicar a soroconversão de anticorpos de voluntários antes e após o período vacinal contra o SARS-CoV-2.

Para a realização do ensaio, foram empregadas amostras de soro de voluntários (VL) adultos (homens/mulheres) funcionários da área da saúde no hospital Julia Kubistchek em Belo Horizonte. As amostras foram coletadas antes da primeira dose e 21 dias após a terceira aplicação do imunizante CoronaVac. Além disso, foram utilizadas N=6 amostras de soro previamente identificadas como negativas para infecção por SARS-CoV-2 através do ensaio molecular de RT-PCR para compor o grupo controle negativo representado por pontos amarelos circulares. E para compor o grupo controle positivo, foram empregadas N=6 amostras de soro de pacientes previamente confirmados como positivos pela análise molecular de RT-PCR. Os gráficos gerados nesta etapa contêm uma linha pontilhada, ilustrando o limiar de positividade (*cut-off*) do teste obtido pela análise estatística para estabelecimento da curva ROC. As análises foram realizadas buscando verificar a reatividade de IgA e IgG, antes e após o período vacinal.

4.10. Ensaio de soroconversão de voluntários imunizados com a AstraZeneca utilizando o antígeno Proteína Recombinante 1

Para a realização do ensaio, foram empregadas amostras de soro de voluntários (VL) adultos (homens/mulheres). As amostras foram coletadas antes da primeira dose e 21 dias após a segunda aplicação do imunizante AstraZeneca. Também, foram utilizadas N=3 amostras de soro previamente identificadas como negativas para infecção por SARS-CoV-2 através do ensaio molecular de RT-PCR para compor o grupo controle negativo. Para compor o grupo controle positivo, foram empregadas N=3 amostras de soro de pacientes previamente confirmados como positivos pela análise molecular de RT-PCR. A linha pontilhada, existente nos gráficos desta etapa define o limiar de positividade (*cut-off*) do teste obtido pela análise estatística para estabelecimento da curva ROC. As análises foram realizadas buscando verificar a reatividade de IgA e IgG, antes e após o período vacinal.

4.11. Prova de conceito para o teste imunocromatográfico rápido de fluxo lateral

Após os resultados obtidos durante os ensaios de validação com o antígeno Proteína Recombinante 1, surgiu a oportunidade do desenvolvimento e padronização de uma prova de conceito para um teste imunocromatográfico rápido.

O desenvolvimento da prova de conceito consistiu na impregnação do antígeno de interesse, compondo a linha teste (anteriormente) e do antígeno, constituindo a linha controle (posteriormente), aplicados com o auxílio de uma micropipeta, à membrana de nitrocelulose (Hi-Flow™ Plus HFC 13502). Esta aplicação seguiu a direção do fluxo que, por sua vez foi sobreposto a um cartão laminado utilizado como suporte (*laminated card* HF000MC100). A linha teste e linha controle, na membrana de nitrocelulose, ficaram *overnight* e em temperatura ambiente para a secagem (Merckmillipore, 2015).

Paralelo a isso, os conjugados IgG teste e controle, foram acopladas covalentemente à superfície de microesferas carboxila (*Estapor® Microsphères* K-030 Azul Merck) através de um protocolo padronizado de ativação para posteriormente serem impregnados a membrana dos conjugados e então sobrepostos ao cartão laminado junto a membrana de nitrocelulose.

Para o protocolo de conjugação, lavagem e ativação das microesferas foi adicionado 100µL de microesferas *Estapor®* (a 10% p/v) em um microtubo de centrifugação. Em seguida, foi adicionado 1mL do tampão de ativação/acoplamento (50mM M pH 6.0). O conteúdo no tubo foi homogeneizado e, em seguida centrifugado a 14.000 rpm por 7 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, sendo esta etapa repetida por mais duas vezes. Ao final da última lavagem, as microesferas foram ressuspendidas em 1mL da solução de tampão de ativação/acoplamento.

Logo após, foram preparados os reagentes de ativação. Para preparar a solução do EDC 200mM, foi adicionado 19,2mg de EDC, a temperatura ambiente, a 500µL de água Milli-Q® em um microtubo. Para preparar a solução Sulfo-NHS 200 mM, foi adicionado 21,7mg de Sulfo-NHS em 500µL de tampão de ativação/acoplamento em um microtubo.

Posteriormente, foi adicionado 24µL da solução EDC 200mM e 240µL da solução Sulfo-NHS 200 mM, recém preparados, no microtubo de microesferas lavadas. E então, a solução passou pelo vórtex e foi incubada por 30 minutos em um homogeneizador.

Passado o período de incubação, o conteúdo no tubo foi centrifugado por 7 minutos a 14.000 rpm seguido do descarte do sobrenadante e ressuspensão com 1mL da

solução tampão de ativação/acoplamento para lavar bem as microesferas. Esta etapa se repetiu por duas vezes. Após a última etapa de descarte do sobrenadante, foi adicionado 700µL da solução tampão de ativação/acoplamento. Para garantir que as microesferas estivessem bem monodispersas antes da adição do anticorpo, o conteúdo no tubo passou por um sonicador de banho por 10 minutos.

Posteriormente, foi preparado o anticorpo a 2mg/mL em solução tampão de ativação/acoplamento. No microtubo com 700µL das microesferas em solução tampão de ativação/acoplamento foi adicionado 300µL do anticorpo (2mg/mL), totalizando em 1mL de solução no microtubo. O conteúdo foi homogeneizado e incubado por 2 horas e 30 minutos em um homogeneizador. Após o período de incubação, foi adicionado 30µL de etanolamina e uma nova incubação por 30 minutos em um homogeneizador.

Em seguida, o conteúdo no microtubo passou por mais uma centrifugação a 14.000 rpm por 7 minutos, e, então, o sobrenadante foi descartado e as microesferas ressuspensas em 1mL da solução de bloqueio (Tris 50mM, pH 8,0, caseína 0,5% (p/v)). O conteúdo ficou em um sonicador de banho por 10 minutos e passou por um novo processo de incubação por 10 minutos em homogeneizador em temperatura ambiente. Após o período de incubação, o conteúdo passou por uma nova centrifugação a 14.000 rpm por 7 minutos, o sobrenadante então, foi descartado e as microesferas ressuspensas em 1mL de solução tampão de bloqueio, seguido por 10 minutos em sonicador de banho. Esta etapa se repetiu por mais duas vezes. Após a etapa final de lavagem, o sobrenadante foi descartado e então as microesferas foram novamente ressuspensas em 1mL de solução tampão de bloqueio. O conteúdo passou por mais uma vez no sonicador de banho e então estava pronto para uso. Esta solução de conjugação em microesferas foi armazenada a 4°C até o uso, que se deu no mesmo dia de sua preparação.

Em uma extremidade do cartão suporte, foi colocada uma fibra de vidro (*glassfiber diagnostic pad sample pad*) e a amostra teste junto a solução de diluição (tampão de corrida). Na outra extremidade foi colocado um filtro de absorção (*absorbent pad*) que absorve o meio líquido que percorre por todo o teste.

Após a sobreposição de todas as membranas e filtros o cartão foi cortado e pôde ser testado. Vale ressaltar que a montagem do teste foi padronizada pelo grupo de pesquisa de forma *in-house* sem equipamentos de corte ou montagem.

Para a realização da prova de conceito, foram utilizadas: amostras de soro de voluntários previamente identificadas como positivo para infecção por SARS-CoV-2 por teste molecular de RT-PCR; amostras positivas em testes sorológicos; assim como

amostras de soro de voluntários previamente confirmadas como negativo por infecção por SARS-CoV-2 por teste molecular de RT-PCR; como também amostras negativas em testes sorológicos. Amostras de soro positivo foram coletadas 15 dias após o início dos sintomas. Período em que é possível captar a presença de anticorpos IgG circulantes (Liu *et al.*, 2020). Para o funcionamento correto, foi adicionado 20µL da amostra teste de soro a membrana de absorção de amostra, e, em seguida, foi adicionado 20µL da solução tampão diluente de amostra. Quando a amostra de soro é adicionada a membrana de absorção de amostra, é absorvida por ação capilar, misturando-se com o conjugado, e assim fluindo através da membrana de nitrocelulose. Na presença de anticorpos anti-SARS-CoV-2 na amostra teste, irá resultar no aparecimento de uma banda teste colorida que indica um resultado positivo. O não surgimento dessa banda, indica um resultado negativo. Por fim, aparecerá uma banda colorida na linha controle, caso o teste tenha sido realizado corretamente. Após a administração da amostra teste e o tampão diluente de amostra, foi aguardado por cerca de 10 minutos até o resultado do teste.

5. RESULTADOS

5.1. Protocolo otimizado do ensaio imunoenzimático para validação dos antígenos selecionados

Para estabelecer e otimizar um ensaio imunoenzimático, foram utilizados insumos e reagentes de diferentes marcas e concentração assim como tempo de incubação, temperatura e diluição.

Dentre as placas testadas, foi definida a utilização de placas de ELISA de 96 poços fundo chato de alta absorção do modelo Sarstedt ELISA-Platte High Bind REF: 82.1582.200 (Figura 5). Através de testes preliminares de ELISA, a sensibilização foi estabelecida: 100ng dos antígenos triados por bioinformática (Figura 6), 4µg do antígeno Proteína Recombinante 1 fração solúvel e 1µg do antígeno Proteína Recombinante 1 fração insolúvel por poço. Também foi definida a utilizando do leite Molico© como a proteína inerte para compor a solução bloqueio em 5% a 37°C por 30 minutos, assim como a diluição da amostra de soro em 1:100 a 37°C por 30 minutos.

Além disso, dentre os anticorpos secundários avaliados para os ensaios seguintes, foi estabelecido a utilização dos anticorpos secundários da marca Sigma na diluição recomendada pelo fabricante no *datasheet*: anti-IgA REF: SAB3701229 (1:10.000), anti-IgM REF: A6907 (1:10.000), e anti-IgG REF: A8667 (1:30.000). também a 37°C por 30 minutos.

É importante ressaltar que a escolha dos reagentes e insumos para otimizar o ensaio imunoenzimático levou em consideração o custo final e eficiência do teste. A seguir serão demonstrado parte dos resultados obtidos durante a padronização e otimização do ensaio imunoenzimático.

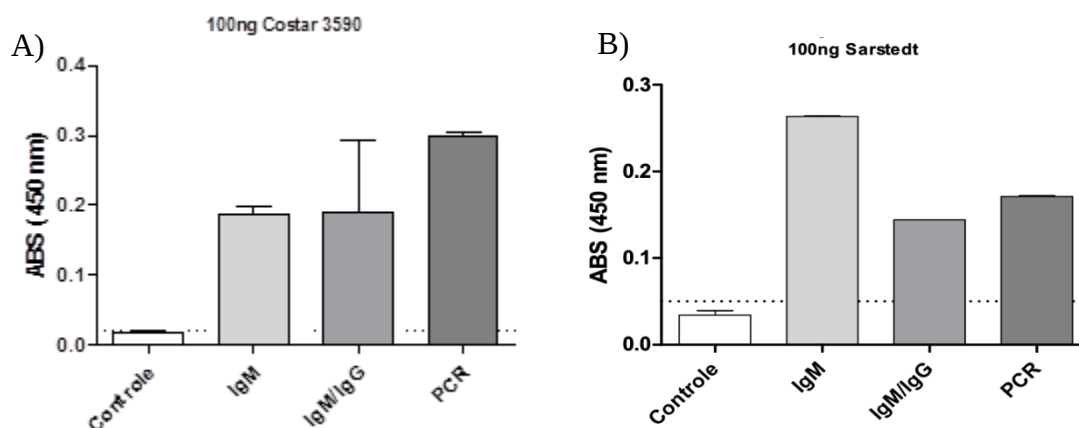


Figure 5. Análise de desempenho das placas de ELISA das marcas Costar e Sarstedt. Placas dos fabricantes Costar 3590 (A) e Sarstedt 82.1582.200 (B) sensibilizadas na concentração de 100ng. Foram utilizadas pool de amostras: pré-pandemia (N=2), IgM positivo (N=5), duplo positivo IgM/IgG (N=5) e PCR+ (N=1). A linha tracejada representa o limiar de positividade (*Cut-off*)

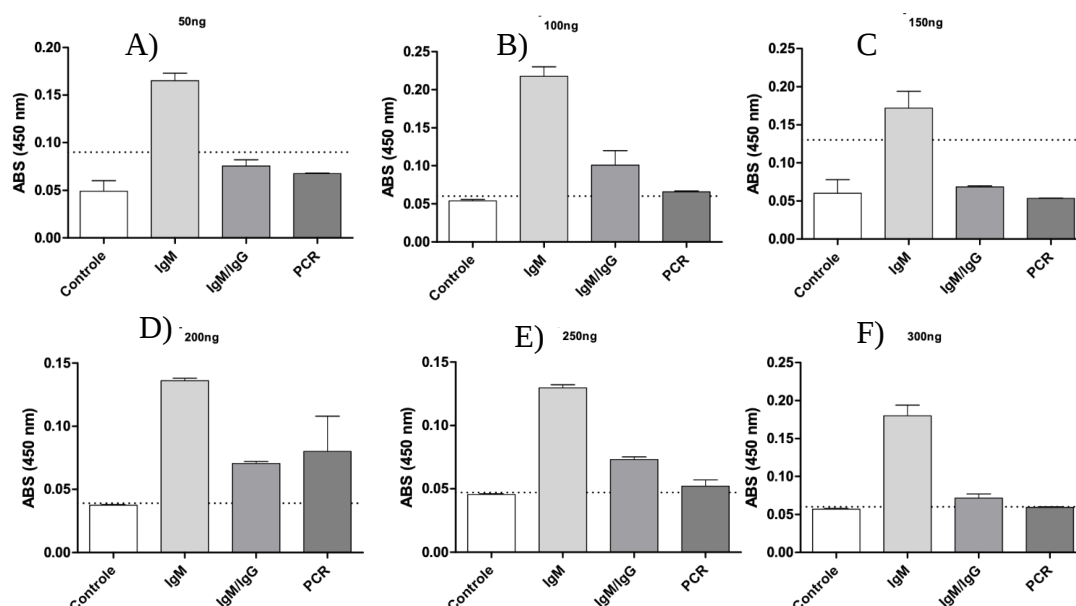


Figure 6. Teste de concentração de antígeno adsorvido em placa de ELISA. Placas sensibilizadas nas concentrações 50ng (A), 100ng (B), 150ng (C), 200ng (D), 250ng (E) e 300ng (F). Foram utilizadas pool de amostras: pré-pandemia (N=2), IgM positivo (N=5), duplo positivo IgM/IgG (N=5) e PCR+ (N=1). A linha tracejada representa o limiar de positividade (*Cut-off*)

5.2. Ensaio de identificação das sequências antigênicas por análise de bioinformática

Abaixo, estão demonstrados os resultados obtidos, ilustrando o desempenho dos diferentes antígenos avaliados para diagnóstico sorológico para COVID-19 (Tabela 5), empregando-se a análise comparativa entre amostras de pacientes pré-pandemia, além de amostras de soro de pacientes que foram confirmados com diagnóstico molecular por RT-PCR para infecção pelo SARS-CoV-2. As análises foram realizadas buscando verificar a reatividade de IgA, IgM e IgG.

Tabela 5. Antígenos provenientes de diferentes regiões do SARS-CoV-2. Os antígenos foram triados por bioinformática a partir dos parâmetros fonte, *score*, antigenicidade e similaridade. GS- Glicoproteínas *Spike* GN- Glicoproteínas do Nucleocapsídeo.

Código	Fonte	Score	Antigenicidade	Similaridade
1.12.8	GS	0,93	0,4636	Não
1.13.9	GS	0,91	0,6333	Não
1.14.10	GS	0,85	0,9425	Não
1.15.11	GN	0,87	0,6163	Não
1.11.7	GS	0,88	0,654	Não
1.21.17	GN	0,87	0,9557	Não
1.22.18	GN	0,85	0,5442	Não

Após a síntese destes antígenos peptídicos, foram realizadas reações de ELISA para análise do seu potencial diagnóstico. Neste sentido, observou-se que o ensaio de ELISA utilizando o antígeno #1.12.8 exibiu área sob a curva superiores a 0,79, indicando uma alta eficiência do teste em diferenciar soros negativos de soros positivos (Figura 7). É importante ressaltar que houve um melhor desempenho no ensaio utilizando os anticorpos secundários IgA (ROC=0,901) e IgG (ROC=0,984). Já para o ensaio utilizando o anticorpo secundário IgM esse valor se demonstra inferior (ROC=0,795). Com relação aos valores de sensibilidade e especificidade foi possível observar um desempenho superior a 70,0, destacando-se os resultados obtidos durante o ensaio utilizando anticorpo secundário IgG (SEN=91,3 e ESP=100,0), em comparação aos resultados obtidos utilizando os anticorpos secundários IgA (SEN=79,3 e ESP=95,7) e IgM (SEN=70,0 e ESP=80,0).

Acerca dos resultados obtidos utilizando o antígeno #1.13.09, foi possível constatar área sob a curva superiores a 0,83 com destaque para os ensaios utilizando

anticorpos secundários IgA (ROC=0,984) e IgG (ROC=0,958) (Figura 8). Quanto aos resultados de sensibilidade e especificidade, o antígeno demonstrou alto desempenho nos ensaios utilizando anticorpo secundário IgA (SEN=91,3 e ESP=100,0) e IgG (SEN=95,7 e ESP=82,6) em comparação ao ensaio utilizando o anticorpo secundário IgM (SEN=90,0 e ESP=75,0).

O antígeno #1.14.10 exibiu área sob a curva superiores a 0,882 com destaque no desempenho dos resultados utilizando o anticorpo secundário IgA (ROC=0,971) e IgG (ROC=0,970) (Figura 9). Em relação aos resultados de sensibilidade e especificidade, foi possível observar um desempenho superior a 80,0, destacando-se os resultados obtidos durante o ensaio utilizando os anticorpos secundários IgA (SEN=100,0 e ESP=82,6) e IgG (SEN=87,0 e ESP=95,7) em relação ao resultado obtido utilizando o anticorpo secundário IgM (SEN=85,0 e ESP=80,0).

Paralelo a estes resultados, o ensaio de ELISA utilizando o antígeno #1.15.11 revelou área sob a curva superiores a 0,780, demonstrando melhor desempenho nos ensaios utilizando o anticorpo secundário IgA (ROC=0,953) e IgG (ROC=0,978) em referência ao ensaio utilizando o anticorpo secundário IgM (ROC=0,780) (Figura 10). No que diz respeito ao desempenho de sensibilidade e especificidade, o antígeno exibiu um desempenho superior a 70,0, destacando os resultados utilizando os anticorpos secundários IgA (SEN=78,3 e ESP=100,0) e IgG (SEN=87,0 e ESP=100,0) em comparação ao resultado da busca por anticorpos da classe IgM (SEN=80,0 e ESP=70,0).

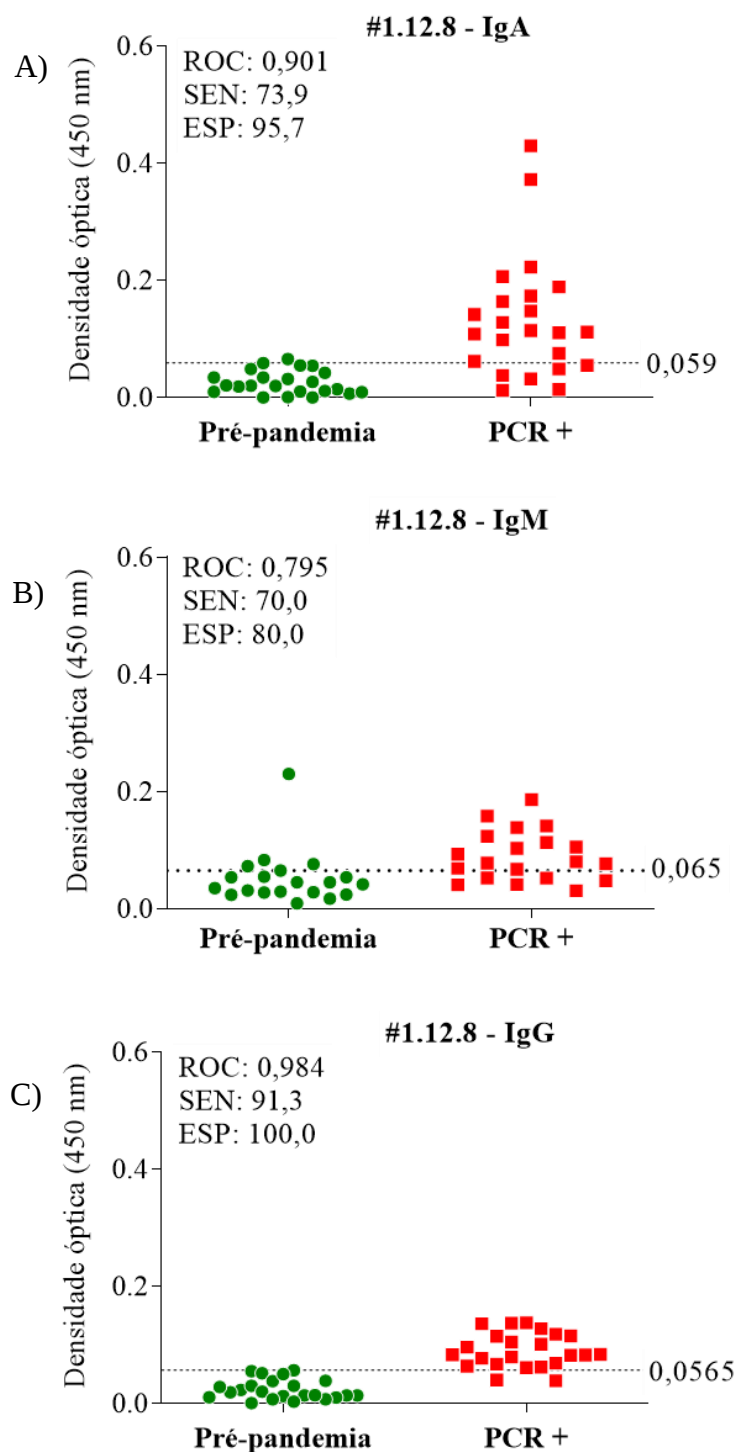


Figure 7. Ensaio de reatividade do antígeno #1.12.8. Placas foram sensibilizadas com 100ng do antígeno #1.12.8. Paineis de amostras de soro de voluntários Pré-pandemia (pontos circulares verdes, N= 23), e amostras PCR+ (pontos quadrados vermelhos, N=23). ROC = área sob a curva, SEN = percentual de sensibilidade e ESP = percentual de especificidade. (A) anticorpos secundários IgA (1:10.000), (B) anticorpo secundário IgM (1:10.000), (C) anticorpo secundário IgG (1:30.000). A linha tracejada representa o limiar de positividade (*Cut-off*) estabelecido pela curva ROC.

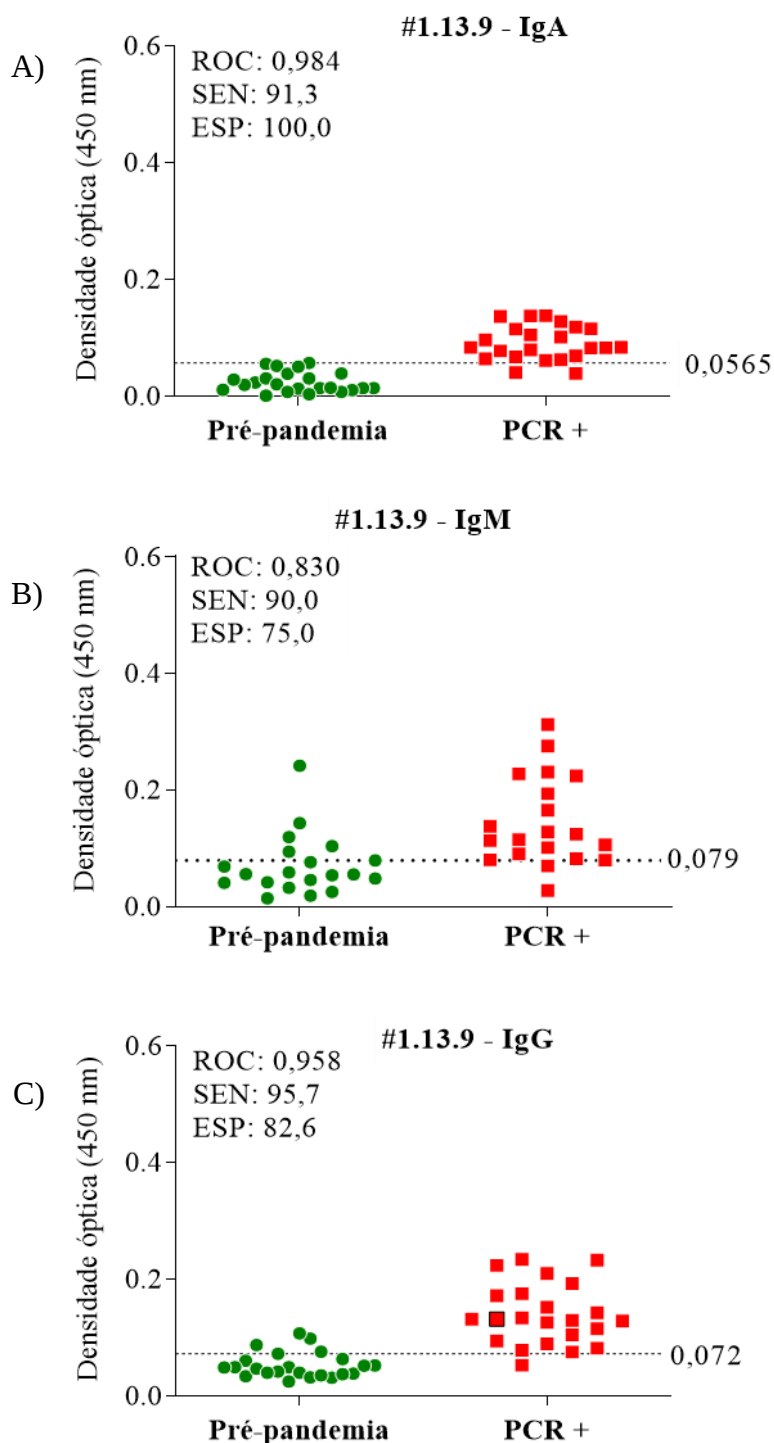


Figure 8. Ensaio de reatividade do antígeno #1.13.9. Placas foram sensibilizadas com 100ng do antígeno #1.13.9. Painel de amostras de soro de voluntários Pré-pandemia (pontos circulares verdes, N= 23), e amostras PCR+ (pontos quadrados vermelhos, N=23). ROC = área sob a curva, SEN = percentual de sensibilidade e ESP = percentual de especificidade. (A) anticorpos secundários IgA (1:10.000), (B) anticorpo secundário IgM (1:10.000), (C) anticorpo secundário IgG (1:30.000). A linha tracejada representa o limiar de positividade (*Cut-off*) estabelecido pela curva ROC.

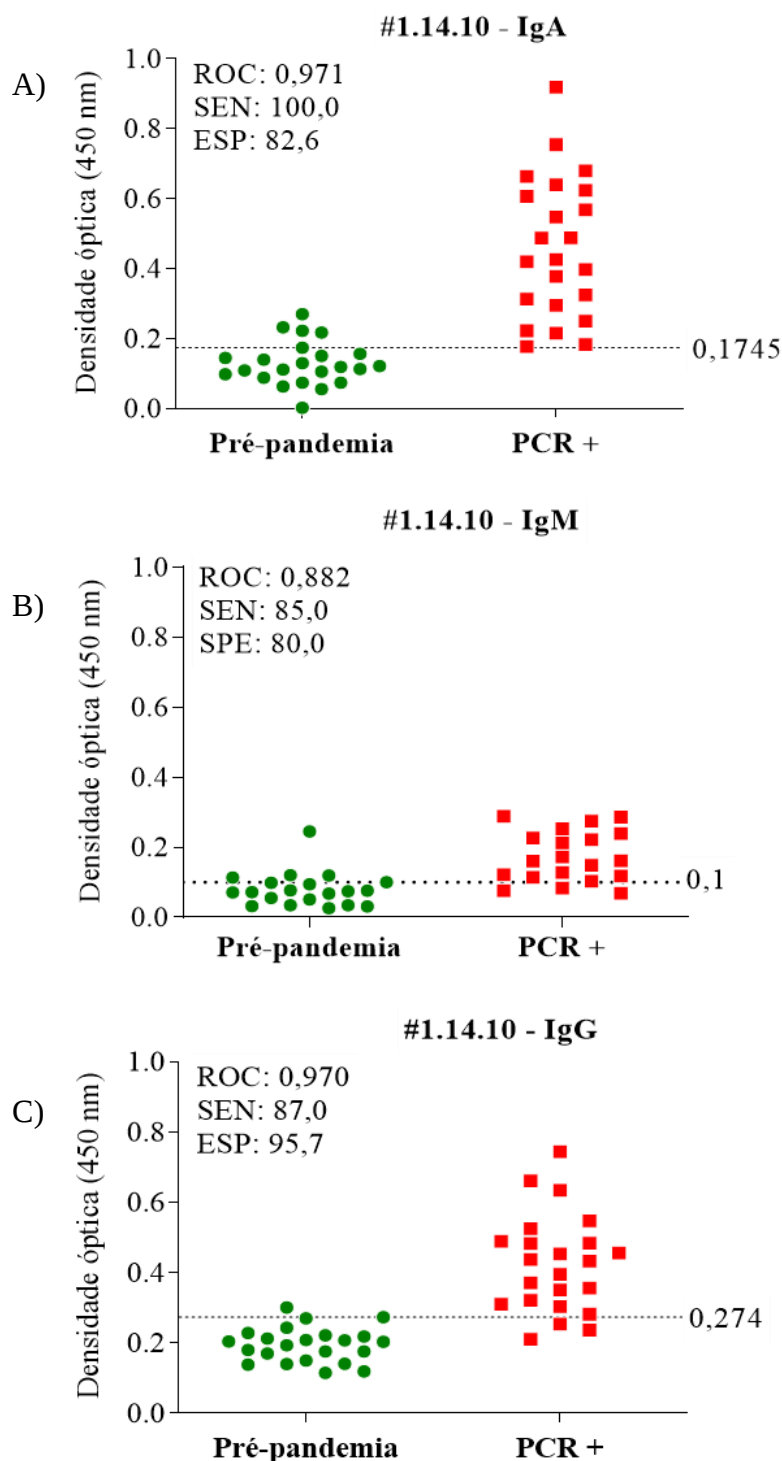


Figure 9. Ensaio de reatividade do antígeno #1.14.10. Placas foram sensibilizadas com 100ng do antígeno #1.14.10. Paineis de amostras de soro de voluntários Pré-pandemia (pontos circulares verdes, N= 23), e amostras PCR+ (pontos quadrados vermelhos, N=23). ROC = área sob a curva, SEN = percentual de sensibilidade e ESP = percentual de especificidade. (A) anticorpos secundários IgA (1:10.000), (B) anticorpo secundário IgM (1:10.000), (C) anticorpo secundário IgG (1:30.000). A linha tracejada representa o limiar de positividade (*Cut-off*) estabelecido pela curva ROC.

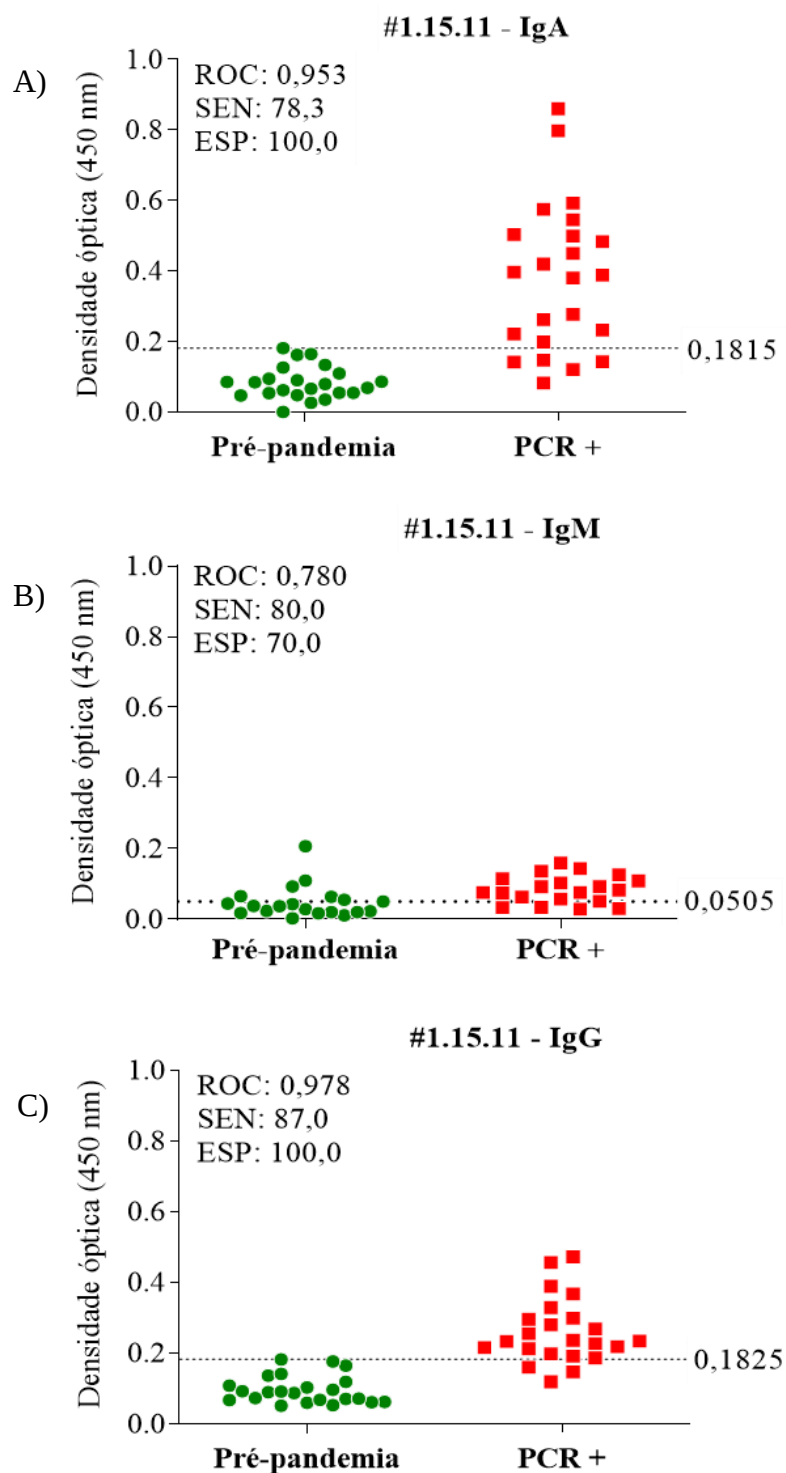


Figure 10. Ensaio de reatividade do antígeno #1.15.11. Placas foram sensibilizadas com 100ng do antígeno #1.15.11. Paineis de amostras de soro de voluntários Pré-pandemia (pontos circulares verdes, N= 23), e amostras PCR+ (pontos quadrados vermelhos, N=23). ROC = área sob a curva, SEN = percentual de sensibilidade e ESP = percentual de especificidade. (A) anticorpos secundários IgA (1:10.000), (B) anticorpo secundário IgM (1:10.000), (C) anticorpo secundário IgG (1:30.000). A linha tracejada representa o limiar de positividade (*Cut-off*) estabelecido pela curva ROC. Combinações antigênicas

A seguir, serão demonstrados os resultados obtidos, ilustrando o desempenho das combinações de diferentes antígenos que não demonstraram bons resultados, avaliados para diagnóstico sorológico para COVID-19, empregando-se a análise comparativa entre amostras de pacientes humanos pré-pandemia, e amostras de soro de pacientes que foram confirmados com diagnóstico molecular por RT-PCR para infecção pelo SARS-CoV-2. As análises foram realizadas buscando verificar a reatividade de IgA e IgG.

As combinações entre os antígenos #1.11.7, que na busca por anticorpos da classe IgA, demonstrou SEN: 90,0, ESP: 83,3 e área sob a curva: 0,900 somando ao antígeno 1.21.17, que na busca por anticorpos da classe IgA, demonstrou SEN: 70,0, ESP: 100,0, e área sob a curva: 0,883, resultou em um antígeno que alcançou SEN: 90,0, ESP: 100,0, e área sob a curva: 0,967 na busca de anticorpos da classe IgA. As combinações entre os antígenos #1.11.7, que na busca por anticorpos da classe IgG, demonstrou SEN: 100,0, ESP: 66,7 e área sob a curva: 0,850 somando ao antígeno 1.21.17, que na busca por anticorpos da classe IgG, demonstrou SEN: 80,0, ESP: 50,0, e área sob a curva: 0,575, resultou em um antígeno que alcançou SEN: 100,0, ESP: 100,0, e área sob a curva: 1,0 na busca de anticorpos da classe IgG (Figura 11).

As combinações entre os antígenos #1.11.7, que na busca por anticorpos da classe IgA, demonstrou SEN: 90,0, ESP: 83,3 e área sob a curva: 0,900 somando ao antígeno 1.22.18, que na busca por anticorpos da classe IgA, demonstrou SEN: 100,0, ESP: 60,0, e área sob a curva: 0,840, resultou em um antígeno que alcançou SEN: 90,0, ESP: 100,0, e área sob a curva: 0,983 na busca de anticorpos da classe IgA. As combinações entre os antígenos #1.11.7, que na busca por anticorpos da classe IgG, demonstrou SEN: 100,0, ESP: 66,7 e área sob a curva: 0,850 somando ao antígeno 1.22.18, que na busca por anticorpos da classe IgG, demonstrou SEN: 100,0, ESP: 80,0, e área sob a curva: 0,880, resultou em um antígeno que alcançou SEN: 100,0, ESP: 100,0, e área sob a curva: 1,0 na busca de anticorpos da classe IgG (Figura 12).

Diante do exposto, após o ensaio de combinação entre as sequências antigênicas, foi possível observar uma melhora sensível nos parâmetros de área sob a curva, sensibilidade e especificidade entre todas as combinações peptídicas.

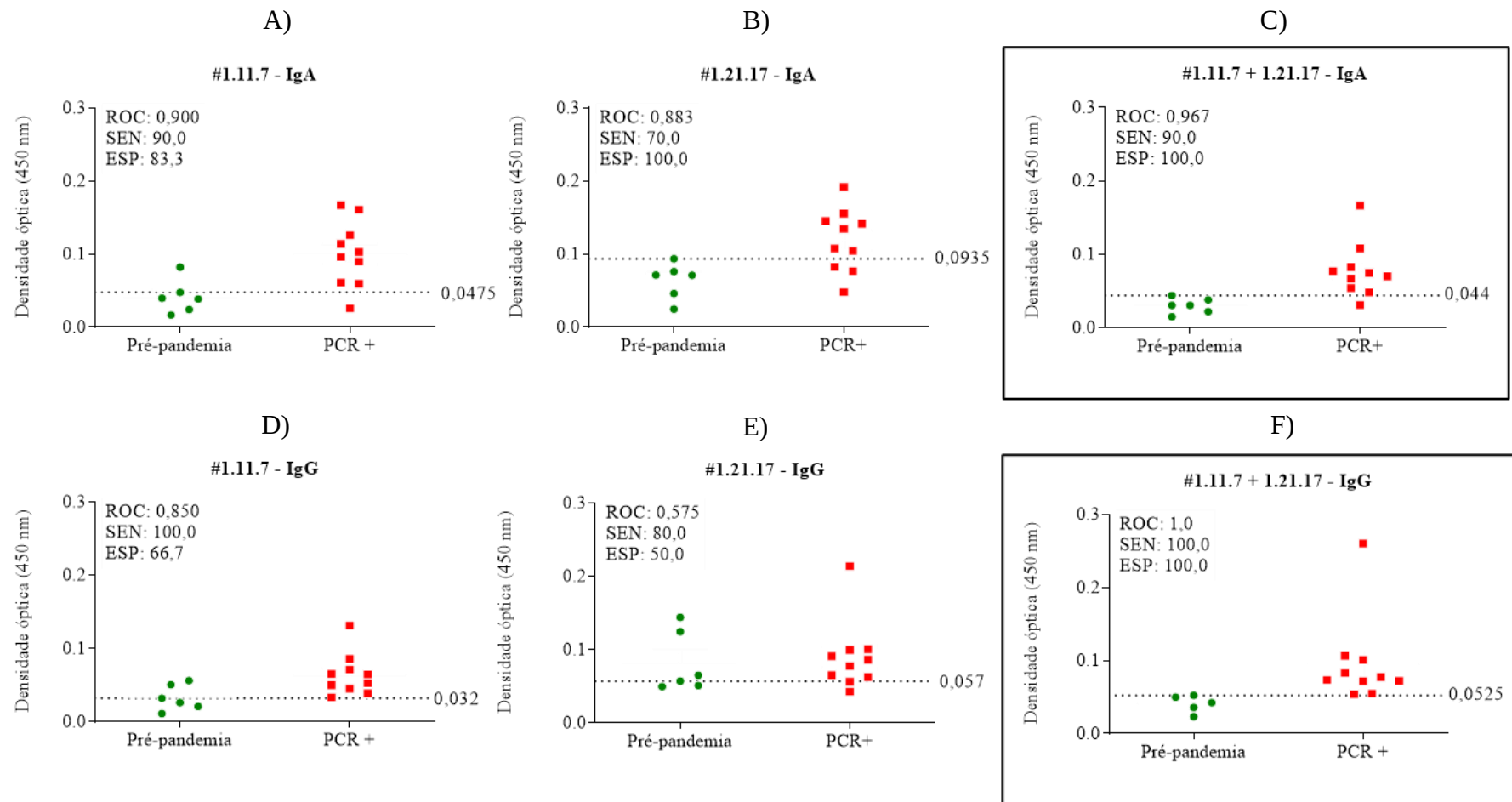


Figure 11. Ensaio de combinação de entre as sequências antigênicas #1.11.7 e 1.21.17. Placas foram sensibilizadas com 100ng do antígeno #1.11.7 IgA (1:10.000) (A) e IgG (1:30.000) (D), e 100ng do antígeno #1.21.17 IgA (1:10.000) (B) e IgG (1:30.000) (E). O resultado da combinação dos antígenos #1.11.7 e #1.21.17 IgA (1:10.000) (C) e IgG (1:30.000) (F). Paineis de amostras de soro de voluntários Pré-pandemia (pontos circulares verdes, N=6) e amostras PCR+ (pontos quadrados vermelhos, N=10). ROC = área sob a curva, SEN = sensibilidade, ESP = especificidade. A linha tracejada representa o limiar de positividade (*Cut-off*) estabelecido pela curva ROC.

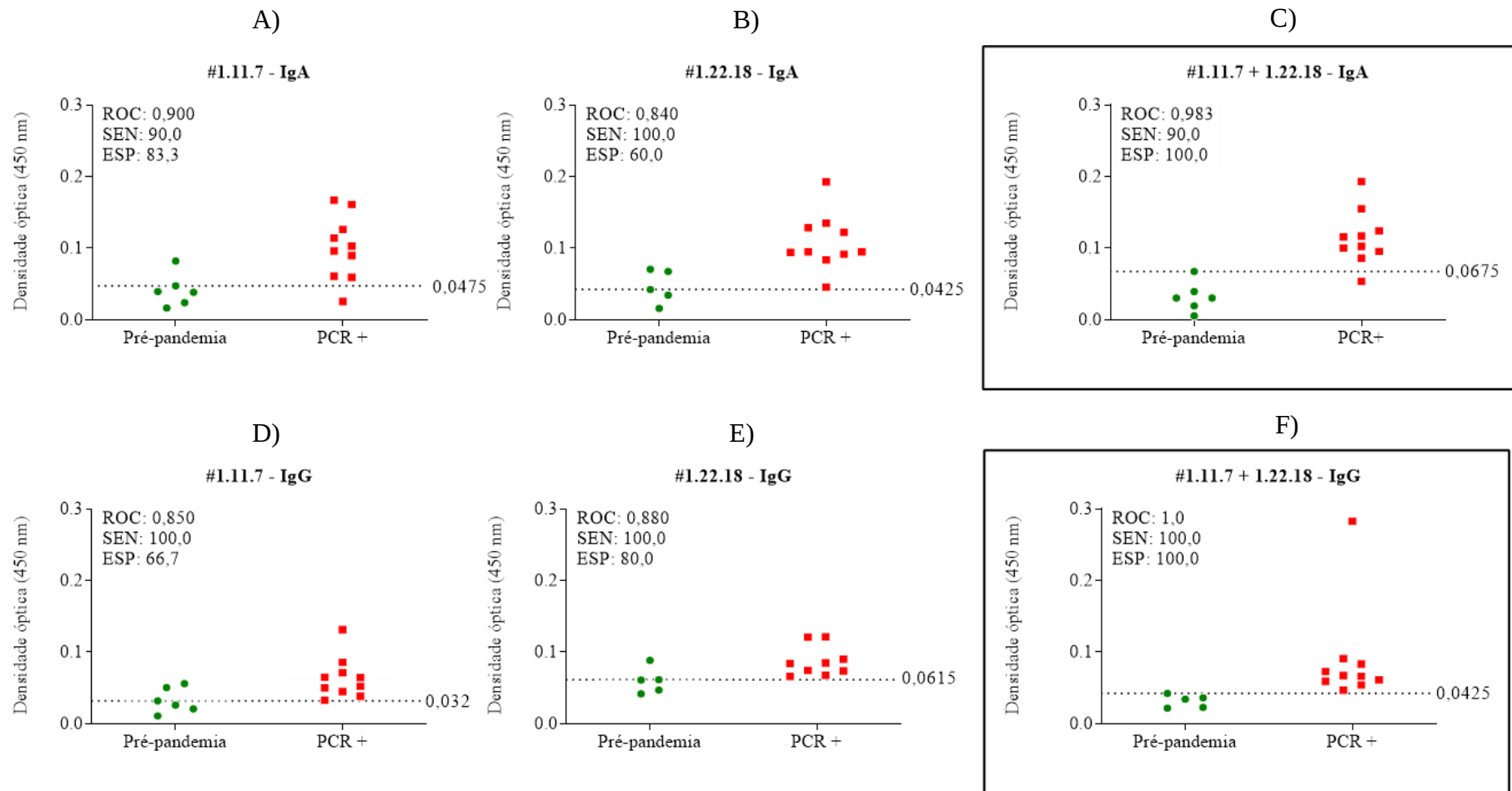


Figure 12. Ensaio de combinação de entre as sequencias antigênicas #1.11.7 e 1.22.18. Placas foram sensibilizadas com 100ng do antígeno #1.11.7 IgA (1:10.000) (A) e IgG (1:30.000) (D), e 100ng do antígeno #1.22.18 IgA (1:10.000) (B) e IgG (1:30.000) (E). O resultado da combinação dos antígenos #1.11.7 e #1.22.18 IgA (1:10.000) (C) e IgG (1:30.000) (F). Paineis de amostras de soro de voluntários Pré-pandemia (pontos circulares verdes, N=6) e amostras PCR+ (pontos quadrados vermelhos, N=10). ROC = área sob a curva, SEN = sensibilidade, ESP = especificidade. A linha tracejada representa o limiar de positividade (*Cut-off*) estabelecido pela curva ROC.

5.3. Ensaio de validação da sequência antigênica por expressão heteróloga em *E. coli*

Adiante, estão apresentados os resultados alcançados, demonstrando a atuação do antígeno “Proteína Recombinante 1”, fração insolúvel (Figura 13), cotado para diagnóstico sorológico para COVID-19, aplicando a análise comparativa entre amostras de pacientes humanos, caracterizados como negativos para a infecção por SARS-CoV-2, além de amostras de soro de pacientes que foram confirmados com diagnóstico molecular por RT-PCR para infecção pelo SARS-CoV-2. Cada ponto colorido no gráfico representa uma amostra diferente, para ser possível a visualização do comportamento da mesma amostra em diferentes antígenos e condições. As análises foram realizadas buscando verificar a reatividade de IgA, IgM e IgG.

Observou-se que o antígeno Proteína Recombinante 1 fração insolúvel exibiu resultados de área sob a curva superiores a 0,795, vale ressaltar o melhor desempenho nos resultados das buscas de anticorpos das classes IgA (ROC=0,971) e IgG (ROC=0,994) (Figura 11). Em relação aos parâmetros de sensibilidade e especificidade, o antígeno apresentou um desempenho superior a 0,53, se destacando na busca por anticorpos das classes IgA (SEN=95,2 e ESP=95,2) e IgG (SEN=97,0 e ESP=100,0) em relação aos resultados obtidos na busca por anticorpos da classe IgM (SEN=53,0 e ESP=100,0). Indicando uma alta eficiência do teste em diferenciar soros negativos de soros positivos.

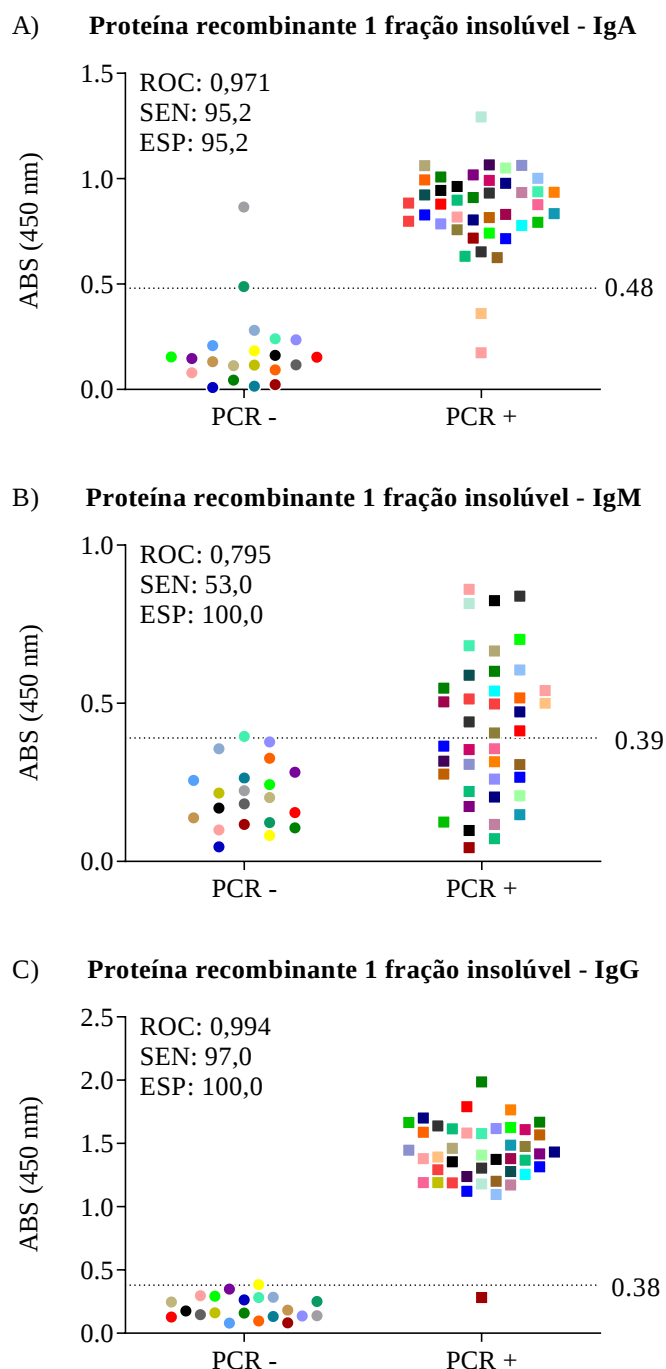


Figure 13. Ensaio de reatividade do antígeno Proteína Recombinante 1 fração insolúvel. Placas sensibilizadas com 1µg da fração insolúvel do antígeno Proteína Recombinante 1. Pannel de amostras de soro de voluntários PCR- (N=21) e PCR+ (N=42), representados por pontos coloridos para avaliação de cada amostra. ROC = área sob a curva, SEN = sensibilidade, ESP = especificidade. (A) anticorpo secundário IgA (1:10.000), (B) anticorpo secundário IgM (1:10.000) e (C) anticorpo secundário IgG (1:30.000). A linha tracejada representa o limiar de positividade (*Cut-off*) obtido pela curva ROC.

A seguir, estão demonstrados os resultados obtidos, demonstrando o desempenho do antígeno “Proteína Recombinante 1”, fração solúvel, avaliado para diagnóstico sorológico para COVID-19, empregando-se a análise comparativa entre amostras de pacientes identificados como negativos para a infecção por SARS-CoV-2, além de amostras de soro de pacientes que foram confirmados com diagnóstico molecular por RT-PCR para infecção pelo SARS-CoV-2. Cada ponto colorido no gráfico representa uma amostra diferente, para ser possível a visualização do comportamento da mesma amostra em diferentes antígenos e condições. As análises foram realizadas buscando verificar a reatividade de IgA, IgM e IgG.

Observou-se que o antígeno Proteína Recombinante 1 fração solúvel exibiu resultados de área sob a curva superiores a 0,719, vale ressaltar o melhor desempenho nos resultados das buscas de anticorpos das classes IgA (ROC=0,995) e IgG (ROC=0,995) (Figura 14). Em relação aos parâmetros de sensibilidade e especificidade, o antígeno apresentou um desempenho superior a 0,61, destacando-se na busca por anticorpos das classes IgA (SEN=94,9 e ESP=100,0) e IgG (SEN=97,4 e ESP=100,0) em relação aos resultados obtidos na busca por anticorpos da classe IgM (SEN=61,5 e ESP=87,5).

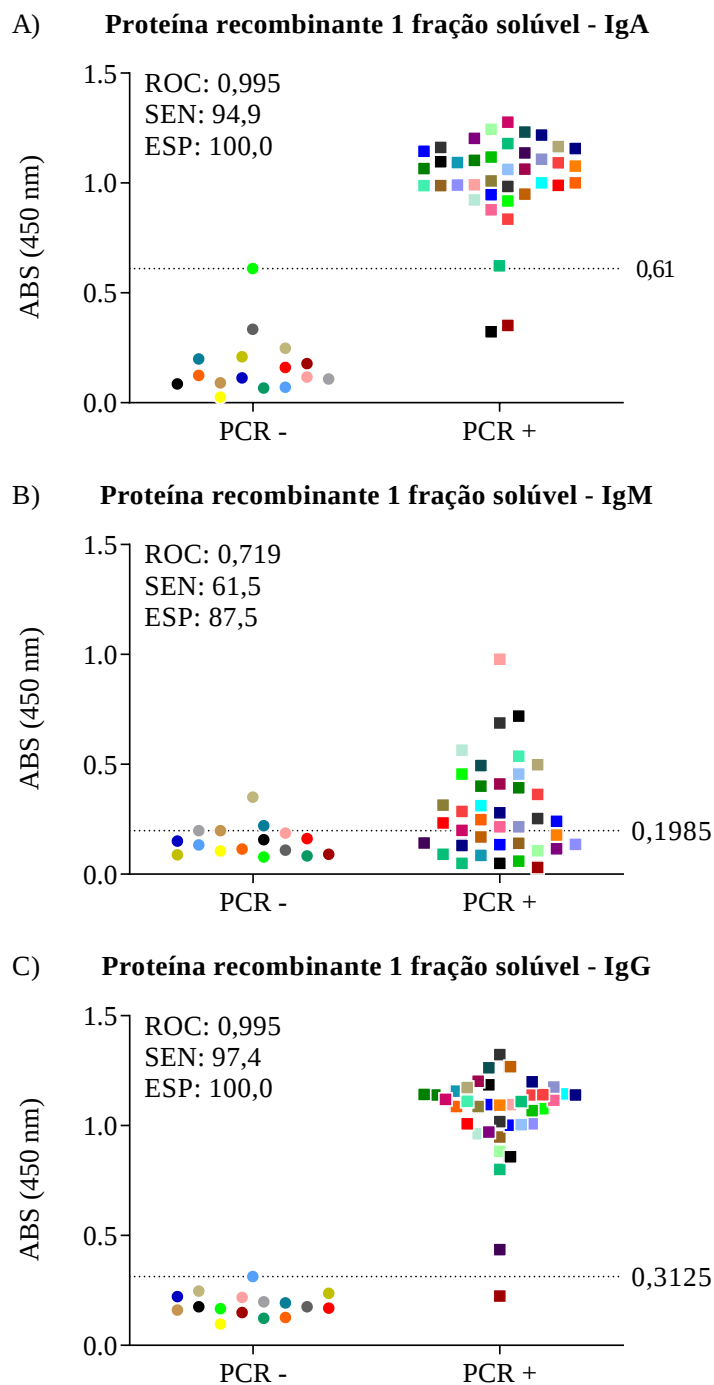


Figure 14. Ensaio de reatividade do antígeno Proteína Recombinante 1 fração solúvel. Placas sensibilizadas com 4µg da fração solúvel do antígeno Proteína Recombinante 1. Painel de amostras de soro de voluntários PCR- (N=21) e PCR+ (N=42), representados por pontos coloridos para avaliação do comportamento de cada amostra. ROC = área sob a curva, SEN = sensibilidade, ESP = especificidade. (A) anticorpo secundário IgA (1:10.000), (B) anticorpo secundário IgM (1:10.000) e (C) anticorpo secundário IgG (1:30.000). Linha tracejada representa o limiar de positividade (*Cut-off*) obtida pela curva ROC.

5.4. Análise comparativa Proteína recombinante 1 e kits diagnósticos comerciais

Foi realizada a análise comparativa entre os parâmetros de área sob a curva (ROC), sensibilidade (SEN) e especificidade (ESP) considerando o kit diagnóstico comercializado Euroimmun e o antígeno Proteína Recombinante 1. Assim, foi avaliada a reatividade de anticorpos de classe IgA nas amostras de soro nos grupos “PCR-” e “PCR+”. Os resultados demonstraram que o kit diagnóstico EUROIMMUN Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgA demonstrou parâmetros de ROC: 1,0, SEN: 100,0 e ESP: 100,0 enquanto o antígeno Proteína recombinante 1 – fração solúvel – 4µg – IgA demonstrou parâmetros de ROC: 0,995, SEN: 94,9 e ESP: 100,0. Ao mesmo tempo o antígeno Proteína recombinante 1 – fração insolúvel – 1µg – IgA demonstrou parâmetros de ROC: 0,963, SEN: 94,9, e ESP: 93,7 (Figura 15).

O kit diagnóstico comercializado BIOLISA SARS-CoV-2 IgM e o antígeno Proteína Recombinante 1 (fração solúvel e insolúvel), para determinação da reatividade de IgM nas amostras de soro nos grupos PCR- e PCR+, revelou que o kit diagnóstico BIOLISA SARS-CoV-2 IgM demonstrou parâmetros de ROC: 0,997, SEN: 95,0, ESP: 100,0. Já o antígeno Proteína Recombinante 1 - fração solúvel - 4µg - IgM apresentou ROC: 0,719, SEN: 61,5, e ESP: 87,5, paralelamente ao antígeno Proteína Recombinante 1 - fração insolúvel - 1 µg – IgM que apresentou ROC: 0,785, SEN: 51,3, e ESP: 100,0 (Figura 16).

Os resultados entre o kit diagnóstico comercializado Allserum SARS-CoV-2 IgM e o antígeno Proteína Recombinante 1, fração solúvel e insolúvel, investigando a presença de anticorpos de classe IgM nas amostras de soro nos grupos “PCR-” e “PCR+”, foi possível observar que o kit diagnóstico Allserum SARS-CoV-2 IgM demonstrou parâmetros de ROC: 0,957, SEN: 85,0 e ESP: 100,0 enquanto que o antígeno Proteína recombinante 1 – fração solúvel – 4µg – IgM demonstrou parâmetros de ROC: 0,719, SEN: 61,5 e ESP: 87,5. Ao mesmo tempo o antígeno Proteína recombinante 1 – fração insolúvel – 1µg – IgM demonstrou parâmetros de ROC: 0,785, SEN: 51,3, e ESP: 100,0 (figura 17).

Durante o teste comparativo entre os parâmetros de área sob a curva (ROC), sensibilidade (SEN) e especificidade (ESP) entre o kit diagnóstico comercializado ErbaLISA SARS-CoV-2 IgM e o antígeno Proteína Recombinante 1 (fração solúvel e insolúvel) investigando a presença de anticorpos de classe IgM nas amostras de soro nos

grupos PCR- e PCR+, nota-se que o kit diagnóstico ErbaLISA SARS-CoV-2 IgM demonstrou parâmetros de ROC: 0,815, SEN: 72,5, ESP: 94,1, enquanto que o antígeno Proteína Recombinante 1 - fração solúvel (utilizando 4µg de proteína na etapa de sensibilização e o anticorpo secundário IgM) apresenta ROC: 0,719, SEN: 61,5, e ESP: 87,5, paralelamente ao antígeno Proteína Recombinante 1 - fração insolúvel –(utilizando 1 µg de proteína na etapa de sensibilização e o anticorpo secundário IgM) apresentou ROC: 0,785, SEN:51,3, e ESP:100,0 (Figura 18).

Analizando os resultados dos parâmetros de área sob a curva (ROC), sensibilidade (SEN) e especificidade (ESP) entre o kit diagnóstico comercializado BIOLISA SARS-CoV-2 IgG e o antígeno Proteína Recombinante 1, fração solúvel e insolúvel, investigando a presença de anticorpos de classe IgG nas amostras de soro nos grupos “PCR-” e “PCR+”, foi possível observar que o kit diagnóstico BIOLISA SARS-CoV-2 IgG demonstrou parâmetros de ROC: 0,999, SEN: 97,5 e ESP: 100,0 enquanto que o antígeno Proteína recombinante 1 – fração solúvel (utilizando µg de proteína na etapa de sensibilização e anticorpo secundário IgG) demonstrou parâmetros de ROC: 0,995, SEN: 97,4 e ESP: 100,0. Ao mesmo tempo o antígeno Proteína recombinante 1 – fração insolúvel (utilizando 1µg de proteína na etapa de sensibilização e anticorpo secundário IgG) demonstrou parâmetros de ROC: 0,995, SEN: 97,4, e ESP: 100,0 (Figura 19).

No decorrer do teste comparativo entre os parâmetros de área sob a curva (ROC), sensibilidade (SEN) e especificidade (ESP) entre o kit diagnóstico comercializado Labtest anti-SARS-CoV-2 IgG e o antígeno Proteína Recombinante 1 (fração solúvel e insolúvel) investigando a presença de anticorpos de classe IgG nas amostras de soro nos grupos “PCR-” e “PCR+”, nota-se que o kit diagnóstico Labteste anti-SARS-CoV-2 IgG demonstrou parâmetros de ROC: 0,717, SEN: 62,5, ESP: 100,0, enquanto que o antígeno Proteína Recombinante 1 - fração solúvel - 4µg - IgG apresenta ROC: 0,995, SEN: 97,4, e ESP: 100,0, paralelamente ao antígeno Proteína Recombinante 1 - fração insolúvel (utilizando 1 µg de proteína na etapa de sensibilização e anticorpo secundário IgG) que apresentou ROC: 0,995, SEN:97,4, e ESP:100,0 (Figura 20).

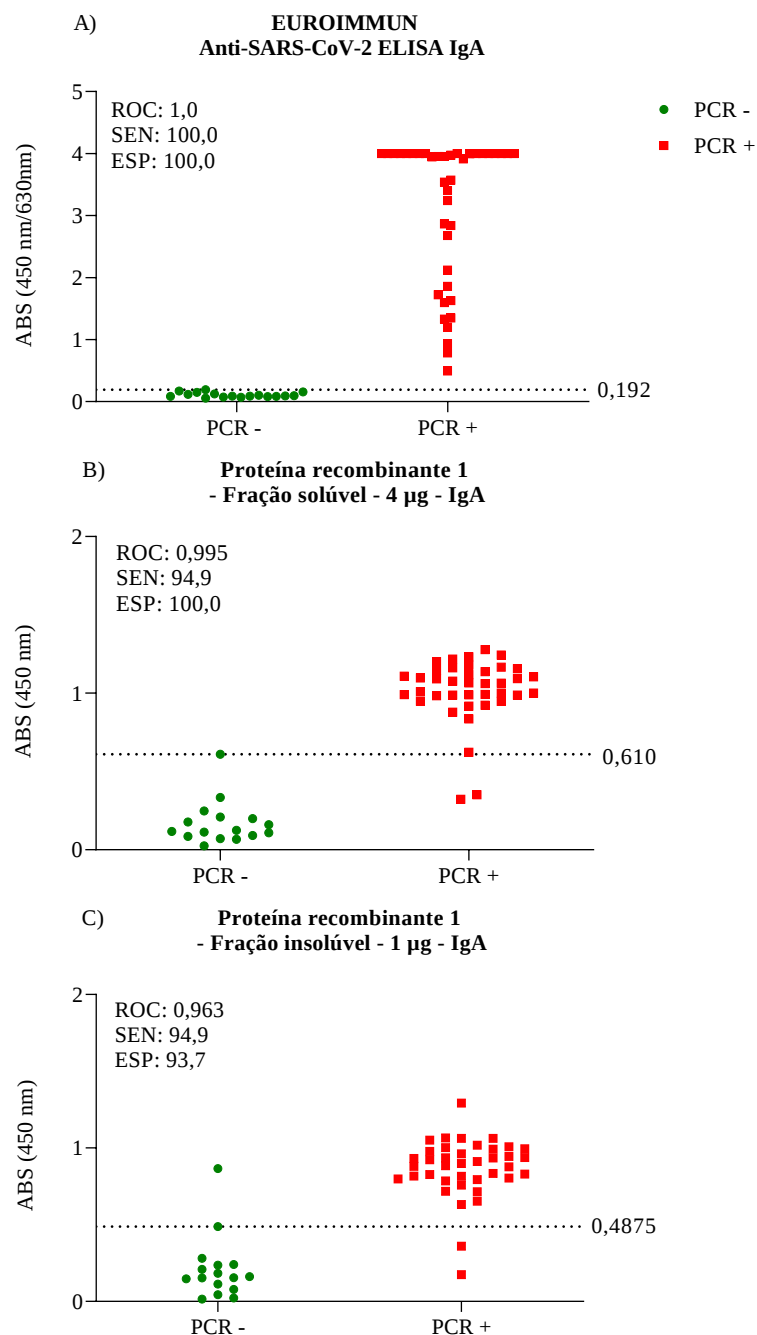


Figure 15. Análise comparativa entre o Kit diagnóstico EUROIMMUN Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgA e o antígeno Proteína Recombinante 1 (fração solúvel e insolúvel). Representação gráfica dos resultados obtidos através da análise comparativa utilizando o Kit diagnóstico EUROIMMUN anti-SARS-CoV-2 ELISA IgA (A). A placas sensibilizadas com 4µg da fração solúvel do antígeno Proteína Recombinante 1 (B) e 1µg da fração insolúvel do antígeno Proteína Recombinante 1 (C). Paineis de amostras de soro de voluntários PCR- (pontos circulares verdes, N=17) e PCR+ (pontos quadrados vermelhos, N=40). ROC = área sob a curva, SEN = sensibilidade e ESP = especificidade. Anticorpo secundário IgA (1:10.000). A linha tracejada representa o limiar de positividade (*Cut-off*) obtida pela curva ROC.

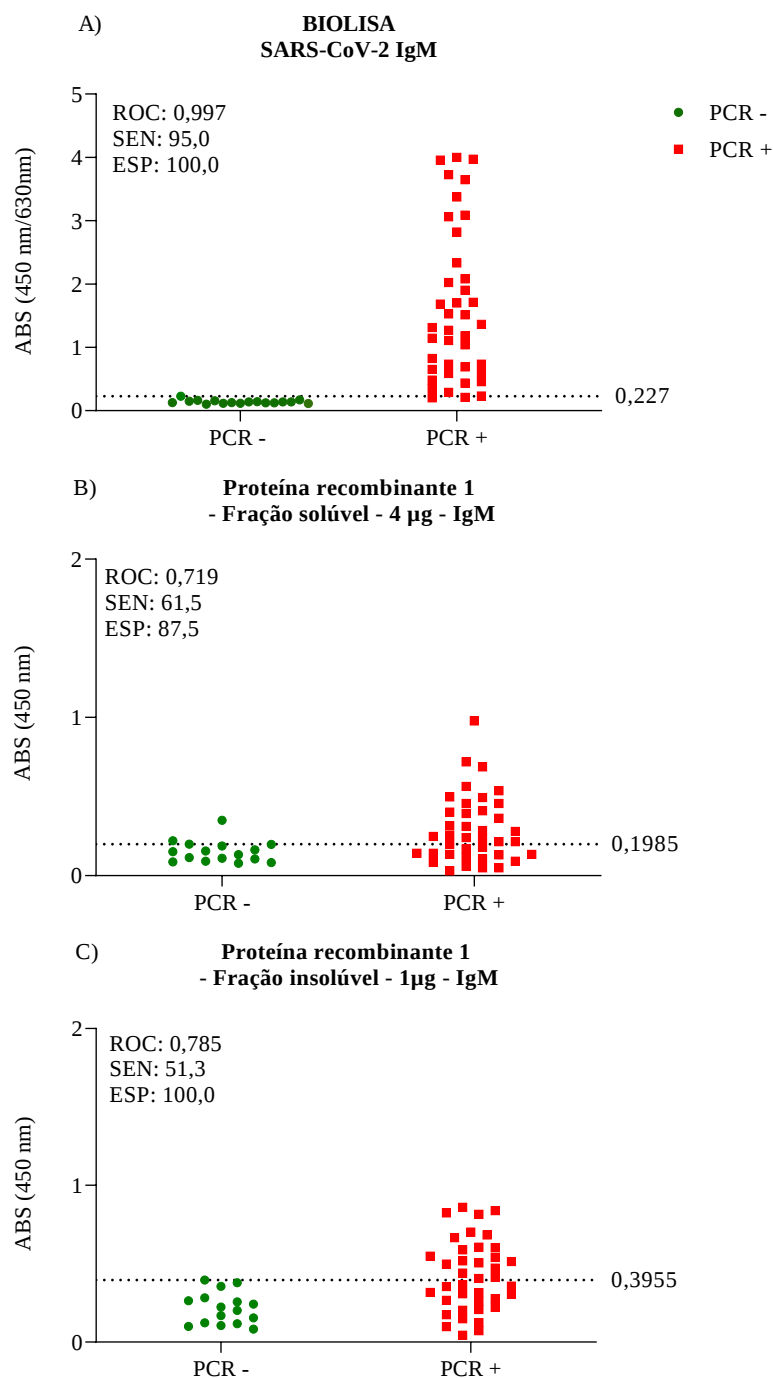


Figure 16. Análise comparativa entre o Kit diagnóstico BIOLISA SARS-CoV-2 IgM e o antígeno Proteína Recombinante 1 (fração solúvel e insolúvel). Representação gráfica dos resultados obtidos através da análise comparativa utilizando o Kit diagnóstico BIOLISA SARS-CoV-2 IgM (A). A placas sensibilizadas com 4µg da fração solúvel do antígeno Proteína Recombinante 1 (B) e 1µg da fração insolúvel do antígeno Proteína Recombinante 1 (C). Paineis de amostras de soro de voluntários PCR- (pontos circulares verdes, N=17) e PCR+ (pontos quadrados vermelhos, N=40). ROC = área sob a curva, SEN = sensibilidade e ESP = especificidade. Anticorpo secundário IgM (1:10.000). A linha tracejada representa o limiar de positividade (*Cut-off*) obtida pela curva ROC.

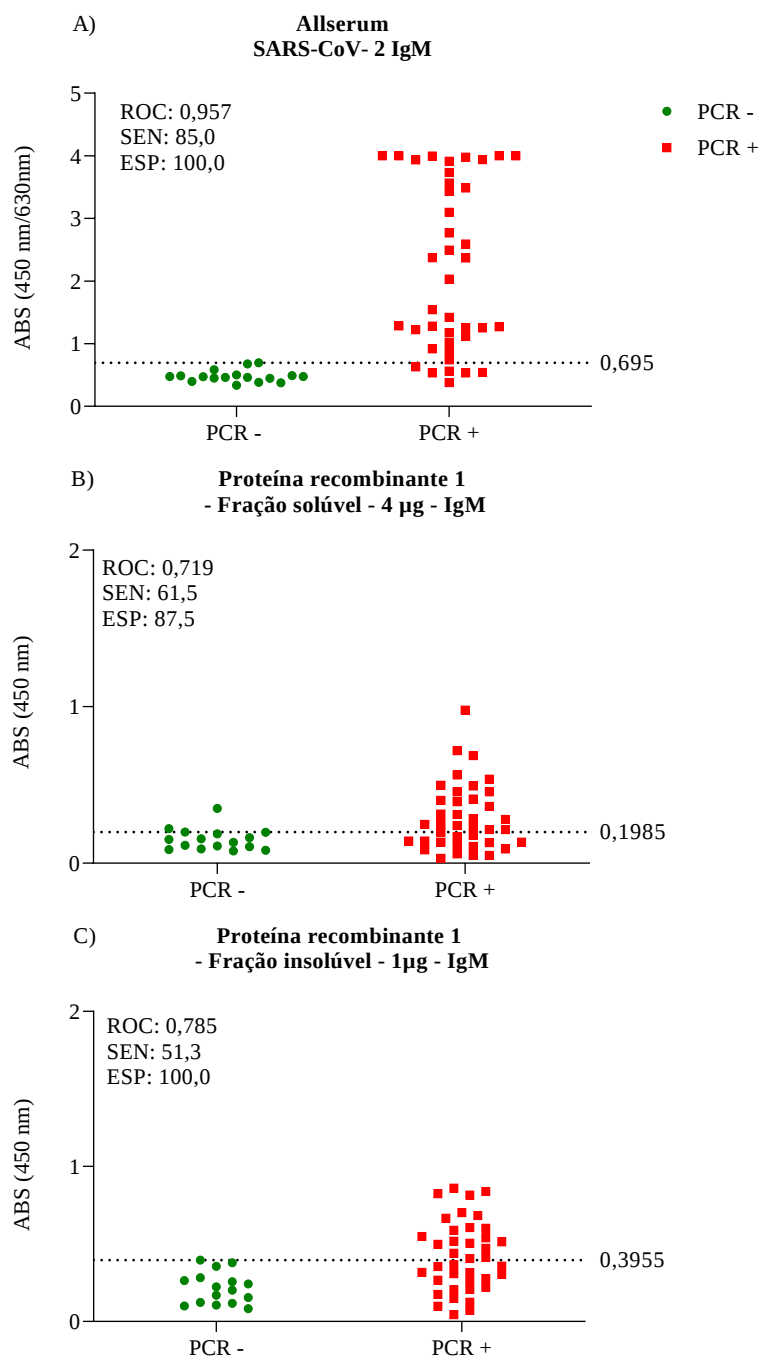


Figure 17. Análise comparativa entre o Kit diagnóstico Allserum SARS-CoV-2 IgM e o antígeno Proteína Recombinante 1 (fração solúvel e insolúvel). Representação gráfica dos resultados obtidos através da análise comparativa utilizando o Kit diagnóstico Allserum SARS-CoV-2 IgM (A). A placas sensibilizadas com 4µg da fração solúvel do antígeno Proteína Recombinante 1 (B) e 1µg da fração insolúvel do antígeno Proteína Recombinante 1 (C). Paineis de amostras de soro de voluntários PCR- (pontos circulares verdes, N=17) e PCR+ (pontos quadrados vermelhos, N=40). ROC = área sob a curva, SEN = sensibilidade e ESP = especificidade. Anticorpo secundário IgM (1:10.000). A linha tracejada representa o limiar de positividade (*Cut-off*) obtida pela curva ROC.

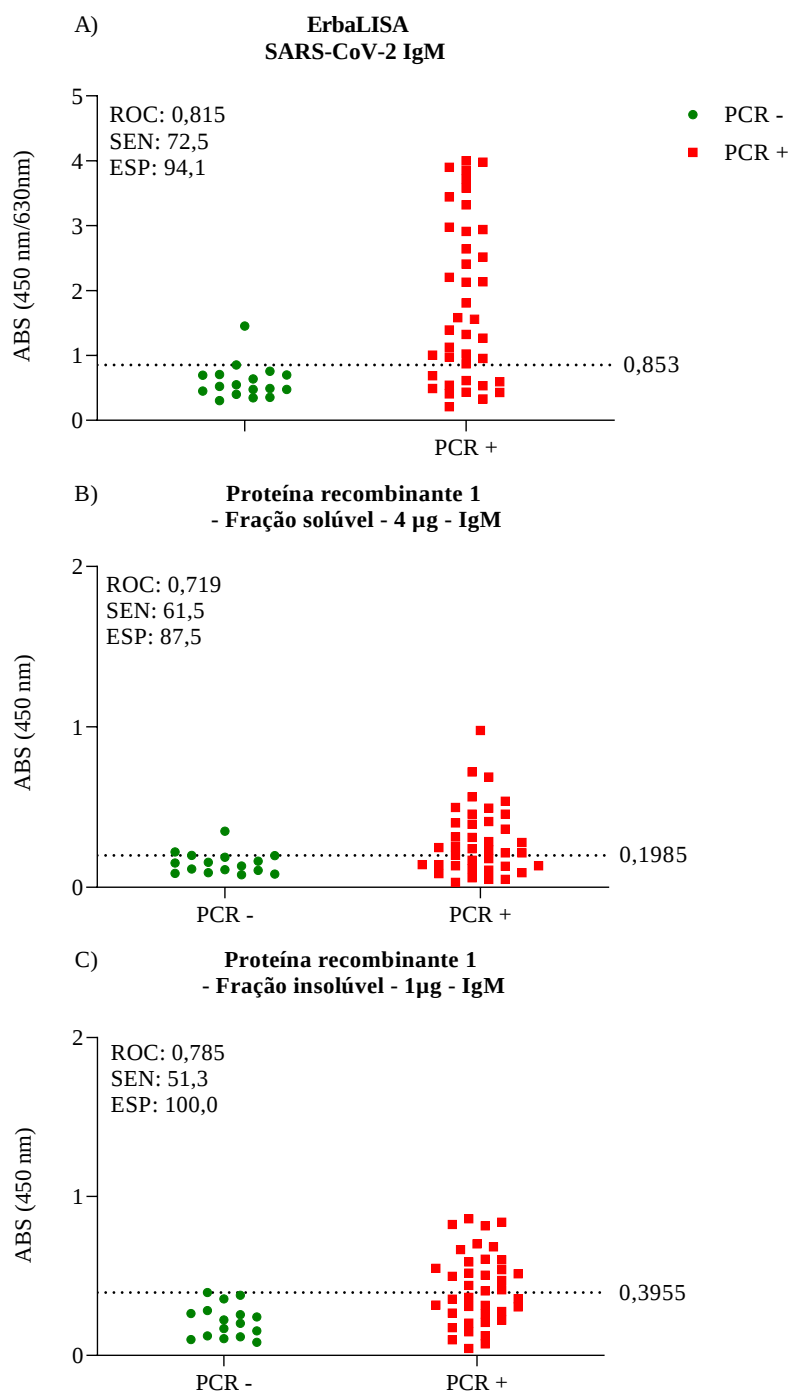


Figure 18. Análise comparativa entre o Kit diagnóstico ErbaLISA SARS-CoV-2 IgM e o antígeno Proteína Recombinante 1 (fração solúvel e insolúvel. Representação gráfica dos resultados obtidos através da análise comparativa utilizando o Kit diagnóstico ErbaLISA SARS-CoV-2 IgM (A). A placas sensibilizadas com 4µg da fração solúvel do antígeno Proteína Recombinante 1 (B) e 1µg da fração insolúvel do antígeno Proteína Recombinante 1 (C). Paine de amostras de sor de voluntários PCR- (pontos circulares verdes, N=17) e PCR+ (pontos quadrados vermelhos, N=40). ROC = área sob a curva, SEN = sensibilidade e ESP = especificidade. Anticorpo secundário IgM (1:10.000). A linha tracejada representa o limiar de positividade (*Cut-off*) obtida pela curva ROC.

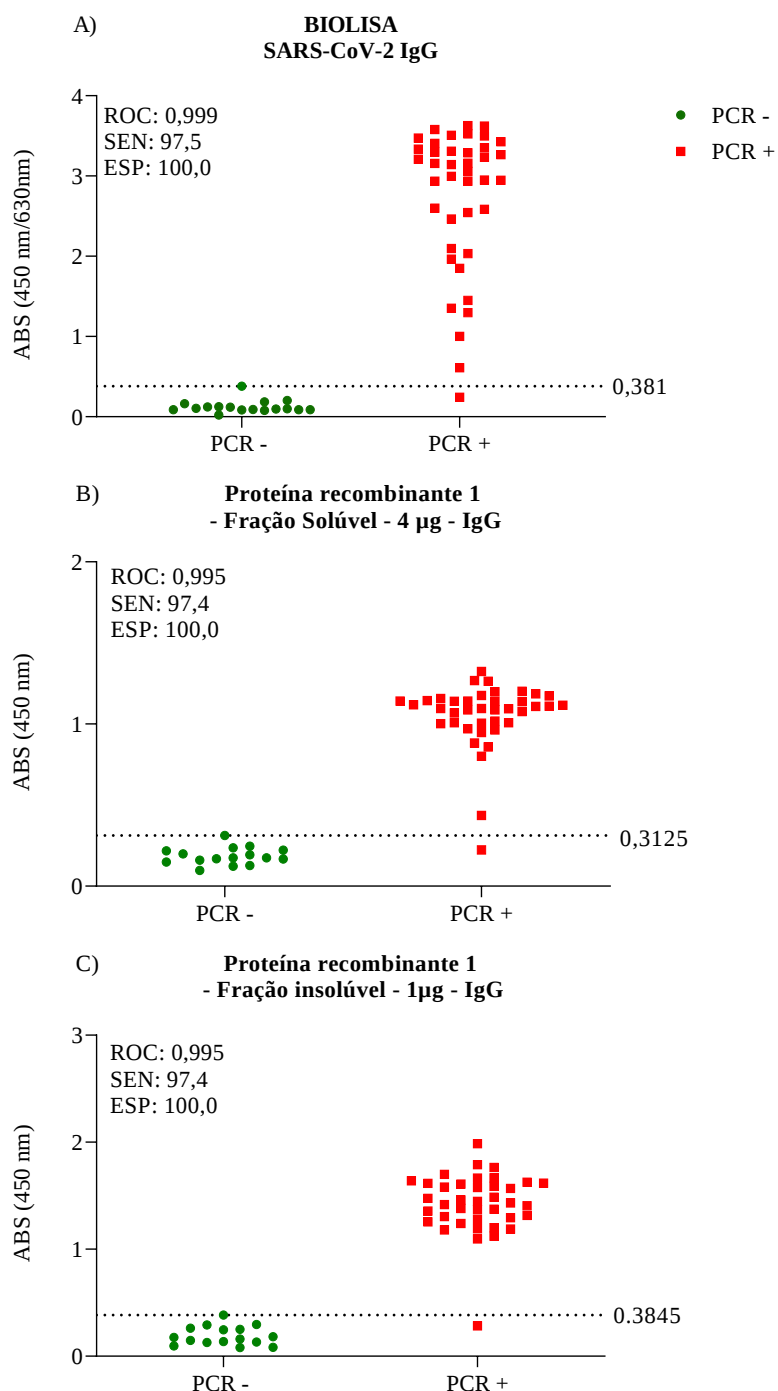


Figure 19. Análise comparativa entre o Kit diagnóstico BIOLISA SARS-CoV-2 IgG e o antígeno Proteína Recombinante 1 (fração solúvel e insolúvel). Representação gráfica dos resultados obtidos através da análise comparativa utilizando o Kit diagnóstico BIOLISA SARS-CoV-2 IgG (A). A placas sensibilizadas com 4µg da fração solúvel do antígeno Proteína Recombinante 1 (B) e 1µg da fração insolúvel do antígeno Proteína Recombinante 1 (C). Paineis de amostras de soro de voluntários PCR- (pontos circulares verdes, N=17) e PCR+ (pontos quadrados vermelhos, N=40). ROC = área sob a curva, SEN = sensibilidade e ESP = especificidade. Anticorpo secundário IgG (1:30.000). A linha tracejada representa o limiar de positividade (*Cut-off*) obtida pela curva ROC.

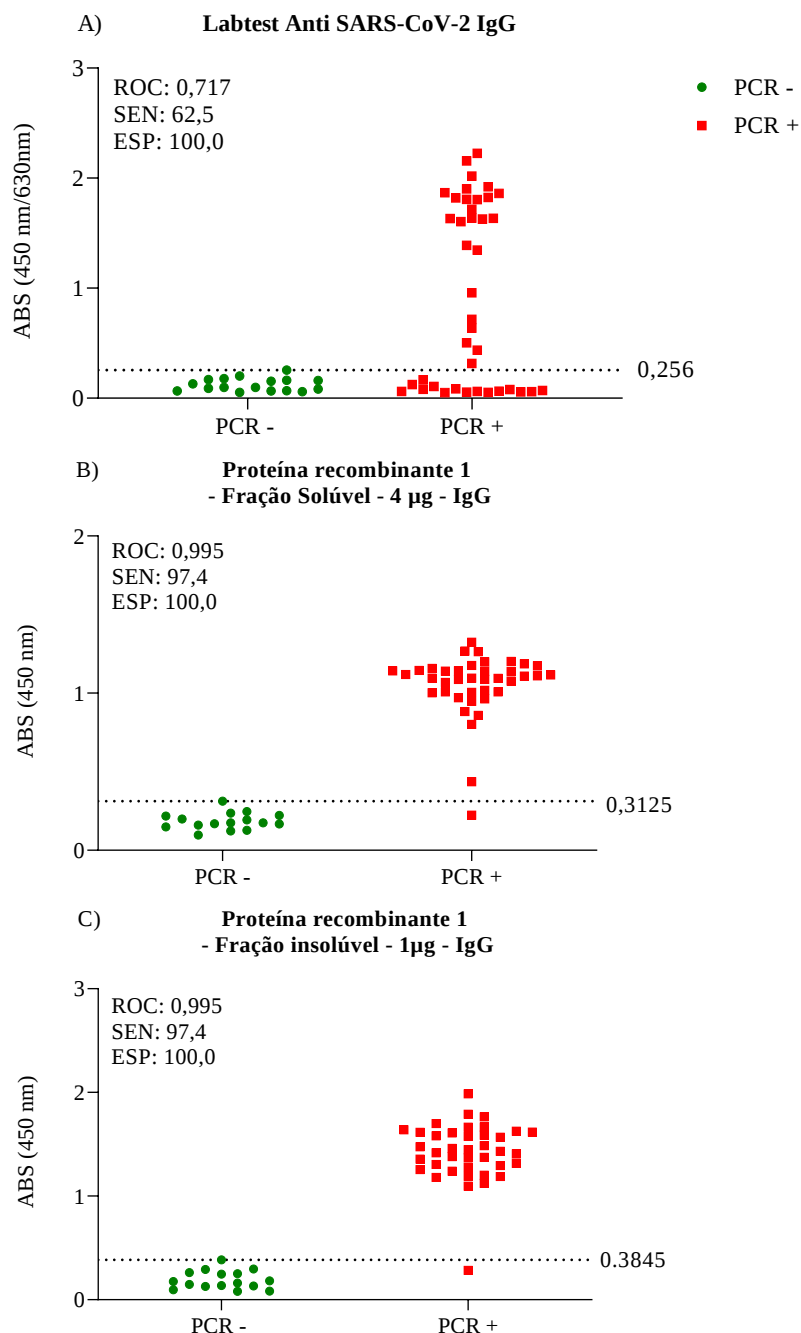


Figure 20. Análise comparativa entre o Kit diagnóstico Labtest Anti-SARS-CoV-2 IgG e o antígeno Proteína Recombinante 1 (fração solúvel e insolúvel). Representação gráfica dos resultados obtidos através da análise comparativa utilizando o Kit diagnóstico Labtest Anti-SARS-CoV-2 IgG (A). A placas sensibilizadas com 4µg da fração solúvel do antígeno Proteína Recombinante 1 (B) e 1µg da fração insolúvel do antígeno Proteína Recombinante 1 (C). Paineis de amostras de soro de voluntários PCR- (pontos circulares verdes, N=17) e PCR+ (pontos quadrados vermelhos, N=40). ROC = área sob a curva, SEN = sensibilidade e ESP = especificidade. Anticorpo secundário IgG (1:30.000). A linha tracejada representa o limiar de positividade (*Cut-off*) obtida pela curva ROC.

5.5. Ensaio de soroconversão de voluntários imunizados com a CoronaVac

Ao final do ensaio de soroconversão com voluntários imunizados com a vacina CoronaVac, foi possível observar que na busca por anticorpos da classe IgA, apenas duas das dez amostras de soro de voluntários (VL-11, VL-14) apresentaram mudança para a sorologia positiva, acima do limiar de positividade, após 21 dias da terceira aplicação do imunizante, apontados no gráfico como pontos circulares verdes (Figura 21).

Enquanto, na busca por anticorpos de classe IgG, foi possível verificar que nove das dez amostras de soro de voluntários (VL-3, VL-6, VL-8, VL-9, VL-10, VL-14, VL-16, VL-18, VL-20) apresentaram mudança para a sorologia positiva, acima do limiar de positividade, após 21 dias da terceira aplicação do imunizante, apontados no gráfico como pontos circulares verdes (Figura 22).

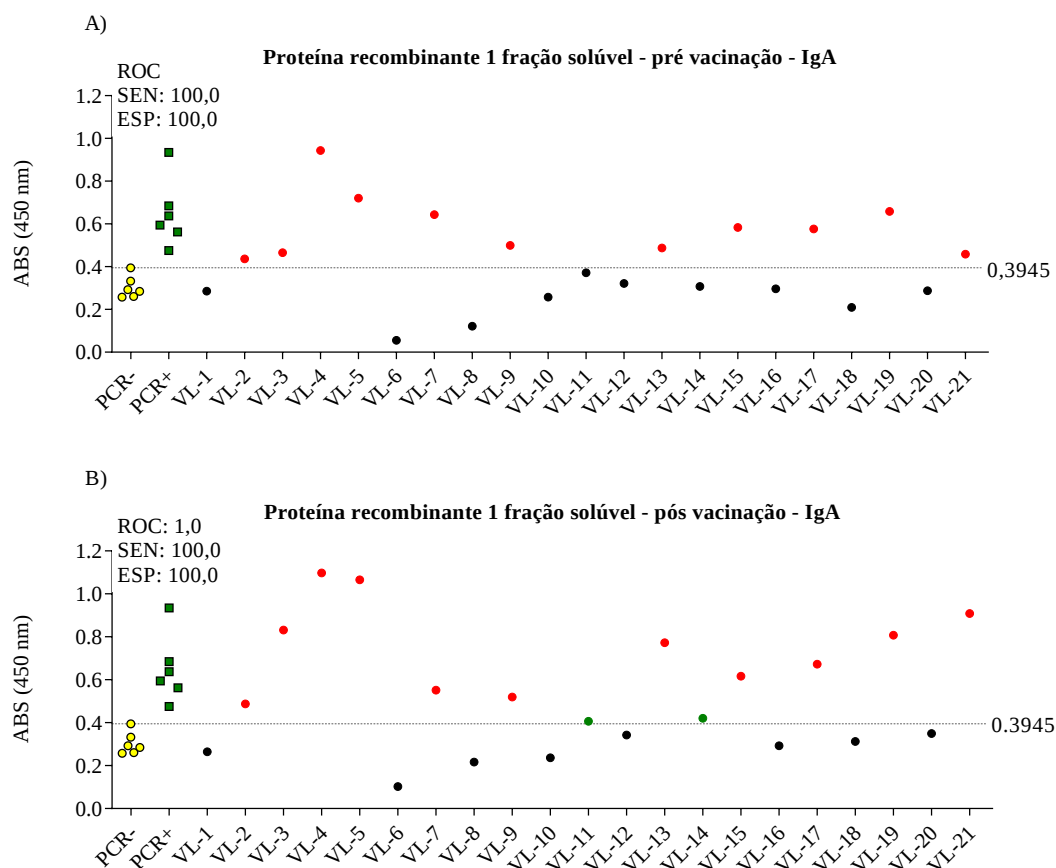


Figure 21. Análise comparativa de sorologia anti-SARS-CoV-2 durante o período pré e pós imunização completa pela Coronavac. As placas foram sensibilizadas com 4µg da fração solúvel do antígeno Proteína Recombinante 1 e utilizado o anticorpo secundário IgA (1:10.000). Resultados pré-vacinação (A) e após 21 dias da terceira dose do imunizante CoronaVac (B). Amostras de soro “PCR-” (controle negativo pontos circulares amarelos, N = 6) e amostras de soro “PCR+” (controle positivo pontos quadrados verdes, N = 6). Estão indicadas amostras positivas pré-vacinação (pontos circulares vermelhos), negativas pré-vacinação (pontos circulares pretos), e soroconversão positiva (pontos circulares verdes). A linha tracejada representa o limiar de positividade (*Cut-off*) $ABS > 0.3945$, conforme estabelecido pela curva ROC.

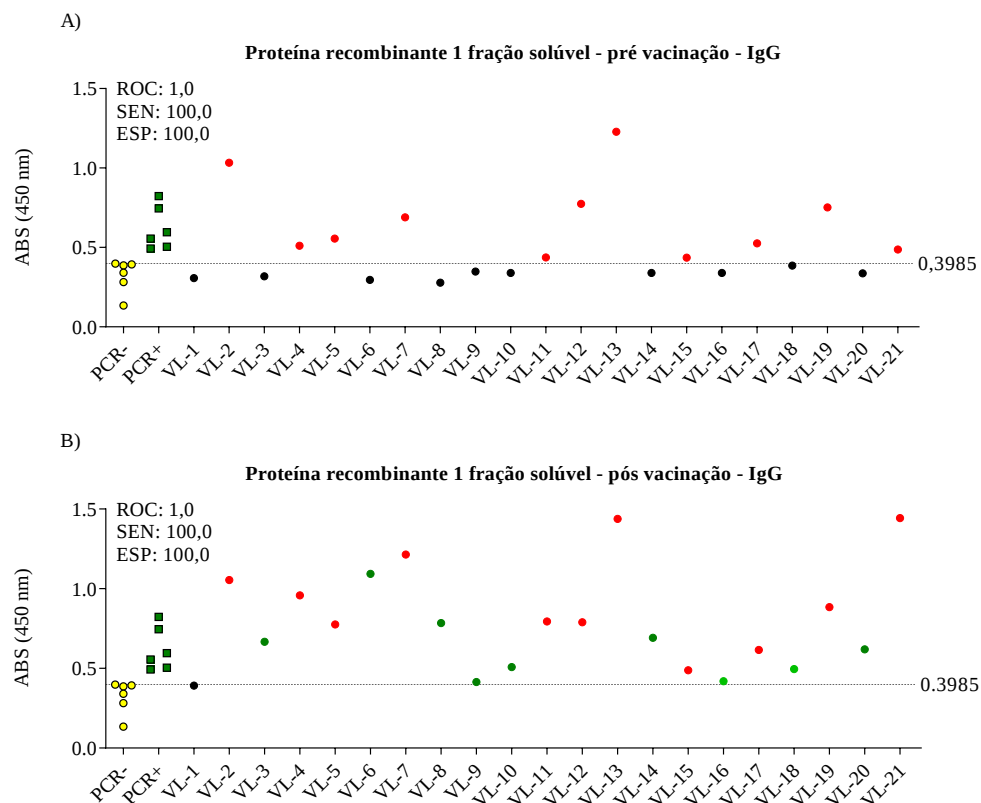


Figure 22. Análise comparativa de sorologia anti-SARS-CoV-2 durante o período pré e pós imunização completa pela CoronaVac. As placas foram sensibilizadas com 4µg da fração solúvel do antígeno Proteína Recombinante 1 e utilizado o anticorpo secundário IgG (1:30.000). Resultados pré-vacinação (A) e após 21 dias da terceira dose do imunizante CoronaVac (B). Amostras de soro “PCR-” (controle negativo pontos circulares amarelos, N = 6) e amostras de soro “PCR+” (controle positivo pontos quadrados verdes, N = 6). Estão indicadas amostras positivas pré-vacinação (pontos circulares vermelhos), negativas pré-vacinação (pontos circulares pretos), e soroconversão positiva (pontos circulares verdes). A linha tracejada representa o limiar de positividade (*Cut-off*) $ABS > 0.3985$, conforme estabelecido pela curva ROC.

Ensaio de Soroconversão de voluntários imunizados com a AstraZeneca

Em paralelo ao teste anterior, ao final do ensaio de soroconversão com voluntários imunizados com a vacina AstraZeneca, foi possível observar que na busca por anticorpos da classe IgA apenas duas das 12 amostras de soro de voluntários, negativos no tempo zero (VL-2, e VL-06), apresentaram mudança para a sorologia positiva, acima do limiar de positividade, após 21 dias da segunda aplicação do imunizante, apontados no gráfico como pontos circulares verdes (Figura 23).

Na análise de anticorpos de classe IgG foi possível verificar também que apenas duas das 12 amostras de soro de voluntários, negativos no tempo zero (VL-13, e VL-14), apresentaram mudança para a sorologia positiva, acima do limiar de positividade, após 21 dias da segunda aplicação do imunizante, apontados no gráfico como pontos circulares verdes (Figura 24).

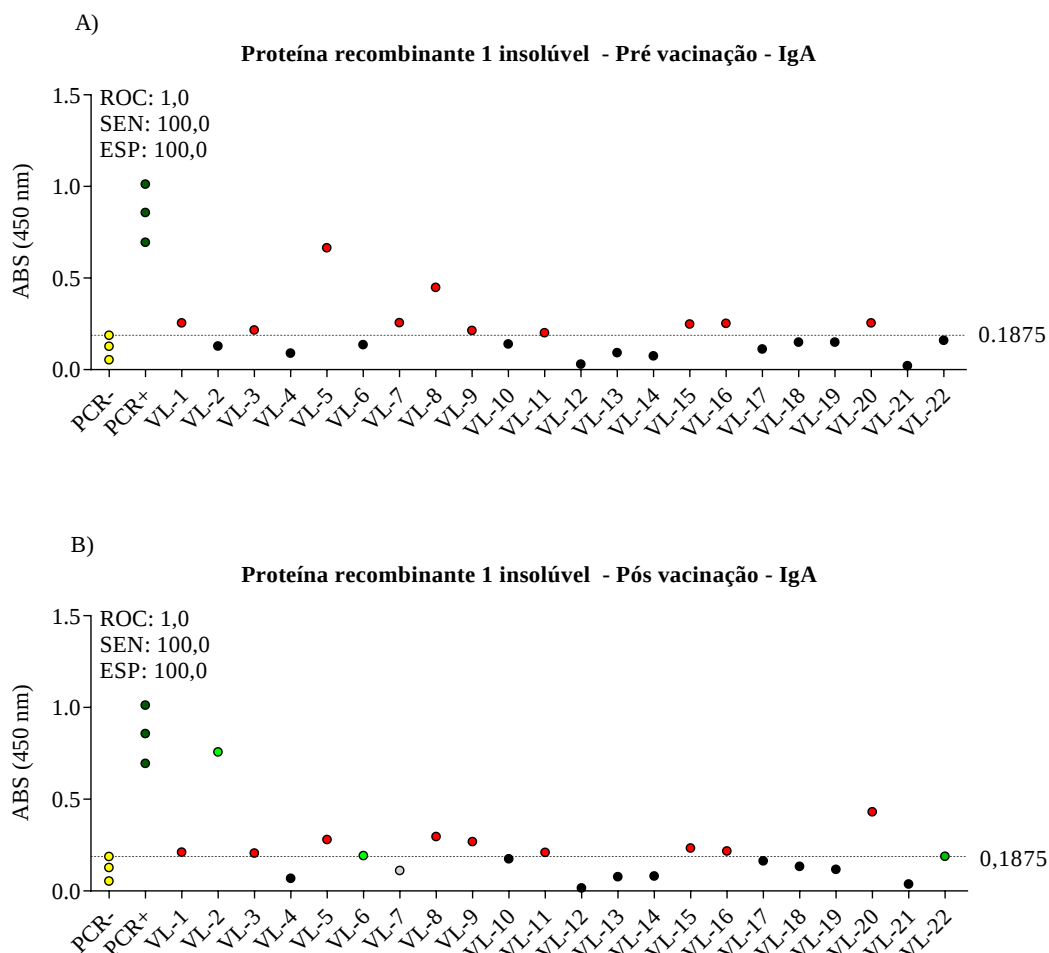


Figure 23. Análise comparativa de sorologia anti-SARS-CoV-2 durante o período pré e pós imunização completa pela AstraZeneca. As placas foram sensibilizadas com 1µg da fração insolúvel do antígeno Proteína Recombinante 1 e utilizado o anticorpo secundário IgA (1:10.000). Resultados pré-vacinação (A) e após 21 dias da terceira dose do imunizante AstraZeneca (B). Amostras de soro “PCR-” (controle negativo pontos circulares amarelos, N = 3) e amostras de soro “PCR+” (controle positivo pontos quadrados verdes, N = 3). Estão indicadas amostras positivas pré-vacinação (pontos circulares vermelhos), negativas pré-vacinação (pontos circulares pretos), soroconversão negativa (ponto circular cinza) e soroconversão positiva (pontos circulares verdes). A linha tracejada representa o limiar de positividade (*Cut-off*) $ABS > 0.1875$, conforme estabelecido pela curva ROC.

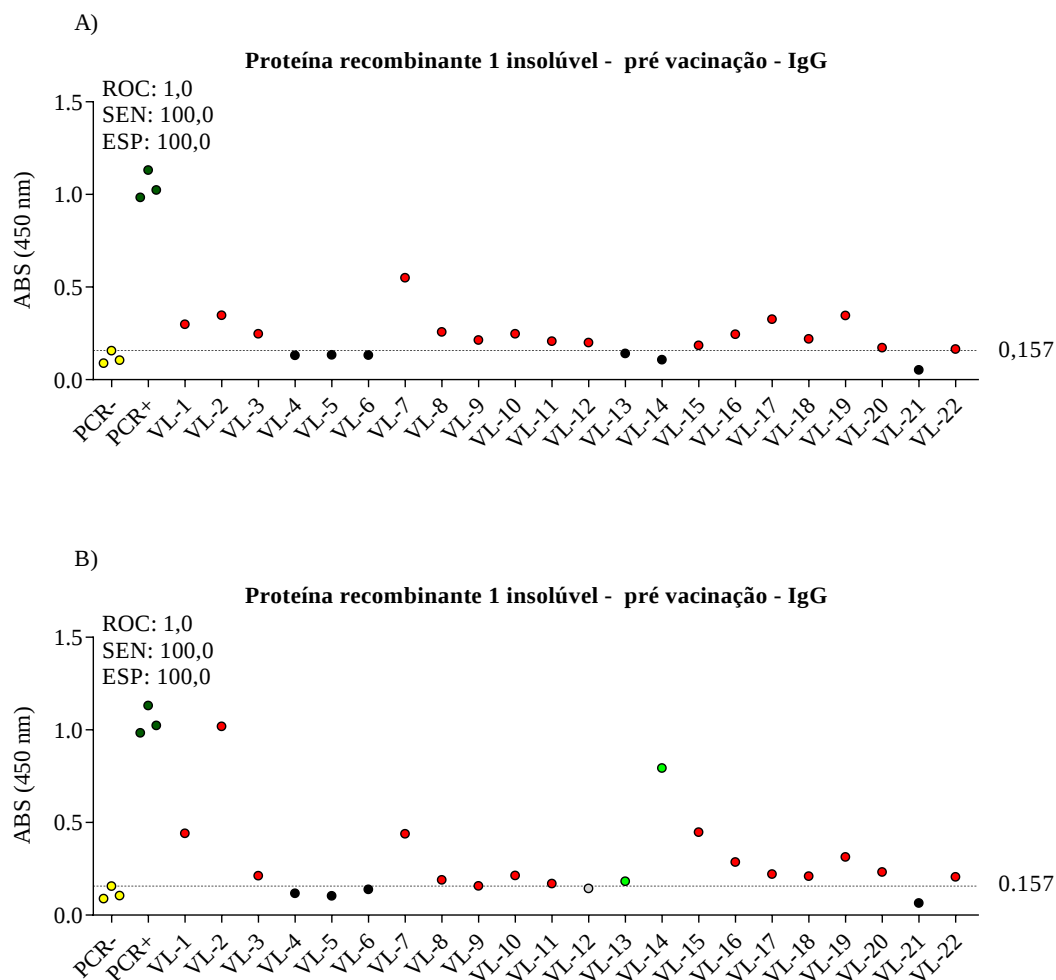


Figure 24. Análise comparativa de sorologia anti-SARS-CoV-2 durante o período pré e pós imunização completa pela AstraZeneca. As placas foram sensibilizadas com 1µg da fração insolúvel do antígeno Proteína Recombinante 1 e utilizado o anticorpo secundário IgG (1:30.000). Resultados pré-vacinação (A) e após 21 dias da terceira dose do imunizante AstraZeneca (B). Amostras de soro “PCR-” (controle negativo pontos circulares amarelos, N = 3) e amostras de soro “PCR+” (controle positivo pontos quadrados verdes, N = 3). Estão indicadas amostras positivas pré-vacinação (pontos circulares vermelhos), negativas pré-vacinação (pontos circulares pretos), soroconversão negativa (ponto circular cinza) e soroconversão positiva (pontos circulares verdes). A linha tracejada representa o limiar de positividade (*Cut-off*) $ABS > 0.157$, conforme estabelecido pela curva ROC.

5.6. Prova de conceito para o desenvolvimento do teste imunocromatográfico rápido de fluxo lateral

Após a montagem e utilização do teste imunocromatográfico de fluxo lateral empregando amostras de soro previamente identificadas como negativos e positivos por teste molecular e testes sorológicos, observou-se o aparecimento de duas bandas, sendo uma banda controle e outra teste (Figura 25). O surgimento da linha teste indicou a presença de anticorpo IgG anti-SARS-CoV-2 na amostra de soro testada (resultado positivo). O surgimento da linha controle indicou perfeito funcionamento no fluxo líquido, amostra de soro mais diluente de amostra, através da membrana de nitrocelulose, mostrando eficiência do protótipo em diagnosticar soros de pacientes com sorologia positiva anti-SARS-CoV-2.

Acerca do resultado negativo, após o período de 10 minutos, não ocorreu o surgimento da linha teste, resultado que indica a ausência de anticorpos anti-SARS-CoV-2 na amostra testada (resultado negativo). Porém, foi possível observar o surgimento da linha teste indicando perfeito funcionamento do fluxo líquido através da membrana de nitrocelulose, resultando no desempenho correto do protótipo (Figura 26).

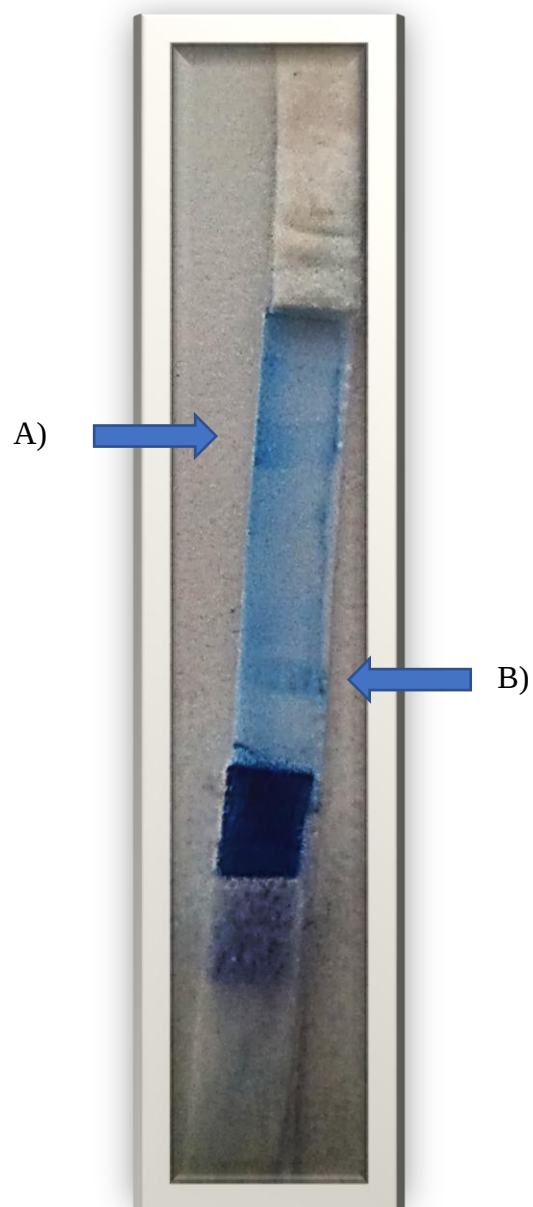


Figure 25. Protótipo desenvolvido para a prova de conceito do teste imunocromatográfico rápido. Representação da imagem do protótipo desenvolvido apresentado sorologia positiva para IgG anti-Sars-Cov-2. Linha controle (A). Linha teste indicando sorologia IgG positiva para infecção por SARS-CoV-2 (B). Resultado obtido após 10 minutos da aplicação da amostra.

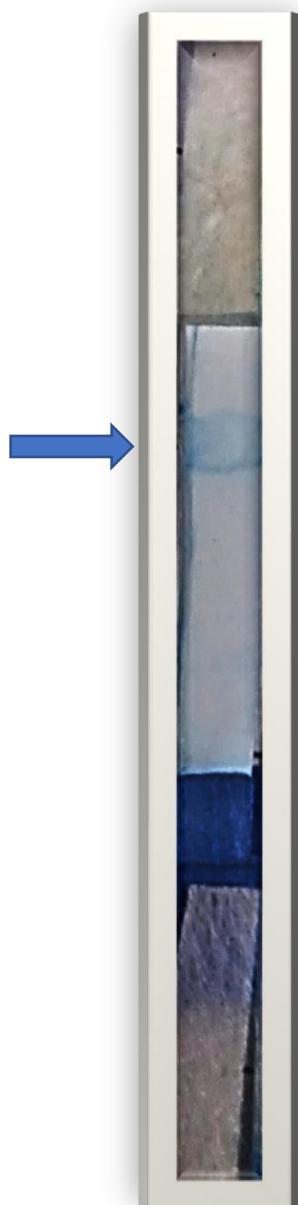


Figure 26. Protótipo desenvolvido para a prova de conceito do teste imunocromatográfico rápido. Representação da imagem do protótipo desenvolvido apresentado sorologia negativa para IgG anti-Sars-Cov-2. Linha controle (A). Resultado obtido após 10 minutos da aplicação da amostra.

6. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de ensaios imunoenzimático com alta sensibilidade, especificidade e área sob a curva para realizar a detecção de anticorpos específicos, IgA, IgM e IgG, contra infecções pelo vírus SARS-CoV-2 é uma importante ferramenta de vigilância epidemiológica. Dentro dos antígenos testados neste estudo, triados pela técnica de bioinformática e sintetizados através de expressão heteróloga em *Escherichia coli*, estão sequências de estruturas antigênicas do vírus SARS-CoV-2, que são frequentemente utilizados no desenvolvimento de ensaios sorológicos para a COVID-19 tanto em laboratórios, durante o ensaio do ELISA *in-house*, quanto por kits comerciais, como é no caso do kit diagnóstico de COVID-19 da Euroimmun que é composto por proteína recombinante de estruturas *Spike* e RBD do vírus (Rikhtegaran *et al.*, 2020; Dolscheid-Pommerich *et al.*, 2022).

As análises de bioinformática se revelam uma ferramenta importante na busca e triagem de sequências antigênicas específicas oriundas de estruturas do vírus SARS-CoV-2. Além da seleção de sequências antigênicas em potencial, essas ferramentas são capazes de selecionar antígenos com menor chance de similaridade às sequências de outros vírus da família Coronaviridae. Pinheiro (2022) e Scussel e colaboradores (2022) demonstraram que antígenos triados por bioinformática podem ser empregados em testes diagnósticos imunoenzimáticos confiáveis. Além da triagem de epítomos antigênicos como potenciais candidatos para compor um teste imunoenzimático, as técnicas de bioinformática também permitem o desenvolvimento de vacinas, não só de antígenos virais como o SARS-CoV-2, mas também de organismos protozoários como os do gênero *Leishmania* (Moreno, 2017; Pereira *et al.*, 2021). A síntese de combinações de aminoácidos de diferentes estruturas proteicas do SARS-CoV-2 para o desenvolvimento de testes diagnósticos neste trabalho, através da abordagem em bioinformática, apresenta resultados congruentes aos trabalhos preliminares (Luiz *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2022).

Além das 7 sequências antigênicas peptídicas triadas por bioinformática, este trabalho foi desenvolvido utilizando mais um antígeno recombinante sintetizado por expressão heteróloga em *Escherichia coli*. Estudos anteriores mostram que a expressão heteróloga utilizando *E. coli*, como organismo passível de replicação, é uma escolha interessante na síntese de proteínas recombinantes devido ao seu crescimento rápido, em um menor tempo, baixo custo, alto rendimento e de fácil aceitação de material genético exógeno (Silva *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2022). Além disso, estudos mostram alto

desempenho da técnica em expressar e purificar proteínas recombinantes de estruturas do SARS-CoV-2 que também possam ser utilizadas em testes diagnósticos baseado em ensaios de ELISA, como vem apresentado neste trabalho, e em diversos protocolos vacinais (Razali, 2021; Maffei *et al.*, 2021; Almendárez-Rodríguez *et al.*, 2022).

Com relação ao ensaio imunoenzimático de ELISA, há vários fatores determinantes para o desenvolvimento de um teste eficaz. A padronização do fator tempo durante os períodos de incubação é essencial para possibilitar a entrega mais rápida de um resultado, buscando sua incorporação em laboratórios de análises clínicas, mas que ainda assim seja confiável. A concentração de antígeno que será utilizado também é um fator importante, uma vez que está associada a maior chance de haver ligações inespecíficas quando em maior concentração, além de racionalizar o uso do antígeno, barateando o custo de cada reação, bem como a seleção de uma placa de baixo custo e alto desempenho. Durante a otimização do ensaio de ELISA, foi possível observar que a utilização da microplaca da marca Sarstedt modelo 82.1582.200 apresentou resultados satisfatórios quando comparado aos resultados utilizando a microplaca Costar modelo 3590, um modelo de microplaca com o valor, em média, 3 vezes mais alto do que o modelo selecionado. Além disso, a seleção de uma proteína inerte de baixo custo e alto desempenho é indispensável para minimizar custos e ainda assim realizar um ensaio que seja confiável, evitando ligações inespecíficas durante o teste (Pattinson *et al.*, 2022). O presente estudo buscou incorporar procedimentos previamente publicados para otimizar a reação de ELISA, sendo definido a solução de proteína inerte, que constituiu do tampão de bloqueio, assim como sua concentração (5%), tempo de incubação (1 hora) e temperatura (37°C) (Pradella *et al.*, 2022; Godoi *et al.*, 2022; Freitas *et al.*, 2022). Ao final, verificamos que era possível substituir a caseína e o BSA (*Bovine Serum Albumin*), reagentes que custam em média R\$9.660,00/kg por leite em pó Molico® que custa em média R\$70,00/kg. Isto permitiu a identificação de uma solução de bloqueio de baixo custo, preservando a eficiência e reduzindo drasticamente os custos desta etapa do teste. Além do mais, a utilização dos anticorpos secundários da marca Sigma demonstraram ser a opção mais adequada para serem utilizados durante os ensaios. Além dos resultados de alto desempenho apresentados, os isotipos testados podem ser utilizados em maiores diluições, por tanto conseguimos fazer um número maior de testes, diminuindo assim o custo.

Após a primeira década da elaboração do ensaio de ELISA em 1971, a utilização de peptídeos vem sendo bastante aplicada (Pandey, 2021). Além disso, em 2019 surgiu a

necessidade do desenvolvimento de testes específicos, utilizando sequências provenientes do SARS-CoV-2 para triar e diagnosticar a COVID-19, como pode ser observado nos trabalhos de Pandey (2021), Herrscher e colaboradores (2022), Polvere e colaboradores (2022), Quach e colaboradores (2022) e Andries e colaboradores (2022)

Durante os primeiros ensaios utilizando amostras de soro do período pré-pandemia, foi possível observar que, curiosamente, algumas destas amostras se positivaram, mesmo que em baixa densidade óptica. Este fenômeno já havia sido observado no trabalho publicado de Yassine e colaboradores (2021), utilizando kits comerciais e isso pode ser explicado como possível reação cruzada durante a interação antígeno com anticorpo contra outras sequências virais. De fato, este fenômeno também foi descrito na publicação de Montomoli e colaboradores (2021). Ainda assim, o parâmetro de área sob a curva utilizado para avaliar antígenos triados por bioinformática em alguns trabalhos demonstram que esse parâmetro é essencial para avaliação do desempenho geral do teste (Scussel *et al.*, 2022; Hajikarimlou *et al.*, 2022). Nesse sentido, embora as amostras pré-pandemia terem se mostrado positivas, os testes utilizando os antígenos triados por bioinformática se mostraram eficientes devido a elevada área sob a curva, próxima de 1.

Os resultados observados no ensaio de ELISA entre as combinações antigênicas de peptídeos (antígeno #1.11.7 associado ao antígeno #1.21.17; antígeno #1.11.7 associado ao antígeno #1.22.18) corroboram com estudos de Amrun e colaboradores (2020) que propõem que combinações antigênicas oriundas de diferentes estruturas virais com alto potencial antigênico, podem demonstrar melhora significativa nos parâmetros de sensibilidade, especificidade e área sob a curva. Essa melhora significativa provavelmente acontece devido a formulação gerada através da combinação entre sequências de duas estruturas virais com potencial antigênico: a glicoproteína *Spike* e a glicoproteína do Nucleocapsídeo, como sugere Srivastava e colaboradores (2022). Holenya e colaboradores (2021) também levantam uma hipótese para explicar esse resultado, sugerindo que os anticorpos específicos presentes na amostra de soro possuem maior reconhecimento e afinidade pelo antígeno oriundo de duas estruturas viral adsorvidas em um teste, aumentando a chance de haver ligação antígeno/anticorpo, tornando o teste mais sensível evitando resultado falso negativo, resultando em um melhor desempenho.

Após os resultados obtidos com os antígenos triados por bioinformática, houve o ensaio de validação do antígeno Proteína Recombinante 1. Durante o ensaio para

diagnosticar a titulação IgG, podemos perceber que a mesma amostra de soro PCR+ resultou como negativo, abaixo do limiar de positividade (*Cut-off*) tanto no ensaio com o antígeno fração insolúvel quando no ensaio com o antígeno fração solúvel. Embora essa amostra tenha sido caracterizada como positivo pelo teste molecular, ela não apresentou titulação de anticorpos IgG suficiente para se caracterizar como positivo em um teste sorológico utilizando este antígeno. Estudos de Takamatsu e colaboradores (2022) mostram que a titulação de anticorpos está diretamente ligada ao grau dos sintomas e tempo de acometimento com a COVID-19 e não somente pela presença do genoma viral no organismo. Sendo assim, o voluntário pode ser caracterizado como positivo para a infecção através do teste molecular, mas manter sorologia negativa ou com baixo sinal vai depender do tempo que a resposta humoral foi iniciada (Baron *et al.*, 2020). Outros fatores como a coleta do material biológico fora do período de replicação viral, resulta em um teste molecular falso-negativo e ainda assim, posteriormente, em um resultado sorológico positivo, como é explicado por Perez-Toledo e colaboradores (2020). Além disso, a sorologia positiva em amostras negativas por testes moleculares pode indicar infecção prévia por SARS-CoV-2 seguido de eliminação do vírus (Beavis *et al.*, 2020). Seguindo o racional de estudos semelhantes, amostras *borderline*, acima do *cut-off*, previamente caracterizada como positiva por teste molecular pode ser estabelecida como amostra positiva no teste, como foi padronizado por Yassine e colaboradores (2021) e por Meyer e colaboradores (2020).

A área sob a curva obtida através dos ensaios utilizando ambas as frações da proteína recombinante 1 aponta a alta sensibilidade e especificidade do teste, destacando-se os resultados de detecção de IgA e IgG anti-Sars-Cov-2, com área sob a curva acima de 0,97. Ensaio imunoenzimático baseado em ELISA em trabalhos anteriores demonstraram resultados semelhantes de análise do desempenho considerando a área sob a curva (Mireles *et al.*, 2020; Djukic *et al.*, 2021; Corsini *et al.*, 2022). Além disso, os parâmetros de sensibilidade e especificidade para detecção de IgA e IgG estão de acordo com os parâmetros alcançados em testes disponíveis comercialmente e registrados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Assis *et al.*, 2022).

Estes resultados indicam que o antígeno Proteína Recombinante 1 fração insolúvel e solúvel, apresentam boa eficiência na identificação de anticorpos específicos das classes IgA, IgM e IgG específicos anti-SARS-CoV-2. Este resultado vai de acordo com publicações anteriores de Alandijany e colaboradores (2020), Xi e colaboradores (2020), e Frumence e colaboradores (2021) que demonstram que proteínas recombinantes são

bastante eficazes e utilizadas para compor testes diagnósticos baseados em ELISA, em especial para diagnosticar a COVID-19, bem como em ambas as frações: solúvel e insolúvel.

Além disso, essa validação confirma os estudos sobre a presença de imunoglobulinas específicas anti-SARS-CoV-2 circulantes no sangue após 15 dias do início da infecção, como é descrito em publicações de Siracusano (2020) e Galipeau e colaboradores (2020). Estes resultados também corroboram com estudos anteriores onde se observou que antígenos oriundos de estruturas do nucleocapsídeo são altamente antigênicas durante a infecção por SARS-CoV-2, sendo consideradas potenciais antígenos para compor testes diagnósticos imunoenzimático de alto desempenho na detecção de anticorpos específicos anti-SARS-CoV-2 (Liu *et al.*, 2020). Ludolf e colaboradores, também utilizando proteína recombinante do nucleocapsídeo, demonstraram alto desempenho no desenvolvimento de um teste diagnóstico baseado em ELISA *in-house* capaz de detectar anticorpos IgG específicos anti-SARS-CoV-2, não só em amostras de soro, mas também em amostras de urina de voluntários previamente identificados como positivo por teste molecular de RT-PCR.

Ainda assim, pesquisas anteriores, utilizando antígenos oriundos da estrutura do nucleocapsídeo do SARS-CoV-2 em testes diagnósticos sorológicos, relataram menor sensibilidade na identificação de IgM, resultando em falsos negativos (Yu *et al.*, 2020). Yu e colaboradores demonstraram que isso se dá pelo fato de que as proteínas *Spikes*, por serem estruturas transmembranas, estimulam mais facilmente o organismo a produzir anticorpos IgM na fase aguda da infecção (Yu *et al.*, 2020). Este aspecto justifica a inclusão da proteína recombinante S2, *Spike*, em kits diagnósticos para detecção de IgM anti-Sars-Cov-2, como o do fabricante Erba Mannheim ErbaLISA (Kulkarni *et al.*, 2021). Porém, o teste comparativo entre o antígeno Proteína recombinante 1 e o kit Euroimmun buscando anticorpos de classe IgA obtiveram resultados bem próximos de sensibilidade, especificidade e área sob a curva. Este é um resultado semelhante ao de Meyer e colaboradores (2020) utilizando o kit comercial Euroimmun-IgA. Além do mais, assim com o IgM, o IgA também é um anticorpo de fase aguda na COVID-19 (Siracusano, 2020). Por se tratar de um anticorpo que está diretamente relacionado a resposta frente a infecções no tecido mucoso, principalmente nas mucosas do trato respiratório, a busca por anticorpos da classe IgA se torna ainda mais interessante em diagnósticos sorológicos para a COVID-19 em comparação ao IgM (Quinti *et al.*, 2021).

Quando comparado com o kit diagnóstico da BIOLISA buscando anticorpos da classe IgG, os resultados sensibilidade, especificidade, e área sob a curva se demonstraram muito próximos em relação ao ensaio com a proteína recombinante 1. Além disso, quando comparado ao kit diagnóstico Labtest buscando anticorpos de classe IgG, o antígeno Proteína recombinante 1, em suas duas frações, demonstrou maior sensibilidade, especificidade e área sob a curva. Estes resultados sugerem que um teste sorológico imunoenzimático utilizando o antígeno Proteína recombinante 1 pode ser utilizado ao nível populacional para avaliar a titulação de anticorpos de classe IgA, IgM e IgG de um indivíduo (Magalhães, 2021). Dutta e colaboradores (2020) sugerem que testes diagnósticos que utilizam sequências da estrutura do Nucleocapsídeo se tornam testes mais eficazes em diagnosticar anticorpos anti-SARS-CoV-2 em relação aos testes utilizando sequências oriundas da estrutura *Spike*. Isso se dá pelo fato de que as estruturas *Spikes* são estruturas mais mutagênicas em relação as estruturas do Nucleocapsídeo ((Dutta *et al.*, 2020).). Mesmo que o vírus no ambiente sofresse alterações mutagênicas em suas estruturas *Spikes*, os testes imunoenzimáticos que utilizam antígenos da estrutura do Nucleocapsídeo continuariam capazes de realizar diagnósticos precisos (Dutta *et al.*, 2020).

De forma interessante, os resultados obtidos indicam que o antígeno Proteína Recombinante 1 é um potencial candidato para compor um teste imunoenzimático capaz de apontar a soroconversão considerando anticorpos da classe IgG específicos anti-SARS-CoV-2, após 21 dias da terceira aplicação do imunizante CoronaVac. Embora os níveis de anticorpos necessários para a proteção contra reinfecção ainda não seja consenso, como aponta Bochnia-Bueno e colaboradores (2022), este resultado, indica a capacidade de detecção de anticorpos empregando-se antígeno da estrutura nucleocapsídeo após a vacinação, como demonstrado por Carpeggiani Junior e colaboradores (2022). Essa possibilidade é apontada devido ao fato de que o imunizante CoronaVac é constituído do antígeno viral completo na forma inativada, como descreve Andrade (2021). Uma vez em que o organismo é exposto a essa formulação viral inativada, ele produz imunoglobulinas específicas contra todas as sequências estruturais virais, obtendo uma resposta imunológica mais ampla, como sugere Medeiros-Ribeiro e colaboradores (2021) e Sester (2022). Por sua vez, o antígeno recombinante 1 é constituído de sequências do nucleocapsídeo do SARS-CoV-2, e sendo utilizado em um teste sorológico imunoenzimático, os anticorpos específicos induzidos pela vacinação

com a CoronaVac poderão ser identificados no teste do presente estudo, indicando a soroconversão vacinal (Carpeggiani Junior *et al.*, 2022).

Porém, percebe-se que, ao contrário dos resultados obtidos sobre a soroconversão com o imunizante CoronaVac, a proteína Recombinante 1 não é um bom antígeno para compor um teste sorológico capaz de revelar a soroconversão em indivíduos vacinados com a AstraZeneca. De fato, este foi um resultado esperado, devido ao fato de que o imunizante AstraZeneca é constituído pelo vetor viral não-replicante de adenovírus de chimpanzé inserido com sequências das estruturas *Spikes* do SARS-CoV-2 (Limami *et al.*, 2022). Neste sentido, como o antígeno Proteína Recombinante 1, utilizado na realização do teste é composto por sequências antigênicas do nucleocapsídeo do vírus, o seu uso não seria capaz de identificar anticorpos induzidos pela proteína *Spike*. No entanto, os resultados demonstrados durante o teste de validação da Proteína Recombinante 1 revelou que é uma boa candidata para compor um teste sorológico capaz de diagnosticar a exposição prévia ao vírus ou identificar soroconversão induzida pela vacinação com a CoronaVac.

Tendo em vista os resultados altamente promissores da Proteína Recombinante 1 para identificação de anticorpos específicos contra o Sars-Cov-2 e também na detecção de soroconversão após a imunização com a CoronaVac, tornou-se altamente relevante o desenvolvimento do protótipo do teste rápido com esta proteína. Assim, ao final do desenvolvimento e padronização da prova de conceito do teste imunocromatográfico de fluxo lateral, utilizando o antígeno Proteína Recombinante 1, foi possível observar que este antígeno também demonstrou capacidade de ser impregnado na membrana de nitrocelulose para compor o teste imunocromatográfico de fluxo lateral contra o Sars-Cov-2. Trabalhos de Mahmoudinobar (2021) e Li e colaboradores (2021), também demonstram bom desempenho durante a utilização de proteínas recombinantes em testes imunocromatográfico de fluxo lateral.

Após a aplicação da amostra de soro positivo, seguido da aplicação da solução diluente, foi possível constatar o perfeito funcionamento do fluxo líquido da amostra de soro junto a solução de diluição através da membrana de nitrocelulose em direção ao filtro de absorção. Resultado que pode ser constatado com a aparição da linha teste e controle. Porém, assim como o protótipo desenvolvido e publicado por Santos e colaboradores (2022), é possível observar o aparecimento de linha leves, isto pode ser justificado pelo desenvolvimento *in-house* do teste sem a utilização de um equipamento específico para administrar o antígeno a membrana.

Assim como Grant e colaboradores (2020), conseguimos realizar o acoplamento bem-sucedido entre os conjugados anti-humano e controle as microesferas carboxiladas utilizando o protocolo de ativação da Merck Millipore como base dos procedimentos que foram padronizados. As microesferas *Estapor*® K-30 Azul (Merck) conjugadas com os anticorpos secundários são brilhantes e exibem a coloração azul visível após a ligação com o anticorpo na membrana de nitrocelulose, sendo visualizadas a olho nu para a leitura e interpretação de resultado além do baixo custo, resultados rápidos e boa produtividade (Millipore, 2008).

Estes resultados preliminares indicam que o teste imunocromatográfico rápido utilizando o antígeno Proteína Recombinante 1 demonstra eficiência em diagnosticar a COVID-19, com a capacidade de entregar um resultado sorológico em 10 minutos. Porém este é um protótipo que exige mais ensaios de reprodutibilidade e validação com a finalidade de definir a sua sensibilidade e especificidade.

7. RESUMO DOS RESULTADOS

Com base no que foi apresentado no desenvolvimento deste trabalho, os antígenos peptídicos #1.12.8, #1.13.9, #1.14.10, #1.15.11, identificados pela técnica de bioinformática, demonstraram área sob a curva superiores a 0,70 para as três classes de anticorpos investigadas: IgA, IgM e IgG. Os resultados obtidos para identificação de anticorpos da classe IgA e IgG anti-Sars-Cov-2 revelaram área sob a curva de 0,9. Também foi possível determinar o ganho na capacidade diagnóstica (sensibilidade, especificidade e área sob a curva) relacionado ao ensaio de combinações entre os antígenos peptídicos #1.11.7, #1.21.17 e #1.22.18, para detecção de anticorpos da classe IgA e IgG. Este ensaio de combinações antigênicas apresentou área sob a curva superior a 0,96 para detecção de anticorpos da classe IgA e 1,0 para identificação de anticorpos da classe IgG anti-Sars-Cov-2. Portanto, estes resultados demonstraram que estes antígenos peptídicos, triados pela técnica de bioinformática, confirmam ser potenciais candidatos para compor um teste imunoenzimático para diagnosticar a presença de anticorpos induzidos pelo Sars-Cov-2.

O antígeno identificado pela expressão heteróloga em *Escherichia coli*, caracterizado como Proteína Recombinante 1 (fração solúvel e fração insolúvel) também revelou bom desempenho diagnóstico (sensibilidade, especificidade e área sob a curva), considerando que a área sob a curva foi superior a 0,71 para as três classes de anticorpos investigadas: IgA, IgM e IgG. Vale destacar os resultados de reatividade de IgA e IgG que apresentaram área sob a curva superiores a 0,97 para IgA e 0,99 para IgG, considerando as duas frações do Antígeno Recombinante 1.

Foi possível verificar que o Antígeno Recombinante 1 apresentou resultados semelhantes aos testes comerciais (EUROIMMUN, BIOLISA, Allserum, ErbaLisa e Labtest) para detecção da reatividade de anticorpos da classe IgA. Porém, a análise da reatividade dos anticorpos da classe IgM demonstrou que os testes comerciais apresentaram desempenho ligeiramente superior ao observado pelo Antígeno Recombinante 1. Entretanto, o ensaio comparativo de reatividade de anticorpos da classe IgG revelou que os resultados do Antígeno Recombinante 1 foram semelhantes em relação aos kits comerciais. Além disto, foi demonstrado ainda uma expressiva vantagem nos parâmetros de sensibilidade e área sob a curva quando comparado ao teste do fabricante Labtest. Dessa maneira, é possível propor que o Antígeno Recombinante 1,

composto pela fração solúvel e insolúvel, é um potencial candidato para compor um teste imunoenzimático, com resultados equivalentes aos testes comerciais avaliados.

A análise de soroconversão empregando-se o Antígeno Recombinante 1, em indivíduos imunizados com a CoronaVac e AstraZeneca, revelou a presença de anticorpos da classe IgG detectáveis apenas em indivíduos vacinados com a vacina CoronaVac após 21 dias da terceira aplicação do imunizante. Diante dos resultados deste ensaio, foi possível identificar que o Antígeno Recombinante 1 também é um potencial candidato para compor um teste diagnóstico imunoenzimático capaz de revelar a soroconversão de IgG em indivíduos vacinados a CoronaVac.

8. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos neste estudo, é possível concluir que o objetivo de desenvolver e padronizar um teste diagnóstico imunoenzimático de baixo custo e ainda assim, com alto desempenho, utilizando antígenos oriundos de estruturas do SARS-CoV-2 foi alcançado. Esta conclusão é sustentada pela:

(i) identificação de antígenos peptídicos triados por bioinformática, que demonstraram excelente desempenho diagnóstico na identificação de anticorpos IgA e IgG anti-Sars-Cov-2, por ELISA, especialmente quando combinados (antígeno #1.11.7 associado ao antígeno #1.21.17; antígeno #1.11.7 associado ao antígeno #1.22.18);

(ii) pelos resultados da reatividade de anticorpos IgA e IgG anti-Sars-Cov-2, identificados pelo Antígeno Recombinante 1 no ensaio de ELISA, sendo equivalente aos testes sorológicos comerciais (EUROIMMUN, BIOLISA, Allserum, ErbaLisa e Labtest) avaliados neste estudo;

(iii) capacidade de detectar a soroconversão de indivíduos imunizados com a CoronaVac pelo Antígeno Recombinante 1;

(iv) potencial aplicação do Antígeno Recombinante 1 na forma de teste rápido imunocromatográfico para detecção de IgG contra Sars-Cov-2, conforme protótipo desenvolvido.

9. PERSPECTIVAS

Atualmente, a Coordenadoria de Transferência e Inovação Tecnológica (CTIT) da UFMG está auxiliando no estabelecimento do contrato de transferência tecnológica, para a empresa Vida Biotecnologia, do kit diagnóstico por ELISA e do protótipo do teste imunocromatográfico de fluxo lateral para detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2. A expectativa é que este processo esteja concluído até o final do ano de 2022.

10. PRODUÇÕES

Até a presente data, o projeto foi contemplado com o depósito de 12 patentes no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), proveniente dos antígenos empregados durante o desenvolvimento do Kit diagnóstico COVID-19. E durante o curso do mestrado tive a oportunidade de participar como coautor em três publicações de revisão. Como demonstrado a seguir.



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 019293 0



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 019265 5



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2021 006759 4



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2021 010080 0



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 019265 5



24/09/2020 870200119513
12:21
29409161922460647

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 019293 0



23/12/2021 870210120343
18:01
29409161940741652

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2021 026360 1



23/12/2021 870210120378
18:43
29409161940742098

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2021 026373 3



23/12/2021 870210120387
19:01
29409161940742217

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2021 026378 4



23/12/2021 870210120402
19:23
29409161940742276

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2021 026385 7



23/12/2021 870210120409
19:40
29409161940742349

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2021 026390 3



06/05/2021 870210041229
12:51
29409161927748703

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2021 008834 6



Historical Perspective and Biotechnological Trends to Block Arboviruses Transmission by Controlling *Aedes aegypti* Mosquitos Using Different Approaches

OPEN ACCESS

Edited by:
Herbert Leonil de Matos Gusdin,
Federal University of Rio de
Janeiro, Brazil

Reviewed by:
Ajay Kumar Sharma,
Institute of Nuclear Medicine & Allied
Sciences (IRAD), India
Devanathan Subramaniam,
Defence Research & Development
Establishment (DRDE), India

***Correspondence:**
Rodolfo Cordeiro Giunchetti
giunchetti@icb.ufmg.br;
giunchetti@gmail.com

Marina Luiza Rodrigues-Alves¹, Ottoni Alves de Oliveira Melo-Júnior¹, Patricia Silveira¹,
Reysla Maria da Silveira Mariano¹, Jaqueline Costa Leite¹, Thaiza Aline Pereira Santos¹,
Ingrid Santos Soares¹, Daniel Ferreira Lair¹, Marília Martins Melo²,
Lucilene Aparecida Rosendo¹, Danilo da Silveira-Lemos^{1,3}, Walderez Ornelas Dutra¹,
Nelder de Figueiredo Gontijo⁴, Ricardo Nascimento Araujo⁴,
Mauro Roberto Viana Sant'Anna⁴, Luis Adan Flores Andrade⁵,
Flávio Guimarães da Fonseca⁶, Luciano Andrade Moreira⁶ and
Rodolfo Cordeiro Giunchetti^{1*}

¹Laboratório de Biologia das Interações Celulares, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ²Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Escola de
Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ³Departamento de Medicina, Universidade José
Do Rosário Vellano, UNIFENAS, Belo Horizonte, Brazil, ⁴Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos, Departamento de
Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ⁵Laboratório de
Virologia Básica e Aplicada, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas
Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ⁶Laboratório de Mosquitos Vetores: Endossimbiontes e Interação Patógeno-Vetor, Instituto
Reni Pacheco, Foz de Iguaçu, Brazil

Ticks and Tick-borne Diseases 12 (2021) 101631



Contents lists available at ScienceDirect

Ticks and Tick-borne Diseases

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



Review Article

Vaccine approaches applied to controlling dog ticks

Helen Silva Ribeiro^a, Diogo Fonseca Soares Pereira^a, Ottoni Melo-Júnior^a,
Reysla Maria da Silveira Mariano^a, Jaqueline Costa Leite^a, Augusto Ventura da Silva^a,
Diana Souza de Oliveira^a, Ana Alice Maia Gonçalves^a, Daniel Ferreira Lair^a,
Ingrid dos Santos Soares^a, Thaiza Aline Pereira Santos^a, Alexsandro Sobreira Galdino^b,
Denise da Silveira-Lemos^c, Paulo Ricardo de Oliveira Paes^d, Marília Martins Melo^d,
Walderez Ornelas Dutra^a, Ricardo Nascimento Araujo^e, Rodolfo Cordeiro Giunchetti^{a,*}

^a Laboratory of Cells Interactions, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 31270-901, Brazil

^b Microbial Biotechnology Laboratory, Biochemistry, Federal University of São João Del-Rei, Divinópolis, MG, 35501-296, Brazil

^c University José de Rosário Vellano, UNIFENAS, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^d Department of Veterinary Clinic and Surgery, Veterinary College, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^e Laboratory of Physiology of Hematophagous Insects, Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Ticks and Tick-borne Diseases 13 (2022) 101828



Contents lists available at ScienceDirect

Ticks and Tick-borne Diseases

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



Review Article

Rhipicephalus microplus: An overview of vaccine antigens against the cattle tick

Diogo Fonseca Soares Pereira^a, Helen Silva Ribeiro^a, Ana Alice Maia Gonçalves^a,
Augusto Ventura da Silva^a, Daniel Ferreira Lair^a, Diana Souza de Oliveira^a,
Diego Fernandes Vilas Boas^a, Ingrid dos Santos Soares Conrado^a, Jaqueline Costa Leite^a,
Luccas Miranda Barata^a, Pedro Campos Carvalhaes Reis^a, Reysla Maria da Silveira Mariano^a,
Thaiza Aline Pereira Santos^a, Danielle Carvalho Oliveira Coutinho^a,
Nelder de Figueiredo Gontijo^b, Ricardo Nascimento Araujo^b, Alexsandro Sobreira Galdino^c,
Paulo Ricardo de Oliveira Paes^d, Marília Martins Melo^d, Ronaldo Alves Pinto Nagem^e,
Walderez Ornelas Dutra^a, Denise da Silveira-Lemos^f, Daniel Sobreira Rodrigues^g,
Rodolfo Cordeiro Giunchetti^{a,*}

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, Dae-Gyun et al. Current status of epidemiology, diagnosis, therapeutics, and vaccines for novel coronavirus disease 2019 (COVID-19). 2020.
- ALANDIJANY, Thamir A. et al. Development and optimization of in-house ELISA for detection of human IgG antibody to SARS-CoV-2 full length spike protein. **Pathogens**, v. 9, n. 10, p. 803, 2020.
- ALENCAR, Carlos Henrique et al. High effectiveness of SARS-CoV-2 vaccines in reducing COVID-19-related deaths in over 75-year-olds, Ceará State, Brazil. **Tropical medicine and infectious disease**, v. 6, n. 3, p. 129, 2021.
- ALMENDÁREZ-RODRIGUEZ, Claudia et al. Production and characterization of chimeric SARS-CoV-2 antigens based in the capsid protein of cowpea chlorotic mottle virus. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2022.
- AMRUN, Siti Naqiah et al. Linear B-cell epitopes in the spike and nucleocapsid proteins as markers of SARS-CoV-2 exposure and disease severity. **EBioMedicine**, v. 58, p. 102911, 2020.
- ANDRADE, Bianca Santos de Arcenio. Reações adversas pós vacinação contra a covid-19 em colaboradores de um laboratório de análises clínicas situado na Bahia. 2021.
- ANDRIES, Jessica et al. The SARS-CoV-2 spike residues 616/644 and 1138/1169 delineate two antibody epitopes in COVID-19 mRNA COMIRNATY vaccine (Pfizer/BioNTech). **Scientific reports**, v. 12, n. 1, p. 1-13, 2022.
- AZKUR, Ahmet Kursat et al. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. **Allergy**, v. 75, n. 7, p. 1564-1581, 2020.
- BALLOCH, Saira et al. The Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pandemic. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 250, n. 4, p. 271-278, 2020.
- BATTY, Cole J. et al. Vaccine formulations in clinical development for the prevention of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 169, p. 168-189, 2021.
- BEAVIS, Kathleen G. et al. Evaluation of the EUROIMMUN Anti-SARS-CoV-2 ELISA Assay for detection of IgA and IgG antibodies. **Journal of Clinical Virology**, v. 129, p. 104468, 2020.
- BENSON, D. A. et al. GenBank. **Nucleic Acids Res.** 41, D36-42, 2013.
- BARON, Rita Christiane et al. Frequency of serological non-responders and false-negative RT-PCR results in SARS-CoV-2 testing: a population-based study. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 58, n. 12, p. 2131-2140, 2020.

BOCHNIA-BUENO, Lucas et al. Dynamic of humoral response to SARS-CoV-2 anti-Nucleocapsid and Spike proteins after CoronaVac vaccination. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 102, n. 3, p. 115597, 2022.

CAMACHO, C. et al. BLAST+: architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, v. 10, n. 1, p. 421, 2009.

CARPEGGIANI JUNIOR, Sergio Pedro et al. Avaliação de um imunoenensaio ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) padronizado utilizando proteína recombinante de nucleocapsídeo (50-350) de SARS-CoV-2 como ferramenta de avaliação de resposta imune humoral em indivíduos vacinados com CoronaVac. 2022.

CERQUEIRA-SILVA, Thiago et al. Effectiveness of CoronaVac, ChAdOx1 nCoV-19, BNT162b2, and Ad26. COV2. S among individuals with previous SARS-CoV-2 infection in Brazil: a test-negative, case-control study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 22, n. 6, p. 791-801, 2022.

Coronavac. [BULA]. China: SINO VAC LIFE SCIENCES CO., LTD.2021

CORSINI, Camila Amormino et al. **Avaliação da resposta imune contra SARS-CoV-2 analisada por até seis meses da infecção aguda e utilidade clínica de testes rápidos imunocromatográficos disponíveis no Brasil**. 2022. Tese de Doutorado.

DE ASSIS, Tália Santana Machado et al. Cost-effectiveness of anti-SARS-CoV-2 antibody diagnostic tests in Brazil. **PloS one**, v. 17, n. 2, p. e0264159, 2022.

DJUKIC, Teodora et al. Expression, purification and immunological characterization of recombinant nucleocapsid protein fragment from SARS-CoV-2. **Virology**, v. 557, p. 15-22, 2021.

DO PRODUTO, FINALIDADE E. USO. ONE STEP COVID-2019 TEST (IMUNOCROMATOGRRAFIA).

DOLSCHEID-POMMERICH, Ramona et al. Correlation between a quantitative anti-SARS-CoV-2 IgG ELISA and neutralization activity. **Journal of medical virology**, v. 94, n. 1, p. 388-392, 2022.

DOYTCHINOVA, I. A.; FLOWER, D. R. Bioinformatic Approach for Identifying Parasite and Fungal Candidate Subunit Vaccines. **The Open Vaccine Journal**, v. 1, n. 1, p. 22–26, 2008.

DRAIN, Paul K. Rapid diagnostic testing for SARS-CoV-2. **New England journal of medicine**, v. 386, n. 3, p. 264-272, 2022.

ESTOFOLETE, Cassia F. et al. Case study of two post vaccination SARS-CoV-2 infections with P1 variants in CoronaVac vaccinees in Brazil. **Viruses**, v. 13, n. 7, p. 1237, 2021.

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

FREITAS, Larissa Silva de et al. Bioprospecting by Phage Display of Mimetic Peptides of Chlamydia trachomatis for Use in Laboratory Diagnosis. **Infection and Drug Resistance**, p. 4935-4945, 2022.

FRUMENCE, Etienne et al. Robust and low-cost ELISA based on IgG-Fc tagged recombinant proteins to screen for anti-SARS-CoV-2 antibodies. **Journal of immunological methods**, v. 495, p. 113082, 2021.

GARBER, Carl. MedCalc Software for Statistics in Medicine. MedCalc Software, Broekstraat 52, 9030 Mariakerke, Belgium, \$399.00. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 6, p. 1370-1370, 1998.

GASPAR, E. B. et al. Diagnóstico veterinário por ensaio imunoabsorvente ligado a enzima: revisão atualizada. **Embrapa Pecuária Sul-Documentos (INFOTECA-E)**, 2015.

GASTEIGER, Elisabeth et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. **The proteomics protocols handbook**, p. 571-607, 2005.

GALIPEAU, Yannick et al. Humoral responses and serological assays in SARS-CoV-2 infections. **Frontiers in immunology**, p. 3382, 2020.

GEER, Lewis Y. et al. The NCBI biosystems database. **Nucleic acids research**, v. 38, n. suppl_1, p. D492-D496, 2010.

GIOVANETTI, Marta et al. Genomic epidemiology of the SARS-CoV-2 epidemic in Brazil. **Nature Microbiology**, p. 1-11, 2022.

GODOI, Alana Rezende et al. Maternal exposure of rats to sodium saccharin during gestation and lactation on male offspring. **Biology of Reproduction**, 2022.

GONÇALVES-PEREIRA MH, Santiago L, Ravetti CG, Vassallo PF, de Andrade MVM, Vieira MS, Oliveira FFS, Carobin NV, Li G, Sabino AP, Nobre V, Santiago HDC. Dysfunctional phenotype of systemic and pulmonary regulatory T cells associates with lethal COVID-19 cases. **Immunology**. 2022 Nov 8. doi: 10.1111/imm.13603. Epub ahead of print. PMID: 36349514.

GOIJON, Mickael et al. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL–EBI. **Nucleic acids research**, v. 38, n. suppl_2, p. W695-W699, 2010.

GRANT, Benjamin D. et al. SARS-CoV-2 coronavirus nucleocapsid antigen-detecting half-strip lateral flow assay toward the development of point of care tests using commercially available reagents. **Analytical chemistry**, v. 92, n. 16, p. 11305-11309, 2020.

GUO, Li et al. Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19). **Clinical Infectious Diseases**, 2020.

HERRSCHER, Charline et al. ELISA-based analysis reveals an anti-SARS-CoV-2 protein immune response profile associated with disease severity. *Journal of clinical medicine*, v. 11, n. 2, p. 405, 2022.

HOO, Zhe Hui; CANDLISH, Jane; TEARE, Dawn. What is an ROC curve? **Emergency Medicine Journal**, v. 34, n. 6, p. 357-359, 2017.

JOHNS HOPKINS University & Medicine, 2022. COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at **Johns Hopkins University** (JHU). Disponível em: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>.

KANNAN, S. P. A. S. et al. COVID-19 (Novel Coronavirus 2019) -recent trends. **Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci**, v. 24, n. 4, p. 2006-2011, 2020.

KANNO, Alex I. et al. SARS-CoV-2 vaccine development and how Brazil is contributing. **Genetics and Molecular Biology**, v. 44, 2021.

KOELLE, Katia et al. The changing epidemiology of SARS-CoV-2. *Science*, v. 375, n. 6585, p. 1116-1121, 2022.

LEI, Xiaobo et al. Activation and evasion of type I interferon responses by SARS-CoV-2. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2020.

KULKARNI, Ruta et al. Performance assessment of SARS-CoV-2 IgM & IgG ELISAs in comparison with plaque reduction neutralization test. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 153, n. 5-6, p. 658, 2021.

LAMERS, Mart M.; HAAGMANS, Bart L. SARS-CoV-2 pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 270-284, 2022.

LI, Chunyang et al. Asymptomatic and human-to-human transmission of SARS-CoV-2 in a 2-family cluster, Xuzhou, China. **Emerging infectious diseases**, v. 26, n. 7, p. 1626, 2020.

LI, Kesheng et al. Development and clinical evaluation of a rapid antibody lateral flow assay for the diagnosis of SARS-CoV-2 infection. **BMC infectious diseases**, v. 21, n. 1, p. 1-9, 2021.

LI, Tao et al. Serum SARS-COV-2 nucleocapsid protein: a sensitivity and specificity early diagnostic marker for SARS-COV-2 infection. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 470, 2020.

LI, Fang. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. **Annual review of virology**, v. 3, p. 237-261, 2016.

LIMAMI, Youness et al. Oxford-AstraZeneca ChAdOx1 COVID-19 vaccine does not alter platelet aggregation. In: **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**. Thieme Medical Publishers, Inc., 2022. p. 109-111.

LIU, Xuemei et al. Patterns of IgG and IgM antibody response in COVID-19 patients. **Emerging microbes & infections**, v. 9, n. 1, p. 1269-1274, 2020.

LIU, Wanbing et al. Evaluation of nucleocapsid and spike protein-based enzyme-linked immunosorbent assays for detecting antibodies against SARS-CoV-2. **Journal of clinical microbiology**, v. 58, n. 6, p. e00461-20, 2020.

LUDOLF, Fernanda et al. Detecting anti-SARS-CoV-2 antibodies in urine samples: A noninvasive and sensitive way to assay COVID-19 immune conversion. **Science Advances**, v. 8, n. 19, p. eabn7424, 2022

LUIZ, Gabriel P. et al. Determinação de epítomos conformacionais para desenvolvimento de teste sorológico para a COVID-19.

MAFFEI, Mariano et al. The nuts and bolts of SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain heterologous expression. **Biomolecules**, v. 11, n. 12, p. 1812, 2021.

MAGALHÃES, Yara Zanin. Validação populacional de um novo teste de baixo custo para diagnóstico da Covid-19.

MAHASE, Elisabeth. Covid-19: death rate is 0.66% and increases with age, study estimates. **BMJ: British Medical Journal** (Online), v. 369, 2020.

MAHMOUDINOBAR, Farbod; BRITTON, Dustin; MONTCLARE, Jin Kim. Protein-based lateral flow assays for COVID-19 detection. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 34, 2021.

MEDEIROS-RIBEIRO, Ana C. et al. Immunogenicity and safety of the CoronaVac inactivated vaccine in patients with autoimmune rheumatic diseases: a phase 4 trial. **Nature medicine**, v. 27, n. 10, p. 1744-1751, 2021.

MEIRELES, LUCIANA R. et al. Natural versus recombinant viral antigens in SARS-CoV-2 serology. **Clinics**, 2020.

METZ, Charles E. Basic principles of ROC analysis. In: **Seminars in nuclear medicine**. **WB Saunders**, 1978. p. 283-298.

MEYER, Benjamin et al. Validation of a commercially available SARS-CoV-2 serological immunoassay. **Clinical microbiology and infection**, v. 26, n. 10, p. 1386-1394, 2020.

MILLIPORE CORPORARION. **Rapid lateral flow test strip**: considerations for product. Billerica, 2008. 39 p.

MILLIPORE, M. Microsphere Coupling—Two-step EDC/Sulfo NHS Covalent Coupling Procedure for Estapor® Carboxyl-modified Dyed Microspheres 2015, in Application Note. **Available from: AN1260EN00_MM. pdf from merckmillipore. com**, 2015.

MONTOMOLI, Emanuele et al. Timeline of SARS-CoV-2 spread in Italy: results from an independent serological retesting. **Viruses**, v. 14, n. 1, p. 61, 2021.

MORENO, Adriana Maria Henao. Peptídeos Recombinantes rSnSAG1 E rSnSAG5 DE Sarcocystis neurona Expressos em Pichia pastoris Para o Diagnóstico Imunoenzimático DA Mieloencefalite Protozoária Equina (EPM). 2017.

PAL, Mahendra et al. Severe acute respiratory syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2): An update. **Cureus**, v. 12, n. 3, 2020.

PANDEY, Shashank; MALVIYA, Gaurav; CHOTTOVA DVORAKOVA, Magdalena. Role of peptides in diagnostics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 8828, 2021.

PATTINSON, David et al. A Novel Method to Reduce ELISA Serial Dilution Assay Workload Applied to SARS-CoV-2 and Seasonal HCoVs. **Viruses**, v. 14, n. 3, p. 562, 2022.

PEKAR, Jonathan E. et al. The molecular epidemiology of multiple zoonotic origins of SARS-CoV-2. **Science**, v. 377, n. 6609, p. 960-966, 2022.

PEIRIS, Malik et al. Neutralizing antibody titres to SARS-CoV-2 Omicron variant and wild-type virus in those with past infection or vaccinated or boosted with mRNA BNT162b2 or inactivated CoronaVac vaccines. **Research square**, 2022.

PEREIRA, Nayara Gonçalves et al. Bioinformática como ferramenta na análise de epitopos antigênicos no design de vacinas contra Anaplasma marginale, Leishmania spp., SARS-Cov-2 e toxina de Clostridium septicum. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 41634-41650, 2021.

PEREZ-TOLEDO, Marisol et al. Serology confirms SARS-CoV-2 infection in PCR-negative children presenting with Paediatric Inflammatory Multi-System Syndrome. **MedRxiv**, 2020.

POLVERE, Immacolata et al. A peptide-based assay discriminates individual antibody response to SARS-CoV-2. **Genes & Diseases**, v. 9, n. 1, p. 275-281, 2022.

PRADELLA, Gabriela Döwich et al. In-house serological ELISA as a leishmaniosis diagnostic test: development and applications in canines from the western border of Brazil. **Ciência Rural**, v. 53, 2022.

PUM, Alexandra et al. Cytokines and chemokines in SARS-CoV-2 infections—therapeutic strategies targeting cytokine storm. **Biomolecules**, v. 11, n. 1, p. 91, 2021.

QUACH, Huy Quang et al. Detection of SARS-CoV-2 peptide-specific antibodies in Syrian hamster serum by ELISA. **Journal of Immunological Methods**, v. 505, p. 113275, 2022.

QUINTI, Isabella et al. IgA antibodies and IgA deficiency in SARS-CoV-2 infection. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, p. 655896, 2021.

QIU, Maofeng et al. Use of the COOH portion of the nucleocapsid protein in an antigen-capturing enzyme-linked immunosorbent assay for specific and sensitive detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 12, n. 3, p. 474-476, 2005.

RAMOS, Maíra Catharina et al. Nota rápida de evidência: testes diagnósticos de antígenos com autocoleta de material biológico para diagnóstico de COVID-19. 2021.

RASHID, Zetti Zainol et al. Diagnostic performance of COVID-19 serology assays. **The Malaysian Journal of Pathology**, v. 42, n. 1, p. 13-21, 2020.

RAZALI, Rafida; SUBBIAH, Vijay Kumar; BUDIMAN, Cahyo. Technical data of heterologous expression and purification of SARS-CoV-2 proteases using *Escherichia coli* system. **Data**, v. 6, n. 9, p. 99, 2021.

RINCÓN, M^a Alejandra Loaiza. **AUTO-TEST COVID-19: Un programa de formación para personal no sanitario SELF-TEST COVID-19: A training program for non-healthcare staff**. 2021. Tese de Doutorado. Universidad de Zaragoza.

RIKHTEGARAN TEHRANI, Zahra et al. Performance of nucleocapsid and spike-based SARS-CoV-2 serologic assays. **PloS one**, v. 15, n. 11, p. e0237828, 2020.

ROY, Vicky et al. SARS-CoV-2-specific ELISA development. **Journal of immunological methods**, v. 484, p. 112832, 2020.

SAHA, S.; RAGHAVA, G. P. S. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 65, n. 1, p. 40–48, 2006.

SAHIN, Ahmet Riza et al. 2019 novel coronavirus (COVID-19) outbreak: a review of the current literature. **EJMO**, v. 4, n. 1, p. 1-7, 2020.

SALZBERGER, Bernd et al. Epidemiology of SARS-CoV-2. **Infection**, v. 49, n. 2, p. 233-239, 2021.

SAMUI, Piu; MONDAL, Jayanta; KHAJANCHI, Subhas. A mathematical model for COVID-19 transmission dynamics with a case study of India. **Chaos, Solitons & Fractals**, v. 140, p. 110173, 2020.

SANTOS, B. S. A. S. et al. Nanotechnology meets immunology towards a rapid diagnosis solution: the COVID-19 outbreak challenge. **RSC Advances**, v. 12, n. 49, p. 31711-31728, 2022.

SCUSSEL, Rahisa et al. Peptide-Integrated Superparamagnetic Nanoparticles for the Identification of Epitopes from SARS-CoV-2 Spike and Nucleocapsid Proteins. **ACS applied nano materials**, v. 5, n. 1, p. 642-653, 2022.

SESTER, Martina; BECKER, Sören L. Boosting immunity after CoronaVac. **The Lancet**, v. 399, n. 10324, p. 496-497, 2022.

SETHURAMAN, Nandini; JEREMIAH, Sundararaj Stanleyraj; RYO, Akihide. Interpreting diagnostic tests for SARS-CoV-2. **Jama**, v. 323, n. 22, p. 2249-2251, 2020.

SHAPIRO, David E. The interpretation of diagnostic tests. **Statistical methods in medical research**, v. 8, n. 2, p. 113-134, 1999.

SHI, Yu et al. An overview of COVID-19. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, p. 1, 2020.

SIRACUSANO, Gabriel; PASTORI, Claudia; LOPALCO, Lucia. Humoral immune responses in COVID-19 patients: a window on the state of the art. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 1049, 2020.

SRIVASTAVA, Ashish Kumar et al. Development of robust, indigenous ELISA for detection of IgG antibodies against CoV-2 N and S proteins: mass screening. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 106, n. 18, p. 6225-6238, 2022.

SWETS, John A. Measuring the accuracy of diagnostic systems. **Science**, v. 240, n. 4857, p. 1285-1293, 1988.

TAKAMATSU, Akane et al. Correlation of COVID-19 Severity and Immunoglobulin Presence Against Spike and Nucleocapsid Proteins in SARS-CoV-2. **Viral Immunology**, v. 35, n. 3, p. 254-258, 2022.

TONEN-WOLYEC, Serge et al. Capillary whole-blood IgG-IgM COVID-19 self-test as a serological screening tool for SARS-CoV-2 infection adapted to the general public. **PloS one**, v. 15, n. 10, p. e0240779, 2020.

VANDENBERG, Olivier et al. Considerations for diagnostic COVID-19 tests. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 171-183, 2021.

VELIKOVA, Tsvetelina Veselinova et al. Immunological aspects of COVID-19: What do we know?. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 11, n. 2, p. 14, 2020.

VIEIRA, Luisane Maria Falci et al. COVID-19-Diagnóstico Laboratorial para Clínicos. 2020.

VOYSEY, Merryn et al. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. **The Lancet**, v. 397, n. 10269, p. 99-111, 2021.

WANG, Jingqiang et al. The structure analysis and antigenicity study of the N protein of SARS-CoV. **Genomics, proteomics & bioinformatics**, v. 1, n. 2, p. 145-154, 2003.

WANG, Mengxiang et al. Development of an Effective Double Antigen Sandwich ELISA Based on p30 Protein to Detect Antibodies against African Swine Fever Virus. **Viruses**, v. 14, n. 10, p. 2170, 2022.

WHO, 2022. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. Disponível em: <https://covid19.who.int/>.

WOO, Patrick CY et al. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. **viruses**, v. 2, n. 8, p. 1804-1820, 2010.

XI, Cecy R. et al. A novel purification procedure for active recombinant human DPP4 and the inability of DPP4 to bind SARS-CoV-2. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 5392, 2020.

XU, Meng et al. COVID-19 diagnostic testing: technology perspective. **Clinical and translational medicine**, v. 10, n. 4, p. e158, 2020.

YANG, Yang et al. Laboratory diagnosis and monitoring the viral shedding of 2019-nCoV infections. **MedRxiv**, 2020.

YANG, Haiquan et al. Efficient extracellular production of recombinant proteins in *E. coli* via enhancing expression of *dacA* on the genome. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2022.

YASSINE, Hadi M. et al. Performance evaluation of five ELISA kits for detecting anti-SARS-COV-2 IgG antibodies. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 102, p. 181-187, 2021.

YU, Hua et al. Detection of serum IgM and IgG for COVID-19 diagnosis. **Sci China Life Sci**, v. 63, p. 1678, 2020.

ZANELLA, Rafaela Koehler; VALENTE, Sibelie Souto; VALENTE, Denis Souto. Qual o papel dos testes rápidos de diagnóstico de COVID-19 IgM/IgG no pré-operatório de cirurgia plástica estética?. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 36, p. 63-68, 2022.

12. ANEXOS

Acordo de parceria junto a empresa CODEMGE.

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO - Seção 3

ISSN 1677-7069

Nº 166, sexta-feira, 28 de agosto de 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ

AVISO DE LICITAÇÃO
PREGÃO ELETRÔNICO Nº 47/2020 - UASG 153030

Nº Processo: 2308801519202093. Objeto: Registro de Preços para eventual aquisição de licenças, subscrições de softwares e certificado digital. Total de Itens Licitados: 5. Edital: 28/08/2020 às 08h00 às 17h00. Endereço: Av. Bps, Nr. 1303, Pinheirinho - Itajubá/MG ou www.comprasgovernamentais.gov.br/edital/153030-5-00047-2020. Entrega das Propostas: a partir de 28/08/2020 às 08h00 no site www.comprasnet.gov.br. Abertura das Propostas: 10/09/2020 às 09h30 no site www.comprasnet.gov.br. Informações Gerais: Edital disponível nos sítios: www.comprasgovernamentais.gov.br e www.unifei.edu.br, link licitações - Campus Itajubá.

MARCOS LUCIO MOTA
Pregoeiro

(SIASGnet - 27/08/2020) 153030-15249-2020NE800072

DIRETORIA DO CAMPUS DE ITABIRA

AVISO DE LICITAÇÃO
PREGÃO ELETRÔNICO Nº 25/2020 - UASG 158161

Nº Processo: 23499003875202066. Objeto: Registro de preços para eventual aquisição de reagentes, vidrarias e materiais de consumo para atender demanda do Curso de Engenharia Ambiental, Laboratórios de Bioengenharia, laboratórios de Física e Laboratórios da área de Humanas da Universidade Federal de Itajubá - Campus Itabira. Total de Itens Licitados: 44. Edital: 28/08/2020 às 08h00 às 17h00 e das 13h00 às 17h00. Endereço: Rua Imã Iwone Drumond, 200 - Bairro Distrito Industrial - Itabira/MG ou www.comprasgovernamentais.gov.br/edital/158161-5-00025-2020. Entrega das Propostas: a partir de 28/08/2020 às 08h00 no site www.comprasnet.gov.br. Abertura das Propostas: 10/09/2020 às 09h00 no site www.comprasnet.gov.br. Informações Gerais: Edital também disponível no site www.unifei.edu.br.

CINTIA GRAZIELE MOREIRA SANTOS
Pregoeira

(SIASGnet - 26/08/2020) 158161-15249-2019NE080002

PRÓ-REITORIA DE ADMINISTRAÇÃO

EXTRATO DE TERMO ADITIVO Nº 48/2020 - UASG 153030

Processo: 23088.021914/2017-43. Dispensa de Licitação nº 012/2018. Contratante: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ - CNPJ Contratado: 18.025.536/0001-27. Contratado: FUNDAÇÃO DE PESQUISA E ASSESSORAMENTO À INDÚSTRIA - FUPAI. Objeto: Contratação da FUPAI, com a finalidade de dar apoio à Gestão Administrativa, Financeira e Operacional ao Curso de Especialização em Proteção de Sistemas Elétricos - CEPSE - 2018. Fundamento Legal: Lei nº 8666/1993 e suas posteriores alterações. Vigência: 06/09/2020 a 05/12/2020. Data de Assinatura: 25/08/2020.

PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO DIRETORIA DE GESTÃO E QUALIDADE DE ENSINO COORDENAÇÃO DE REGISTRO ACADÊMICO

RETIFICAÇÃO

No Extrato de Informações de Registro de Diplomas publicado no DOU de 29/07/2020, referente ao item do diploma registrado no período de 10/03/2020, PARA ONDE SE LÊ:

Número do livro de registro:	G-002
------------------------------	-------

LEIA-SE:

Número do livro de registro:	GI-002
------------------------------	--------

Ficam ratificadas as demais disposições constantes do Extrato de Informações de Registro de Diplomas.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

AVISO DE DISPENSA DE LICITAÇÃO Nº 93/2020

A Universidade Federal de Juiz de Fora, por meio do CRITT, contrata o Corpo de Bombeiros Militar de Minas Gerais, CNPJ 03.389.126/0001-98. Objeto: Contrato de Licenciamento, a título não oneroso, sem exclusividade, dos direitos para uso do programa de computador intitulado "Álea", com fundamento no artigo. 24, Inciso XIII, da Lei 8.666/93.

Juiz de Fora, 27 de agosto de 2020.

EDUARDO SALOMÃO CONDE
Pró-Reitor de Planejamento, Orçamento e Finanças

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PRÓ-REITORIA DE PLANEJAMENTO

EXTRATO DE PRORROGAÇÃO DE OFÍCIO

Espécie: Prorroga de Ofício Nº 00001/2020, ao Convênio Nº 850638/2017. Convenientes: Concedente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, Unidade Gestora: 153254, Gestão: 15229. Conveniente: CRUZ VERMELHA BRASILEIRA - FILIAL MINAS GERAIS, CNPJ nº 06974176000120. P.I. 127/2008, art. 30, VI. Valor Total: 10.447.123,60. Valor de Contrapartida: 0,00. Vigência: 01/10/2017 a 31/12/2020. Data de Assinatura: 25/08/2020. Assina: Pelo UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS / SANDRA REGINA GOULART ALMEIDA - Reitora

SECRETARIA ADMINISTRATIVA

EXTRATO DE ACORDO DE PARCERIA

Espécie: Proc. 23072.217788/2020-03 e Proc. 23072.221288/2020-68 - Extrato de Acordo de Parceria para Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação - PD&I celebrado entre a Companhia de Desenvolvimento de Minas Gerais - CODEMGE - CNPJ nº 29.768.219/0001-17 e a Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG - CNPJ nº 17.217.985/0001-04, com intervenção da Fundação de Desenvolvimento da Pesquisa - FUNDEP - CNPJ nº 18.720.938/0001-41. Objeto: Constitui objeto do presente Acordo de Parceria para PD&I a cooperação técnica e científica entre os parceiros para desenvolver o projeto intitulado "Estudo multicêntrico para desenvolvimento dos testes de baixo custo contra COVID-19 aplicados ao Sistema Único de Saúde. Vigência: o presente Acordo de Parceria para PD&I terá vigência de 24 (vinte e quatro) meses a contar de 24 de agosto de 2020. Nomes e cargos dos signatários: Profª Sandra Regina Goulart Almeida - Reitora da UFMG, os Srs. Ricardo Wagner Righi de Toledo - Diretor de Fomento à Indústria de Alta Tecnologia da CODEMGE e Alfredo Vicente Fischer - Diretor de Administração e Finanças da CODEMGE, o Prof. Alfredo Gontijo de Oliveira - Presidente da FUNDEP.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA

EXTRATO DE ACORDO DE COOPERAÇÃO TÉCNICA Nº 11/2020

Nº Processo: 23520.003817/2020-18 Partícipes: UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA - UFOD, CNPJ: 18.641.263/0001-45 e a ASSOCIAÇÃO BAHIANA DOS PRODUTORES DE ALGODÃO - ABAPA, CNPJ 03.932.543/0001-35. Objeto: "O presente Termo de Cooperação Técnica tem por objeto promover a cooperação técnico-científica entre os Partícipes com vistas à elaboração e execução de atividades conjuntas de Monitoramento Ambiental nas águas superficiais da Bacia do Rio de Ondas". Vigência: 19/08/2020 a 18/08/2022. Data de Assinatura: 19/08/2020.

EXTRATO DE TERMO ADITIVO Nº 1/2020 - UASG 158717

Número do Contrato: 6/2019.

Nº Processo: 23520008182201910.

PREGÃO SRP Nº 16/2019. Contratante: UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA. CNPJ Contratado: 03758809000175. Contratado: MANUTENÇÃO MANUTENÇÃO LTDA - Objeto: Prorrogar o PRAZO DE VIGÊNCIA, estabelecido na Cláusula Segunda do Contrato nº 06/2019, pelo período de 25/09/2020 a 24/09/2021. Fundamento Legal: Lei 8.666/93. Vigência: 25/09/2020 a 24/09/2021. Data de Assinatura: 21/08/2020.

(SICON - 27/08/2020)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ

AVISO DE HOMOLOGAÇÃO
PREGÃO ELETRÔNICO Nº 3/2020

A Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA, CNPJ/MF nº 11.118.393/0001-59, comunica a homologação do Pregão Eletrônico nº. 003/2020 (Processo nº 23204.005427/2020-65), que objetiva a "eventual aquisição de insumos de laboratório, conjunto de reagentes, materiais de higienização e Equipamentos de Proteção Individual (EPI s) necessários ao enfrentamento da pandemia em possível retorno das atividades acadêmicas e administrativas presenciais da Ufopa, aos laboratórios da instituição na fabricação de álcool em gel e para testagem da covid-19 de pacientes direcionados dos hospitais do Sistema Único de Saúde Brasileiro (SUS) local e da região Oeste do Pará". os objetos ora licitados foram homologados às Empresas: 1) BIO RESEARCH DO BRASIL INSTRUMENTAÇÃO CIENTÍFICA LTDA, CNPJ: 00.868.405/0001-46, R\$ 100.800,00; 2) EPPENDORF DO BRASIL LTDA, CNPJ: 03.010.937/0001-36, R\$ 54.761,34; 3) REY-GLASS COMERCIAL E SERVIÇOS EIRELI - EPP, CNPJ: 04.345.762/0001-80, R\$ 42.669,82; 4) N.C. CARVALHO - EIRELI, CNPJ: 04.745.673/0001-21, R\$ 13.000,00; 5) JONATAN WILLI DE CASTRO DAS GUPTA, CNPJ: 05.004.120/0001-80, R\$ 2.263,20; 6) OBJETIVA PRODUTOS E SERVIÇOS P/ LABORATORIOS LTDA, CNPJ: 05.895.525/0001-56, R\$ 25.500,00; 7) LOUSADA E OLIVEIRA LTDA, CNPJ: 06.830.363/0001-30, R\$ 58.806,00; 8) OBAH PRODUTOS E SERVIÇOS PARA SEGURANÇA E ENSINO EIRELI, CNPJ: 09.134.068/0001-38, R\$ 42.883,20; 9) MARCOS SILVA DE BRITO, CNPJ: 11.471.826/0001-55, R\$ 1.929,20; 10) G R SUPRIMENTOS INDUSTRIAIS, COMERCIO E SERVIÇOS LTDA, CNPJ: 12.488.070/0001-10, R\$ 906,84; 11) VITRALAB EQUIPAMENTOS E SUPRIMENTOS PARA LABORATORIOS, CNPJ: 13.440.815/0001-33, R\$ 4.140,00; 12) JM INDUSTRIA DE CONFECÇÕES E BRINDES EIRELI, CNPJ: 13.628.123/0001-13, R\$ 75.429,00; 13) JOSE FERREIRA DA SILVA FILHO, CNPJ: 14.067.722/0001-78, R\$ 39.278,00; 14) EDER JUNIOR G. LOPES, CNPJ: 15.579.052/0001-31, R\$ 16.249,85; 15) GOLDENPLUS - COMERCIO DE MEDICAMENTOS E PRODUTOS HOSPITAL, CNPJ: 17.472.278/0001-64, R\$ 27.905,60; 16) L CARVALHO COMERCIO E SERVIÇOS EIRELI, CNPJ: 20.951.432/0001-19, R\$ 40.155,90; 17) FASTLABOR COMERCIAL EIRELI, CNPJ: 21.707.794/0001-06, R\$ 1.848,00; 18) SCIAVICO COMERCIO INDUSTRIA LTDA, CNPJ: 23.747.090-0001/84, R\$ 5.181,00; 19) DRI ASSESSORIA EVENTOS E SERVIÇOS EIRELI, CNPJ: 27.343.091/0001-14, R\$ 15.167,20; 20) DUPLICOPY SUPRIMENTOS GRAFICOS - EIRELI, CNPJ: 28.859.855/0001-91, R\$ 162.666,72; 21) GLASSLAB ARTIGOS PARA LABORATORIO LTDA, CNPJ: 29.528.032/0001-33, R\$ 2.200,00; 22) B L L COMERCIO DE ARTIGOS MEDICOS E ORTOPEDICOS EIRELI, CNPJ: 32.850.401/0001-27, R\$ 2.566,80; 23) INNOVARE COMERCIO DE PECAS PLASTICAS - EIRELI, CNPJ: 33.656.835/0001-53, R\$ 33.280,00; 24) RAIZES BRASIL COMERCIO DE COSMETICOS LTDA, CNPJ: 33.949.315/0001-39, R\$ 6.120,00; 25) LIFE TECHNOLOGIES BRASIL COMERCIO E INDUSTRIA DE PRODUT, CNPJ: 63.067.904/0002-35, R\$ 1.049.504,55. Assinatura da Ata: 27/07/2020. Vigência da Ata: 12 meses. Este resultado foi objeto de publicação prévia no site www.comprasgovernamentais.gov.br.

SOFIA CAMPOS E SILVA RABELO
Pró-Reitora de Administração

AVISO DE HOMOLOGAÇÃO
PREGÃO ELETRÔNICO Nº 4/2020

A Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA, CNPJ/MF nº 11.118.393/0001-59, comunica a homologação do Pregão Eletrônico nº. 004/2020 (Processo nº 23204.000092/2020-99), que objetiva a "eventual prestação de serviços de gerenciamento e controle de frota de veículos oficiais, implementos agrícolas, embarcações e demais maquinários relacionados, para fornecimento de combustíveis e manutenção preventiva e corretiva com implantação e operação de sistema informatizado e integrado, via internet, com tecnologia de pagamento por meio de cartão magnético, nas redes estabelecimentos

credenciados pela CONTRATADA". os objetos ora licitados foram homologados às Empresas: 1) TICKET LOG - TICKET SOLUÇÕES HDFT S A, CNPJ: 03.506.307/0001-57, R\$ 543.024,06; 2) VOLUS TECNOLOGIA E GESTÃO DE BENEFÍCIOS LTDA, CNPJ/MF: 03.817.702/0001 -50, R\$ 567.041,76. Assinatura da ata: 24/08/2020. Vigência da Ata: 12 meses. Este resultado foi objeto de publicação prévia no site www.comprasgovernamentais.gov.br.

SOFIA CAMPOS E SILVA RABELO
Pró-Reitora de Administração

PRÓ-REITORIA DE GESTÃO DE PESSOAS

EXTRATO DE EXTINÇÃO DE CONTRATO

Nº 04/2020. Fica extinto a partir de 30/08/2020 o Contrato Inicial nº 14/2018, celebrado entre a Universidade Federal do Oeste do Pará e a Professora substituta MARLA CECYANNE MESQUITA DOS SANTOS, em conformidade com as cláusulas sexta, sétima e nona do referido contrato. Assinam Fabriciana Vieira Guimarães pela contratante e MARLA CECYANNE MESQUITA DOS SANTOS pela parte contratada.

RETIFICAÇÃO

No Extrato de Extinção de Contrato de Professor substituto de Luciana Pimentel da Silva, n. 1/2020, publicado no Diário Oficial da União nº 161, seção 3 em 21/08/2020, pag. 81 retifica-se o item abaixo:

Onde se lê: "Extrato de extinção n 1/2020".

Leia-se: "Extrato de extinção n 3/2020".



Este documento pode ser verificado no endereço eletrônico
<http://www.in.gov.br/autenticidade.html>, pelo código 05302020082800081

81

Documento assinado digitalmente conforme MP nº 2.200-2 de 24/08/2001, que institui a Infraestrutura de Chaves Públicas Brasileira - ICP-Brasil.

