



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

ADRIANA GUIMARÃES DOS SANTOS

**ANÁLISE COMPARATIVA DE KITS COMERCIAIS DE RT-
qPCR PARA DIAGNÓSTICO DE SARS-COV-2**

**São Cristóvão - SE
2023**

ADRIANA GUIMARÃES DOS SANTOS

**ANÁLISE COMPARATIVA DE KITS COMERCIAIS DE RT-
qPCR PARA DIAGNÓSTICO DE SARS-COV-2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius de Aragão Batista

SÃO CRISTÓVÃO

2023

ADRIANA GUIMARÃES DOS SANTOS

ANÁLISE COMPARATIVA DE KITS COMERCIAIS DE RT-qPCR PARA DIAGNÓSTICO DE SARS-COV-2

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius de Aragão Batista

1º Examinador: Prof. Dr. Brancilene Santos de Araújo

2º Examinador: Prof. Dr. Cliomar Alves dos Santos

**Dedico este trabalho ao meu marido Victor e à
minha mãe Aparecida, sem o suporte de vocês
nada disso seria possível.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe Aparecida, por sempre ter me incentivado e me apoiado em todos os projetos, pelos anos dedicados à minha educação, pelo amor incondicional e por nunca ter duvidado da minha capacidade.

Agradeço ao meu marido Victor, meu maior incentivador, pelos incontáveis conselhos, por ter secado minhas lágrimas nos momentos difíceis, por nunca ter me deixado desistir e por toda a compreensão nos momentos em que precisei ser ausente.

Agradeço as minhas irmãs Andrezza e Andréa por todo apoio e carinho de sempre, sem dúvidas meu caminho seria muito mais árduo sem a ajuda de vocês.

Agradeço aos meus amigos Bruno, Cláudia, Victor, Laís Alves, Laís de Carvalho e Camilla que mesmo não estando presentes no dia a dia me trouxeram palavras conforto e paz para atravessar esse caminho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcus Vinicius de Aragão Batista pela paciência, competência e excelente orientação.

A todos do Hospital Primavera, do Lacen e da Universidade Federal de Sergipe pela parceria e grande contribuição.

Aos membros da banca, nas pessoas do Prof. Dr. Cliomar Alves dos Santos e Profa. Dra. Brancilene Santos de Araújo pelas contribuições de certamente enriqueceram esta versão final.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma fizeram parte dessa trajetória. Obrigada!

Adriana Guimarães dos Santos, Marcus Vinicius de Aragão Batista, Análise comparativa de kits comerciais de RT-qPCR para diagnóstico de SARS-CoV-2 Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PROBIO), 2023.

Resumo: Em 2020, o mundo se viu em meio a uma pandemia do novo coronavírus, nomeado de SARS-CoV-2. Com foco inicial em 2019 em Wuhan, na China, a COVID-19 rapidamente se espalhou e já conta com mais de 460 milhões de casos ao redor do globo, sendo mais de 37 milhões de casos registrados somente no Brasil, levando mais de 703 mil brasileiros a óbito, de acordo com dados do Coronavírus Brasil. Diante desse cenário, existiu a necessidade de desenvolver técnicas diagnósticas que atendessem da melhor forma a enorme demanda global, dentre elas se destaca o RT-qPCR ou Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa com Transcrição Reversa devido sua grande sensibilidade e especificidade, sendo a técnica considerada padrão ouro no diagnóstico da COVID-19. Entretanto essa técnica possui limitações e o desempenho dos kits pode ser afetado por fatores como coleta inadequada, variação de carga viral e ensaios sem estudos clínicos suficientes, gerando falsos negativos. Perante o exposto, esse estudo tem como objetivo comparar quatro kits comerciais de detecção do SARS-CoV-2 por RT-qPCR e verificar o desempenho clínico destes. Para isso foram utilizadas 200 amostras de swab nasofaríngeo imersas em 3ml de cloreto de sódio a 0,9% colhidas em janeiro de 2022 e armazenadas a -70°C para conservação viral. Os kits comparados foram o QIA Prep&Amp Viral RNA UM Kit da Qiagen, o Seegene Allplex™ SARS-CoV-2 Assay da Seegene, o Molecular SARS-CoV-2 (EDx) do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos e o BIOMOL OneStep/COVID-19 do Instituto de Biologia Molecular do Paraná- IBMP. Os resultados revelaram significativa diferença entre o desempenho dos kits, ao final da comparação houve um percentual de 66% de amostras convergentes e 34% divergentes. A análise estatística inferencial bivariada utilizou o teste de McNemar para realizar a associação dos resultados considerando os testes positivos por pelo menos 3 kits diferentes demonstrando uma sensibilidade de 100% com o kit da Seegene com metodologia com extração padrão, 96,90% com o kit da Bio-Manguinhos, 93,02% com o kit da Seegene sem extração padrão e 86,82% com os kits da Qiagen e IBMP. Os valores de Ct dos genes alvo também são analisados. O desempenho desses kits é enfraquecido pela ausência de processos de extração e purificação do material genético, pela qualidade dos kits desenvolvidos e pela quantidade inadequada de genes alvos, ocasionando números significativos de resultados falsos negativos e positivos.

Palavras-chaves: SARS-CoV-2, PCR, Pandemia, COVID-19, Diagnóstico, Sensibilidade.

Adriana Guimarães dos Santos, Marcus Vinicius Aragão Batista, Comparative analysis of RT-qPCR commercial kits for SARS-CoV-2 diagnostic, Graduate Program in Biotechnology (PROBIO), 2023

ABSTRACT:

In 2020, the world was seen in the middle of a new coronavirus pandemic, named SARS-CoV-2. With an initial focus in 2019 in Wuhan, China, quickly spread and now has more than 460 million cases around the globe, over 37 million cases registered only in Brazil, taking more than 703 thousand Brazilians to dead, according to data from Coronavirus Brasil. Facing this scenario the world saw the need to develop diagnostic techniques which attended in a better way the enormous global demand, among them stands out the RT-qPCR or Quantitative Polymerase Chain Reaction with Reverse Transcription due to its high sensitivity and specificity, considered the gold standard technique in COVID-19 diagnosis, however the technique has limitations and the kits performance can be affected by many factors such as inadequate collection, viral load variation and trials without sufficient clinical studies creating false negatives. Therefore, this trial aims to compare four RTq-PCR's commercial kits of SARS-CoV-2 detection and verify their clinical performance. For this purpose, 200 nasopharyngeal swabs samples immersed in 3ml of 0,9% sodium chloride collected in January 2022 and store at -70°C for viral conservation were used. The kits compared were QIA Prep&Amp Viral RNA UM Kit from Qiagen, Seegene Allplex™ SARS-CoV-2 Assay from Seegene, Molecular SARS-CoV-2 (EDx) from Institute of Technology and Immunobiologicals Bio-Manguinhos and BIOMOL OneStep/COVID-19 from Institute of Molecular Biology of Paraná- IBMP. The results revealed a significant difference between the performance of the kits, by the end of the comparison was found a percentage 66% of convergent samples and 34% divergent samples. The Ct value was also analyzed. A bivariate interferential statistical analysis used the McNemar test to perform the association of results considering positive tests at least by 3 different kits demonstrating a sensitivity of 100% with Seegene with standart extraction methodology kit, 96,90% with Bio-Manguinhos kit, 93,02% with Seegene without standard extraction methodology kit and 86,82 with Qiagen and IBMP kits. The performance of these kits is weakened by the absence of genetic material extraction and purification processes, by the quality of the developed kits and the inadequate amount of target genes, causing significant numbers of false negative and positive results.

Keywords: SARS-CoV-2, PCR, Pandemic, COVID-19, Diagnosis, Sensitivity.

Sumário

1. INTRODUÇÃO

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A Pandemia

2.2 Transmissão do vírus

2.3 Sintomatologia

2.4 Estrutura do vírus

2.5 Variantes do SARS-CoV-2

2.6 Vacinação

2.7 Métodos de diagnóstico

2.8 O método de RT-qPCR

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

3.2 Objetivos Específicos

4. METODOLOGIA

4.1 Considerações éticas e de biossegurança

4.2 Amostras

4.3 Materiais e Reagentes

4.4 Descrição dos kits de amplificação para o diagnóstico de SARS-CoV-2

4.5 Local de realização dos procedimentos e protocolos de limpeza

4.6 Protocolo de extração do RNA

4.6.1 Extração Quick-DNA/RNA™ Viral Mag Bead da Zymo Research

4.7 Divisão dos grupos para realização do experimento

4.8 Especificidade de cada kit de amplificação do RNA

4.8.1 Seegene Allplex™ SARS-CoV-2 Assay da Seegene

4.8.2 SARS-CoV-2 (EDx) do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos.

4.8.3 BIOMOL OneStep/COVID-19 do Instituto de Biologia Molecular do Paraná- IBMP.

4.8.4 QIA Prep&Amp Viral RNA UM Kit

4.9 Análise Estatística

5. RESULTADOS

6. DISCUSSÃO

7. CONCLUSÃO

8. REFERÊNCIAS

9. ANEXOS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação taxonômica do SARS-CoV-2 de acordo com Kandwal e Fanye, 2023.....	9
Figura 2 - Descrição das estruturas do vírus SARS-CoV-2 indicadas por Spike (S), Membrane (M), Nucleocapsid (N), Envelope (E) e o Genoma do RNA.	11
Figura 3 - Estante magnética modelo DynaMag™-2 Magnet da ThermoFisher Scientific com número de catálogo 12321D.	25
Figura 4 - Nessa figura é demonstrado o percentual de amostras detectáveis e não detectáveis de cada kit, em azul o percentual de amostras positivas e em laranja o percentual de amostras negativas, considerando 100% a quantidade total de 200 amostras.....	34
Figura 5 - Descrição do percentual de amostras detectáveis e não detectáveis de kits que utilizam o protocolo de extração padrão, são eles o kit Seegene Allplex™, Bio-Manguinhos e IBMP, demonstrando maior positividade no kit Seegene e menor positividade no kit IBMP.	35
Figura 6 - Percentual de amostras detectáveis e não detectáveis em kits sem a etapa da extração padrão, são eles o Seegene Allplex™ e o Qiagen, apresentando números relativamente próximos entre eles.	36
Figura 7 - Percentual de resultados detectáveis e não detectáveis utilizando o mesmo kit Seegene Allplex™ com e sem a etapa de extração padrão, sendo observado um maior índice de positividade (83,50%) no protocolo com a extração padrão enquanto o protocolo sem extração padrão apresentou positividade de 65%.	37
Figura 8 - Número de repetições necessárias para cada kit considerando um número amostral de 200, sendo possível observar em maior quantidade de repetições no kit Seegene sem extração padrão.	38
Figura 9 - Percentual de amostras convergentes e divergentes entre todos os kits, ou seja, se uma amostra obteve o mesmo resultado em todos os kits foi considerada convergente e se obteve resultado diferente em pelo menos um kit, foi considerada divergente, ao total foi observado 66% de convergência e 34% de divergência.....	39

Figura 10 - Demonstração da curva ROC entre sensibilidade e especificidade entre todos os kits. 41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição básica de cada kit utilizado.....	23
Tabela 2 - Divisão de grupos para a extração do RNA das amostras de swab nasofaríngeo	28
Tabela 3 - Divisão de grupos para realização do RT-PCR no kit Seegene Allplex™ SARS-CoV-2 Assay no protocolo sem extração.	28
Tabela 4 - Valores e percentuais de concordância e discordância entre os kits levando em consideração detectados e não detectados em pelo menos 3 dos 5 kits testados e, também, o p-valor de todos eles demonstrando sua significância ou não.	40
Tabela 5 - estatísticas de sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e a área abaixo da curva ROC (AUC) utilizando o modelo de Regressão Logística do teste de McNemar.	41
Tabela 6 - Descrição da variação de Cts por gene alvo em cada kit, incluindo a mediana, desvio-padrão, coeficiente de variação, valores de Ct mínimo e máximo.	42
Tabela 7 - Nessa tabela é observado o coeficiente de concordância Kappa de Cohen, demonstrando a concordância dos resultados dos kits entre si, ou seja, os kits onde os resultados foram mais parecidos, sendo destacado a concordância entre os kits Qiagen e IBMP e Qiagen e Seegene sem extração.....	43

ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS - Organização Mundial de Saúde

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde

RNA – Ácido Ribonucleico

SRAG - Síndrome Respiratória Aguda Grave

RT-qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa com Transcrição Reversa

COVID-19 – Doença do Coronavírus 19

ECA2 - Enzima Conversora de Angiotensina 2

UTI - Unidade de Terapia Intensiva

IL-6 - Interleucina-6

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral α

AVC - Acidente Vascular Cerebral

S1- Subunidade 1

S2- Subunidade 2

NSPs - *Non-Structure Protein*

RdRp - RNA Polimerase dependente de RNA

CDC - Centro de Prevenção de Doenças

VOCs - Variantes de Preocupação

VOIs - Variantes de Interesse

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

FDA - *Food and Drug Administration*

RT-LAMP - *Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification*

CRISPR- Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespçadas

Ct- Limiar de Ciclo

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

LACEN – Laboratório Público Central de Sergipe

GMBio- Laboratório de Genética Molecular e Biotecnologia

UV- Luz Ultravioleta

IC- Controle Interno

1. INTRODUÇÃO

A pandemia do novo coronavírus, nomeado de SARS-CoV-2, assolou o mundo em 2019, com mais de 460 milhões de casos ao redor do globo, até o momento, sendo mais de 37 milhões de casos registrados somente no Brasil, levando mais de 704 mil brasileiros a óbito, de acordo com dados fornecidos pelo governo (Coronavírus Brasil, 2023). “Originalmente, o coronavírus foi identificado em meados de 2002 na cidade chinesa de Guangdong, devido a uma epidemia atípica de pneumonia em seus moradores, sendo classificado como SARS-CoV” (Hardenbrook e Zhang, 2022). Já em 2012, o Oriente Médio viveu um surto de coronavírus, denominado de MERS-CoV, com altas taxas de letalidade, sendo considerada uma das mais letais epidemias da região. A COVID-19 foi então considerada uma pandemia em 2020, com taxas de letalidade mais baixas, porém com uma alta taxa de transmissão (Hardenbrook e Zhang, 2022). A partir de então foram vistos esforços sem precedentes de cientistas e profissionais da saúde em todo mundo para desenvolver vacinas, métodos terapêuticos e diagnósticos que pudessem conter ou melhor atender as demandas do sistema de saúde, impactando diretamente na economia global e na vida de todos os indivíduos (Hardenbrook e Zhang, 2022).

Desde que a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou situação de pandemia em 11 de março de 2020, diversas medidas foram adotadas para tentar conter a transmissão do vírus (Villares da Costa et al, 2022). Distanciamento social, quarentena e lavagem constante de mãos e objetos foram as primeiras medidas adotadas por todos os países ao redor do mundo, já que as principais vias de transmissão do vírus são a inalatória por aerossóis ou gotículas e o contato com superfícies contaminadas (Leo et al, 2023).

“Pacientes acometidos com a infecção por SARS-CoV-2 podem apresentar uma variedade de sintomas, porém o vírus tem afinidade pelo trato respiratório” (Hillary e César, 2023). Os sintomas mais comuns incluem tosse, dor de cabeça, náuseas, vômito, febre e diarreia. Esses sintomas costumam ser leves na maioria das pessoas, entretanto a doença pode se apresentar com uma maior gravidade em idosos e pessoas com comorbidades, levando à Síndrome Respiratória Aguda Grave com uma taxa de mortalidade relativamente alta (Hillary e Ceasar, 2023).

O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA de fita simples e com um dos maiores genomas virais conhecidos (Islam e Koirala, 2021). É um vírus envelopado, do gênero β -coronavírus pertencente à família Coronaviridae, possuindo quatro estruturas principais,

Proteína Spike (S), Proteína Nucleocapsídeo (N), Proteína do Envelope (E) e a Proteína de Membrana (M) (Hillary e Ceasar, 2023).

Hillary e Ceasar (2023) afirmam que:

“À medida que a pandemia foi avançando iniciou-se uma corrida contra o tempo para desenvolver vacinas eficazes e tratamentos adequados, enfrentando diversas dificuldades, principalmente em relação a grande quantidade de mutações que o vírus apresenta. Em 8 de dezembro de 2020 o Reino Unido foi o primeiro país a iniciar o protocolo de duas doses de vacinação para sua população, estimulando outros países a fazerem o mesmo. A partir de então, diversas vacinas foram lançadas no mercado com várias metodologias diferentes a fim de combater o vírus”

Com o início da vacinação, a volta da circulação de pessoas a sua normalidade e as altas taxas de mutações no genoma do coronavírus, cientistas do mundo todo se mobilizaram para produzir vacinas cada vez mais eficazes contra as novas cepas existentes (Hillary e Ceasar, 2023).

Além disso, as formas de diagnóstico da infecção foram evoluindo com a progressão da pandemia, passando inicialmente por técnicas sorológicas de detecção de IgG e IgM, indo para a técnica padrão ouro de RT-qPCR com a tecnologia complementar dos biossensores de detecção de antígenos. O RT-qPCR é a técnica mais sensível e específica para detecção do vírus SARS-CoV-2 (Farasani, 2020).

A partir de então houve a necessidade de desenvolver novos kits comerciais cada vez mais rápidos e mais específicos que acompanhassem a evolução da doença e as mutações existentes. A grande maioria das mutações no vírus estão presentes na proteína spike, comprometendo a detecção do gene S em kits com essa especificidade (Bloemen et al, 2022).

Apesar do RT-qPCR ser considerada padrão ouro, os kits comerciais foram desenvolvidos de forma rápida com ensaios clínicos limitados e por vezes insuficientes, gerando questionamentos sobre o desempenho desses testes diante de uma expressiva quantidade de falsos negativos observada (Yang et al, 2022).

Frente à grande necessidade de revisar constantemente as formas diagnósticas do SARS-CoV-2, procurar novas alternativas, acompanhar as constantes mudanças de cenários e as novas mutações virais que surgem a todo momento, este estudo se torna relevante por realizar uma análise comparativa dos kits comerciais existentes.

Nesse contexto, observa-se que existe um grande potencial científico atrelado a esse tema, possibilitando descobertas a todo momento em relação ao vírus e ao seu diagnóstico, com o objetivo de ajudar tanto a comunidade científica quanto a população

e os profissionais da saúde responsáveis pela linha de frente da COVID-19. Dito isso, o presente estudo tem como objetivo comparar quatro kits comerciais utilizados para detecção por RT-qPCR de SARS-CoV-2 em termos de sensibilidade, especificidade, acurácia e tempo de resposta diagnóstica.

2. REREFENCIAL TEÓRICO

2.1 A pandemia

Segundo Ali et al, 2023, “de acordo com relatórios da OMS, mais de 765 milhões de casos confirmados de COVID-19 foram relatados, com 6,93 milhões de mortes em abril de 2023”. O primeiro caso de SARS-CoV-2 confirmado no Brasil foi em 26 de fevereiro de 2020, na cidade de São Paulo (Ferreira et al, 2022). A partir daí o país se tornou um dos maiores epicentros mundiais da pandemia, chegando a apresentar a segunda maior taxa de infecções e mortes em 2021, segundo Galvêas, Barros Jr e Fuzo, (2021), apresentando um pico de 3.598 internações em um único dia no estado de São Paulo (Seara-Morais et al, 2023). Segundo o Coronavírus Brasil, site oficial do governo alimentado pelo Ministério da Saúde que monitora a epidemiologia da infecção por esse vírus no país, foram registrados até o momento (12 de junho de 2023) 37.625.916 casos de COVID-19 no Brasil, sendo 703.291 óbitos, tendo um percentual de mortalidade de 334,7 por 100 mil habitantes e uma letalidade de cerca de 1,9%. No estado de Sergipe foram confirmados 362.500 casos e 6.511 óbitos, chegando a um índice de mortalidade de 383,2 por 100 mil habitantes (Ministério da Saúde, 2023).

Inicialmente a forma que o mundo encontrou de combater a propagação do vírus foi o isolamento social juntamente com o uso de máscaras e álcool. Esse período de quarentena afetou gravemente a vida de todos, impactando na economia global e na saúde física e mental de cada indivíduo, aumentando significativamente os casos de transtornos psiquiátricos como depressão e ansiedade, devido ao medo da infecção, da mortalidade da doença, da lotação do sistema de saúde, da diminuição da renda e do aumento do desemprego (Seyedmirzaei et al, 2023). Além disso, houve impacto na saúde física dos indivíduos em relação a doenças não relacionadas à COVID-19, já que as consultas médicas, os exames e as cirurgias eletivas foram suspensas e o medo em procurar atendimento médico mesmo em casos de urgência gerou grandes consequências para a população, tanto durante quanto após o período mais crítico da pandemia (Almeida et al, 2023).

“Muitas das sequelas da pandemia ainda serão vistas e desvendadas no futuro durante muito tempo, incluindo as grandes repercussões dessas sequelas nos profissionais de saúde que precisaram se adaptar rapidamente ao ambiente pandêmico” (Broom et al, 2022). No estudo de Broom et al (2022) foram entrevistados 63 profissionais da saúde australianos que trabalharam em dois grandes hospitais durante a pandemia e relataram

que a ansiedade, a depressão, o esgotamento físico e mental, os altos níveis de estresse e o medo do contágio eram constantes durante o período. Os entrevistados descreveram como as grandes incertezas do momento afetaram as condutas clínicas. Incertezas como a falta de controle e de diretrizes sobre a doença, a sensação de paralisia sobre grandes decisões como, por exemplo, a prioridade de leitos e de atendimento, e falta de suporte ou até mesmo de apoio das equipes administrativas contribuíram para o desgaste mental dos profissionais. O apoio dos próprios colegas de trabalho foi descrito como muito benéfico para o momento, porém a ajuda de um profissional psicólogo teria sido muito útil para amenizar as inseguranças do período (Broom et al, 2022).

2.2 Transmissão do vírus

A transmissão do vírus pode ocorrer por diversas vias (Tsatsakis et al, 2020). As principais são as vias aéreas, através de gotículas de saliva e secreção deixadas no ar por pessoas infectadas e mediante contato indireto com superfícies contaminadas (Islam e Koirla, 2021). Tsatsakis et al (2020) refere que “foi descoberto que também existe a possibilidade de transmissão fecal-oral”. Tosse e espirros são os principais transmissores, levando em conta que partículas virais podem ser encontradas em suspensões de aerossóis por até 3 horas ou mais e essas mesmas partículas podem sobreviver em superfícies por muito mais tempo dependendo do tipo de material, como por exemplo em superfícies com alumínio, cobre ou aço essas partículas podem permanecer em média por 8 horas já em lugares com aço inoxidável ou plásticos o vírus pode sobreviver por 1 a 3 dias (Tsatsakis et al, 2020).

2.3 Sintomatologia

De acordo com Tsatsakis et al (2020), uma variedade de sintomas e sequelas ainda estão sendo investigados, porém os mais comuns são febre, falta de ar, perda de olfato e/ou paladar e dor de cabeça. Entretanto, em pessoas idosas ou com comorbidades esses sintomas podem evoluir para uma síndrome respiratória aguda grave, levando ao óbito em poucos dias, mas a grande maioria dos infectados apresentam sintomas leves ou mesmo são assintomáticos. O estudo de Richardson et al (2020) demonstrou que apenas 30% dos pacientes sintomáticos apresentam febre dentro de um contexto onde apenas 15% dos infectados apresentam sintomatologia. (Tsatsakis et al, 2020). É importante lembrar também que mesmo indivíduos assintomáticos podem continuar transmitindo o vírus, por isso a grande importância do isolamento social para a contenção da pandemia (Islam e Koirla, 2021). Outros sintomas além dos mais comuns podem surgir, sintomas

gastrointestinais como náuseas, vômito, dor abdominal e diarreia que podem ser acompanhados ou não de outros sintomas respiratórios, como demonstra o estudo de Jin et al (2020), em que de 651 pacientes infectados com a COVID-19, 28,38% apresentaram apenas sintomas dessa natureza.

Segundo Tsatsakis et al (2020), não está clara a fisiopatologia dessa doença no desenvolvimento da gastroenterite, porém especula-se que pode estar associada à chamada tempestade de citocinas, ou seja, a infecção leva a uma hiperativação do sistema imunológico gerando a expressão de vários fatores em exacerbação, incluindo os receptores de ECA2 (Enzima Conversora de Angiotensina 2) nas células epiteliais do sistema gastrointestinal, originando uma infecção dos enterócitos, causando má absorção e diarreia.

O estudo de Patil et al (2023) demonstrou que pacientes com sintomas gastrointestinais tendem a ter uma doença mais prolongada do que pacientes que não apresentam esse tipo de sintomatologia. Além disso, estudos de Wu et al (2020) e Wei et al (2020) apontam que o RNA viral pode ser detectado nas fezes mesmo dias após a resolução da doença, porém não é possível identificar se a transmissão fecal-oral ainda é possível nesses casos. Também não está totalmente claro se a presença desses sintomas está ligada a um pior prognóstico da doença (Tsatsakis et al, 2020).

Sinais oftalmológicos também foram descritos em estudos demonstrados por Dockery et al (2020), a conjuntivite pode ser um indicativo precoce da infecção em algumas variantes. Já os sintomas neuronais, cardiológicos e pulmonares podem ser observados em casos mais graves da doença (Tsatsakis et al, 2020). Richardson et al (2020) revelou que cerca de 20% dos pacientes que desenvolvem pneumonia por SARS-CoV-2 apresentam sintomatologia grave e apenas 5% desses necessitam de internação em Unidade de Terapia Intensiva (UTI). A idade avançada e comorbidades prévias como hipertensão, obesidade e diabetes são fatores de risco mais comuns nesses casos em que a pneumonia evolui com dispneia e hipóxia em um curso de evolução de 5 a 7 dias do início dos sintomas, podendo levar o paciente a uma insuficiência respiratória e consequentemente falência múltipla dos órgãos. (Tsatsakis et al, 2020).

Alguns fatores evidenciados nos casos graves de pneumonia envolvem os altos níveis de citocinas pró-inflamatórias produzidas pelo corpo ao longo do curso da evolução da doença que atingem o revestimento epitelial do pulmão, células dendríticas e macrófagos pulmonares, abrangendo a resposta imune inata e adaptativa, liberando

grandes quantidades de citocinas como a Interleucina-6 (IL-6) e o Fator de Necrose Tumoral α , bem como a presença de infiltração de neutrófilos e a presença exagerada de células T citotóxicas, responsáveis por produzir ainda mais interleucina-6 resultando em uma resposta imune destrutiva que produz lesão pulmonar. (Kasal, De Lorenzo, Tibiriça, 2020; Tsatsakis et al, 2020).

O estudo de Ulhaq e Soraya (2020) relatou que altos índices plasmáticos de interleucina-6 foram associados a gravidade do quadro da infecção por COVID-19, ou seja, quanto maior os índices dessa citocina pior o prognóstico do paciente. Essa tempestade de citocinas também é uma das responsáveis pelos efeitos cardiovasculares associados a COVID-19 que podem levar a uma disfunção dos cardiomiócitos, à miocardite e a arritmias. A hipóxia causada pela insuficiência respiratória influencia diretamente no aumento da ocorrência de infarto agudo do miocárdio pela falta de oxigênio nos tecidos do coração, por consequência, as citocinas, principalmente a IL-6, podem prolongar o intervalo QT, medido através do Eletrocardiograma, que é o tempo que o impulso elétrico viaja do átrio até o ventrículo, ou seja, a duração da contração cardíaca (Ulhaq e Soraya, 2020; Malik e Hnatkova, 2020). Esse prolongamento pode causar arritmias ventriculares que podem induzir a produção de estímulos pelo Sistema Nervoso Simpático, aumentando a instabilidade elétrica cardíaca e ocasionando lesões (Tsatsakis et al, 2020).

Indivíduos que já possuem doenças cardíacas pré-existentes tem um risco aumentado de desenvolver dano cardíaco associado a infecção, porém há relatos de pacientes que não possuem histórico prévio que apresentaram complicações cardiovasculares (Tsatsakis et al, 2020). De acordo com o estudo de Shi et al (2020) há relatos que cerca de 19,7% dos pacientes internados com infecção por SARS-CoV-2 apresentaram em algum momento algum dano cardíaco, estando diretamente ligado ao aumento do índice de mortalidade. Um outro estudo de Liu et al (2020) revela que dentre 137 pacientes, 7,3% apresentaram palpitações como sintoma inicial, já em um outro estudo parecido de Guo et al (2020) é demonstrado que 5,9% dos pacientes tiveram taquicardia e fibrilação ventricular como complicações da doença. Ou seja, podemos compreender que a lesão miocárdica pode ser tanto induzida diretamente pelo vírus quanto pela existência de danos pulmonares, além do mais o uso de alguns medicamentos que foram amplamente utilizados durante a pandemia, como azitromicina,

hidroxicloroquina e lopinavir ou ritonavir prolongam o intervalo do QT, aumentando assim o risco de complicações cardíacas (Tsatsakis et al, 2020).

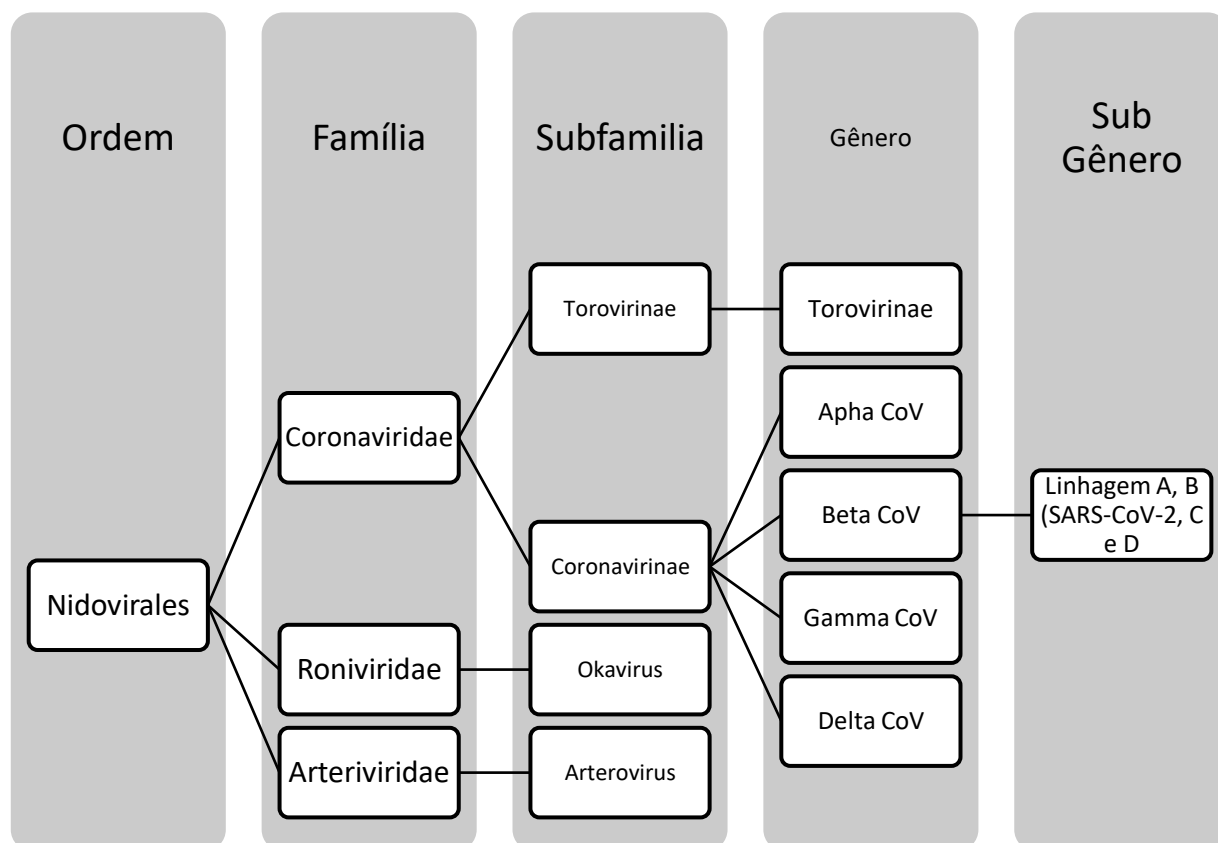
Distúrbios neurológicos são encontrados menos frequentemente em pacientes acometidos com a infecção pelo SARS-CoV-2 (Tsatsakis et al, 2020), porém diversos estudos descritos por Carod- Artal (2020) e Brown et al (2020) relacionam a doença com sintomas como encefalite, acidente vascular cerebral (AVC), epilepsia, síndrome de Guillian-Barré e até mesmo os distúrbios do olfato e do paladar. Uma das hipóteses mais aceitas sobre as consequências neurológicas que a COVID-19 pode trazer é em como a atuação da Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA2) facilita a invasão e replicação do vírus nessa região inibindo o sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (Kasal, De Lorenzo e Tibiriçá, 2020), que é essencial para a regulação do volume plasmático e do equilíbrio hidroelétrico e consequentemente da pressão arterial (Tsatsakis et al, 2020).

O sistema de inibição da angiotensina II através da ECA2 é presente fisiologicamente em nosso organismo para o controle da pressão arterial, porém o SARS-CoV-2 atenua a diminuição de ECA2 fazendo com que os níveis plasmáticos de angiotensina II se elevem causando vasoconstrição, retenção de sódio e aumento dos efeitos pró-inflamatórios, levando a SRAG (Síndrome Respiratória Aguda Grave) (Elrashdy, Redwan e Uversky, 2020), que gera a hipóxia, causa principal dos danos neurológicos (Tsatsakis et al, 2020). No estudo de Elrashdy, Redwan e Uversky (2020) é citado ainda que o SARS-CoV-2 usa o receptor ECA2 como porta de entrada nas células do hospedeiro, pois ele é presente em diversas células do corpo, principalmente nas células pulmonares, utilizando a proteína Spike (S), uma estrutura do vírus, para adentrar nas células. Entretanto, as células giliais cerebrais também expressam a ECA2, o que torna o Sistema Nervoso Central um alvo do vírus (Hassan et al, 2021).

2.4 Estrutura do vírus

O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA de fita simples e com um dos maiores genomas virais conhecidos (Islam e Koirala, 2021). O genoma possui 29.891 nucleotídeos que codificam 9.860 aminoácidos e pertencem a família *Coronaviridae*, ordem Nidovirales (Bath et al, 2021), que incluem o coronavírus, torovírus e ronivírus. Existem 39 espécies e 27 subgêneros da ordem Nidovirales, 5 gêneros e 2 subfamílias são pertencentes à família *Coronaviridae*, que é dividida em subfamílias *Torovirinae* e *Coronavirinae* (Kandwal e Fanye, 2023) (Figura 1).

Figura 1 - Classificação taxonômica do SARS-CoV-2 de acordo com Kandwal e Fanye, 2023.



Os CoVs já foram responsáveis por outras epidemias desde sua identificação, como a primeira Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV) em 2002 e a Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) em 2012 (Bath et al, 2021). A hipótese mais aceita sobre o surgimento do SARS-CoV-2 sugere que o vírus foi encontrado primeiramente em morcegos, já que 96,2% do sequenciamento do genoma do vírus encontrado neste animal é idêntico ao sequenciamento do SARS-CoV-2 encontrado em humanos, reforçando a teoria de que houve transmissão entre eles (Astuti e Ysrafil, 2020).

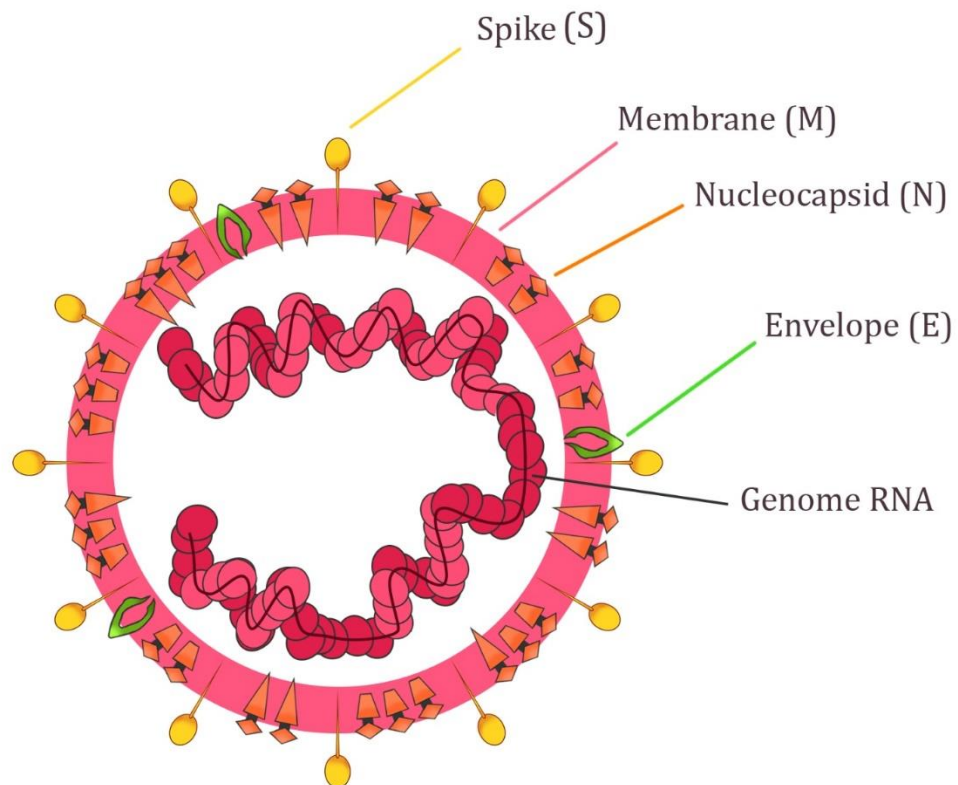
O primeiro sequenciamento completo do vírus foi em 10 de janeiro de 2020 na China (Bath et al, 2021), sendo possível descobrir que o SARS-CoV-2 possui um diâmetro de aproximadamente 65-125nm e um comprimento de 29,9kb (Astuti e Ysrafil, 2020). É um vírus esférico, envelopado, não segmentado do gênero β -coronavírus, de sentido positivo que codifica 29 proteínas ao total, 4 proteínas estruturais, 16 proteínas não estruturais e 9 proteínas acessórias, sendo rodeado por uma camada protetora de

proteínas que é chamada de nucleocapsídeo (Kandwal e Fanye, 2023). No site Phylodynamics, de link

<https://phylodynamics.pandemicprepardness.org/dist/start.html?id=TGF0aW4lMjBBbWVyaWNh&s=1&h=0> é possível visualizar o sequenciamento de diversas variantes encontradas na América Latina e no Caribe, filtrados por data e região, através de dados obtidos pelo banco de dados de sequenciamento genético Gisaïd (Phylodynamics, 2023).

As quatro proteínas estruturais principais são as proteínas do nucleocapsídeo (N), proteína do envelope (E), as proteínas de superfície (S) e as glicoproteínas de membrana (M), sendo os genes que codificam essas proteínas comumente usados para detecção molecular do vírus (Yang et al, 2022), demonstrados na Figura 2. A superfície externa é totalmente recoberta por proteínas spike (S), o que a faz ser uma das maiores proteínas de fusão. É dividida em duas subunidades, a S1 que confere flexibilidade a estrutura do vírus, que os tornam mais fáceis de se ligarem aos receptores celulares do hospedeiro, e a S2 que proporciona a fusão da membrana viral com a célula hospedeira, desempenhando um papel fundamental para o sucesso da infecção viral (Handenbrook e Zhang, 2022). É uma proteína transmembranar, com peso molecular de 150k, e por ser uma proteína localizada na parte externa é responsável pela ligação do vírus com a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), facilitando assim a entrada do vírus na célula hospedeira (Astuti e Ysrafil, 2020).

Figura 2 - Descrição das estruturas do vírus SARS-CoV-2 indicadas por Spike (S), Membrane (M), Nucleocapsid (N), Envelope (E) e o Genoma do RNA. Fonte: Adaptado de Li G et al. Coronavirus infections and immune responses. J Med Virol. 2020, 92(4)424-432.



Já a proteína do envelope (E) é uma proteína pequena que faz parte do canal transmembranar, ou seja, cria um canal entre as membranas do vírus e da célula hospedeira, ajudando na maturação e produção viral, diferente da proteína do nucleocapsídeo (N), considerado o principal componente proteico do vírus, pois é responsável por empacotar o RNA dentro do vírus (Handenbrook e Zhang, 2022), ou seja, está intimamente ligada ao material genético e ao ciclo de replicação viral dentro da célula hospedeira, o que a faz parte fundamental na resposta celular à infecção. Está localizada na região do complexo de Golgi e é altamente fosforilada, o que pode conferir à estrutura do vírus a possibilidade de mudanças estruturais, aumentando a afinidade da célula pelo RNA viral (Kandwal e Fanye, 2023; Astuti e Ysrafil, 2020).

A proteína M também é uma proteína estrutural que confere a forma do envelope do vírus. Ela se liga a proteína N para concluir a montagem viral, estabilizando os nucleocapsídeos do complexo proteína N-RNA dentro do vírion (Astuti e Ysrafil, 2020).

Além das proteínas estruturais, o SARS-CoV-2 possui diversas proteínas não estruturais, ou NSPs, sigla para identificação desse tipo de estrutura provinda do inglês *Non-Structure Protein*. 14 ORFs, matrizes de leitura aberta, codificam cerca de 27 proteínas, que são divididas em duas porções principais, a ORF1a e a ORF1ab localizadas nas primeiras regiões da extremidade 5' do genoma, fora as proteínas acessórias que se localizam mais perto da extremidade 3' (Islam et al, 2023). Essas duas estruturas estão ligadas a capacidade de infectividade e patogenicidade do vírus (Emam et al, 2021).

As NSPs são envolvidas em diversas funções virais, como a NSP2 que está envolvida na regulação da sinalização de sobrevivência da célula hospedeira, a NSP5 que ajuda na replicação de novas poliproteínas, a NSP12 que envolve a RNA Polimerase dependente de RNA (RdRp), enzima que catalisa as novas sínteses de RNA, importante para a transcrição do RNA viral e ainda existem muitas proteínas que não tem o seu funcionamento desvendado completamente, como a NSP11 (Hillary e Ceasar, 2023). Essas principais estruturas são importantes alvos na utilização de técnicas moleculares de detecção diagnóstica do vírus, como a Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa com Transcrição Reversa (RT-qPCR), também para a produção de vacinas e para o surgimento de novas variantes do SARS-CoV-2 (Islam et al, 2023).

2.5 Variantes do SARS-CoV-2

À medida que a pandemia do coronavírus foi avançando e se espalhando pelo mundo o vírus também foi evoluindo e se adaptando ao hospedeiro humano, surgindo assim diversas variantes que vão divergindo geneticamente das cepas anteriores através de mutações, necessitando apenas de uma única mudança de aminoácido para alterar significativamente a virulência e capacidade de patogenicidade do vírus no organismo hospedeiro (Newby et al, 2023; Hillary e Ceasar, 2023). Sendo assim, a Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos classificaram essas variantes em dois tipos, variantes de preocupação (VOCs) e variantes de interesse (VOIs), ajudando a distingui-las e, também, a desvendar os mecanismos de mutações para que vacinas mais efetivas fossem produzidas. As principais VOCs são a Alpha, Beta, Gamma, Delta e Omicron, já as principais VOIs são a Epsilon, Eta, Kappa, Mu Lambda, Theta, Zeta e Iota (Hillary e Ceasar, 2023). A classificação das VOC's depende de três critérios indicados pela OMS, disponível no site Paho.org, que diz que uma variante se torna de preocupação quando há:

“Aumento da transmissibilidade ou alteração prejudicial na epidemiologia da COVID-19, aumento da virulência ou mudança na apresentação clínica da doença, diminuição da eficácia das medidas sociais e de saúde pública ou diagnósticos, vacinas e terapia disponíveis” (Paho.org, 2021).

A grande maioria das variantes possuem mutações na proteína S, já que esta é a grande responsável pela facilidade do vírus em se fundir à célula hospedeira, tornando as variantes cada vez mais infecciosas (Xiao et al, 2023). Algumas possuem mutações na subunidade S1 da proteína Spike, outras na subunidade S2, algumas em outras proteínas como a M ou a N e outras possuem mutações em várias regiões do vírus (Xiao et al, 2023; Hillary e Ceasar, 2023). A variante Alpha foi uma das primeiras a serem identificadas, inicialmente no Reino Unido, em meados de setembro de 2020, carregando cerca de 23 mutações que divergem da cepa original (Hillary e Ceasar, 2023). Segundo esse mesmo estudo de Hillary e Ceasar (2023) uma dessas mutações é uma mudança de um único aminoácido, a asparagina, que foi substituída por uma tirosina no receptor da ECA2. Posteriormente, surgiu a variante Beta, inicialmente identificada na África do Sul, carregando 9 mutações diferentes da cepa original, seguida da Gama, que foi identificada primeiramente no Brasil em dezembro de 2020 carregando 17 mutações, assim como as variantes Delta que foi identificada no mesmo ano na Índia carregando 10 mutações diferentes, e por último a variante Omicron, considerada uma das variantes mais severas, sendo identificada pela primeira vez na África do Sul em novembro de 2021 e rapidamente se espalhou pelo mundo, causando uma terceira onda da COVID-19 (Xiao et al, 2023; Hillary e Ceasar, 2023), carregando mais de 60 mutações dentre as várias sublinhagens já identificadas até o presente momento (Taha et al, 2023). A maioria dessas mutações estão localizadas no domínio de ligação do receptor de proteína (RBD) na subunidade S1 da proteína S, provocando o escape no sistema imunológico e na cobertura das vacinas produzidas até o início de 2023 (Hillary e Ceasar, 2023). Segundo Traut e Blankson (2023) “A sublinhagem omicron XBB1.5 é atualmente a variante SARS-CoV-2 predominante em circulação”, tendo cobertura vacinal pela nova vacina bivalente. (Traut e Blankson, 2023).

2.6 Vacinação

Segundo Hillary e Ceasar (2023), atualmente a melhor forma de combate ao vírus SARS-CoV-2 é a vacinação. Entretanto, o desenvolvimento de uma vacina eficaz perdura

por muitos anos, sendo necessários muitos testes a curto e longo prazo, portanto as vacinas que são comercializadas hoje foram desenvolvidas em caráter emergencial e estão em constante mudanças e tentativa de melhorias à medida que mais conhecimento sobre as particularidades do SARS-CoV-2 e novas mutações vão surgindo. Em janeiro de 2023 existiam registrados mais de 200 testes com vacinas distintas sendo desenvolvidos (Osamor et al, 2023).

A vacina consiste em uma substância exógena que estimula uma resposta imunológica no indivíduo e confere uma proteção futura contra o vírus e questão. Na atualidade, existem três tipos principais de vacina, a vacina de mRNA, a vacina de DNA e a vacina de subunidade de proteína T, que estimulam a formação de anticorpos para proteção imunológica. (Osamor et al, 2023; (Hillary e Ceasar, 2023). A vacina de mRNA utiliza um pequeno pedaço de mRNA se ligando a uma proteína da membrana da célula hospedeira produzindo proteínas virais, que são reconhecidas pelo sistema imunológico como um corpo estranho e produz anticorpos contra elas (Koff, Rappuoli e Ploktin, 2023). Um exemplo de vacina de mRNA é a da Pfizer/BioNTECH, que em testes recentes apresentou 90% de eficácia até o quinto mês após a segunda dose (Hillary e Ceasar, 2023).

As vacinas de DNA, também chamadas de vacinas de vetores virais não replicantes, utilizam vetores que são injetados na célula produzindo as proteínas virais. O material genético do vírus é inserido em um vetor, e este é injetado na célula produzindo a resposta imunológica (Koff, Rappuoli e Ploktin, 2023). Exemplos de vacinas desse tipo é a da AstraZeneca e a da Johnson e Johnson (Hillary e Ceasar, 2023), porém, de acordo com o estudo de Sadoff et al (2021) essa última se mostrou ter uma baixa eficácia contra a cepa Beta e a variante Delta. Já a vacina de subunidade de proteína T utiliza fragmentos do vírus recombinante, como a proteína S ou glicoproteínas, que são inofensivas para induzir uma resposta imunológica nas células T aumentando a produção de anticorpos nas células B. Nenhuma vacina que utiliza esse tipo de metodologia está em uso no momento (Hillary e Ceasar, 2023).

Um outro tipo de vacina que está sendo menos utilizada atualmente é a vacina inativada, ou seja, que usa vírus “mortos” ou inativos para induzir a resposta imunológica (Law et al, 2023). Este foi o primeiro tipo de vacina a ser utilizado de forma emergencial, pois é o tipo mais comum, possuindo um desenvolvimento mais seguro e maduro (Satari et al, 2023). Um exemplo de vacina desse tipo é a CoronaVac, que foi a primeira vacina

a ter sua utilização aprovada no Brasil e foi amplamente distribuída no país (Law et al, 2023).

A vacina bivalente é uma vacina de mRNA atualizada que abrange tanto as cepas originais do SARS-CoV-2 quanto as novas sublinhagem da variante omicron (Wang et al, 2023). Wang et al (2023) ainda diz que esse tipo de vacina é eficaz e seguro pois “podem expressar antígenos com eficiência, induzir imunoglobulina específica (IgG) e níveis de anticorpos neutralizantes e ativar fortemente as células auxiliares foliculares T e as células T de memória efetora”. Atualmente é a vacina de escolha mais efetiva para o combate às novas cepas do vírus (Uraki et al, 2023).

Até que estudos a longo prazo sejam concluídos, todas as vacinas em uso necessitam de uma dose de reforço a cada 6 ou 12 meses (Hillary e Ceasar, 2023). Jin et al (2023) relata a grande importância das doses de reforço para o contínuo combate à pandemia, inclusive para diminuir a chance do aparecimento de novas variantes. Enquanto vacinas mais eficazes ainda não são aprovadas, empresas desenvolvedoras das vacinas atuantes no mercado ainda garantem a eficácia dessas contra a COVID-19 (Hillary e Ceasar, 2023).

2.7 Métodos de diagnóstico

Ainda no início da pandemia surgiram diversos métodos diagnósticos de detecção da infecção viral, cada um com suas particularidades, vantagens e desvantagens, devendo sempre ser avaliado de acordo com a resposta que o paciente precisa no momento (Wagenhäuser et al, 2021). Vários tipos de amostras também podem ser utilizados na detecção do vírus, já que a expressão dos receptores de ECA2 é alta em diversas células, principalmente nos vasos sanguíneos, nos rins e no intestino, sendo assim amostras como fezes, urina, sangue e saliva podem ser aplicadas. Porém, um estudo de Senok et al (2020) sugere que apesar da coleta ser menos invasiva, existe uma sensibilidade menor em amostras de saliva. Portanto, segundo Alhamid et al (2020) amostras de swab nasofaríngeo, orofaríngeo e escarro são as mais recomendadas por serem diretamente do trato respiratório, sendo o swab nasofaríngeo o mais difundido. Apesar de ser uma coleta dolorosa é possível obter uma quantidade maior de RNA viral, chegando a ter sensibilidade de cerca de 98% (Alhamid et al, 2022).

Neste contexto, os testes para diagnóstico foram sendo desenvolvidos, sendo que os primeiros testes a serem utilizados para detecção do SARS-CoV-2 foram os testes sorológicos baseados na detecção de anticorpos IgM e IgG, que são mais indicados em

casos de monitoramento de infecção, já que a Imunoglobulina M reagente indica infecções ativas e a Imunoglobulina G indicam presença de anticorpos de memória, ou seja, paciente que tiveram a infecção prévia, sintomática ou assintomática (Alhamid et al, 2022; Diani et al, 2021). Além de apresentarem como vantagem a rapidez na testagem e menor custo financeiro, apresentam como desvantagem uma menor sensibilidade, principalmente em pacientes com infecção com menos de 10 dias do início dos sintomas, de acordo com o estudo realizado por Diani et al, (2021).

Os testes sorológicos, na grande maioria, são quantitativos portanto podem fornecer informações importantes como tempo de duração da infecção, quando ela começou ou até mesmo gravidade da doença, mesmo em paciente assintomáticos e em pacientes com o chamado *Long Covid*, ou seja, pacientes com sintomas prolongados (Mame Diarra Ndiaye et al, 2023; Diani et al, 2021). Atualmente eles são mais utilizados para controle da imunização populacional e por quanto tempo esses anticorpos estão presentes e em quantidades suficientes para proteger o organismo de novas ondas de infecções (Mame Diarra Ndiaye et al, 2023). Porém, sua utilização em diagnóstico está cada vez mais escassa por sua grande variabilidade a nível de titulação biológica e por serem testes que estão sujeitos a muitos interferentes intrínsecos (Lopes-Morales et al, 2023). Já testes como ELISA, Eletroquimioluminescência e Ensaio de Fluxo Laterais são bem mais sensíveis comparados a testes rápidos que utilizam biossensores porém tem um alto custo, necessita de profissionais mais capacitados e equipamentos específicos, o que deixa de ser acessível ao grande público (Lopes-Morales et al, 2023).

Os testes sorológicos utilizam uma reação antígeno-anticorpo a partir de amostras de soro para detectar anticorpos produzidos pelo sistema imunológico durante ou após a infecção viral (Alhamid et al, 2022). Porém, nem todo anticorpo produzido é capaz de bloquear a infecção viral por SARS-CoV-2, por isso os testes sorológicos têm como alvos principais os anticorpos contra os antígenos da proteína Spike (S) ou contra a proteína do nucleocapsídeo (N) (Lopes-Morales et al, 2023; Devi, Gaffar e Hartati, 2022). Cada método sorológico se utiliza de uma base antígeno-anticorpo para fazer suas reações, por exemplo, o método por ELISA usa antígenos e anticorpos marcados com enzimas fluorescentes para detecção e quantificação, é fornecido na reação um antígeno ou um anticorpo específico e esses se ligam a reação emitindo a “cor” que é diretamente proporcional à quantidade de antígeno ou anticorpo viral presente na amostra (Devi, Gaffar e Hartati, 2022; Alhamid et al, 2022). Já os biossensores detectam apenas a

presença ou não do anticorpo IgG e/ou IgM, sem quantificá-los, estes são mais usados em larga escala por seu melhor custo-benefício, porém tem baixa sensibilidade (Devi, Gaffar e Hartati, 2022). Os imunossensores tem dois componentes principais, o elemento biológico e o transdutor (Devi, Gaffar e Hartati, 2022). O primeiro reconhece o analito, ou seja, o anticorpo, gerando a ligação antígeno-anticorpo, e o segundo transforma a reação em um elemento detectável a olho nu (Devi, Gaffar e Hartati, 2022).

Testes baseados na detecção do antígeno viral através de ensaios imunocromatográficos são atualmente muito utilizados devido à sua resposta rápida e mais acessível, tanto economicamente quanto em questão de estrutura operacional, que detectam as infecções ativas em curso (Wagenhäuser et al, 2021). Os testes rápidos de antígeno detectam a proteína viral, mais comumente a proteína do nucleocapsídeo (N), através da imobilização dos anticorpos monoclonais durante o pico da infecção, ou seja, nos 7 primeiros dias de sintomas (Fajardo et al, 2022). Apesar de serem rápidos e fáceis de manusear, possuem a sensibilidade mais baixa que o RT-qPCR e muitos dos kits desses testes necessitam de uma carga viral alta para serem detectáveis (Fajardo et al, 2022). De acordo com o estudo de Truong, Bard e Butler-Wu, (2022), dentre 64 testes disponíveis no mercado apenas 29% apresentam padrões mínimos de desempenho, sendo somente 45 deles com aprovação de uso emergencial pela FDA (*Food and Drug Administration*). Um estudo de Narumi et al (2023) comparou dois tipos de testes rápidos de antígeno para SARS-CoV-2 em 210 amostras com o RT-qPCR observando uma especificidade de 100%, mas uma sensibilidade de 60% e 57% para os dois testes, comprovando que os testes rápidos de antígenos apresentam muitos resultados falsos-negativos. Já o estudo de Yuan et al (2022) observou que a sensibilidade do método de detecção do antígeno é 10^5 vezes menor que a do RT-qPCR.

Alguns outros testes menos comuns estão disponíveis atualmente, como o RT-LAMP, CRISPR, a hibridização *in situ* e até o sequenciamento do genoma viral, porém são testes bem mais complexos e caros, não sendo acessíveis para a população em geral, sendo utilizados mais frequentemente em pesquisas científicas (Yuan et al, 2022).

2.8 O método de RT-qPCR

O teste padrão-ouro para detecção do SARS-CoV-2 continua sendo o teste molecular por RT-qPCR, pois dentre todos é o que possui maior sensibilidade ao longo do curso da infecção, até o 7º dia de sintoma, uma vez que ele detecta a presença especificamente do RNA viral (Islam e Koirala, 2021). Essa detecção é feita por meio da

extração e amplificação do RNA viral presente na amostra do indivíduo, o material mais comum para síndromes respiratórias é o swab nasofaríngeo, porém outros materiais como secreção broncoalveolar e saliva também podem ser usados para o mesmo fim (Alhamid et al, 2022). A extração e purificação do RNA pode ser feita manualmente ou de forma automática com o uso de reagentes específicos, porém a amplificação necessita obrigatoriamente de um termociclador, ou seja, de um aparelho que altere a temperatura das amostras para que a reação de cadeia em polimerase aconteça (Wages, 2005). As temperaturas variam de acordo com o kit, os *primers*, as sondas e o aparelho utilizado, e dependem do número de ciclos e de cada etapa de amplificação. Entretanto, as fases de desnaturação, hibridização e anelamento sempre estão presentes (Islam e Koirala, 2021). A desnaturação é a primeira etapa, que consiste em separar as duas fitas a uma temperatura variável entre 90 a 95°C. Na segunda etapa, os *primers* ou oligonucleotídeos são resfriados para que se liguem à sequência complementar da fita molde ativando a DNA polimerase, e na terceira etapa acontece a extensão da fita no sentido 5' para 3', que será desnaturada novamente e passará por todo o processo em vários ciclos (Wages, 2005).

A amplificação é baseada no acoplamento dos *primers* com a sonda que emite fluorescência, caso haja presença de RNA na amostra, e quantificada de acordo com o Ct ou Limiar de Ciclo, que é o número que determina se um teste é ou não positivo, caracterizado como número de ciclos necessários para o início da amplificação. Portanto o Ct é inversamente proporcional à carga viral presente na amostra, ou seja, quanto maior a carga viral menor o número do Ct pois mais rápido a amplificação se iniciará (Bayat et al, 2021; Alhamid et al, 2022).

Ainda não é suficientemente clara a correlação entre a carga viral e a gravidade da doença ou a uma maior sintomatologia (Bayat et al, 2021). Estudos como o de Bullard et al (2020) e Abbott et al (2020) demonstraram que pode existir uma correlação, porém são estudos muito limitados.

Quando falamos em qPCR com transcrição reversa ou RT-qPCR, estamos falando de detecção de RNA. Para isso, é necessário que uma enzima chamada de transcriptase reversa “transforme” o RNA em cDNA, ou seja, a fita simples do RNA será copiada e dará origem a uma fita complementar à fita original. A partir dessa fita agora dupla começará a etapa da qPCR (Wages, 2005). Em resumo, na técnica da RT-qPCR a fita simples do RNA será amplificada em milhares de cópias através do cDNA utilizando os

primers, ou sequências iniciadoras, para darem início ao processo, esses reconhecem as mesmas sequências exclusivas dos genes presentes no SARS-CoV-2, se ligam e através da enzima transcriptase reversa fazem uma cópia da fita simples original, que é chamada de cDNA, a partir daí essa cópia de fita dupla será separada e um segundo iniciador se liga a cada uma das fitas simples que foram desprendidas e através da enzima Taq Polimerase uma cópia de cada uma das fitas simples é feita dando origem a cópias fiéis do genoma viral original. O processo então se repete para dar origem a milhares de cópias da fita do cDNA e essas cópias são identificadas através das sondas fluorescentes disponibilizadas na reação. Sendo assim, a cada ciclo essas cópias são quantificadas através da emissão da fluorescência, o que na prática gira em torno de 30 ciclos, o que chamamos anteriormente de Ct, tornando a amostra detectável ou não para SARS-CoV-2 (Farasani, 2020).

Dentro desse contexto diversos kits comerciais para o diagnóstico da COVID-19 foram lançados no mercado, esses permitem a detecção do vírus através de diferentes genes-alvo presentes nas estruturas do vírus, os principais são o gene E, gene N, gene S, a estrutura de leitura aberta chamada de ORF-1ab e o gene da RNA-Polimerase dependente de RNA chamada de RdRP (Van Kasteren, 2020). Com o avanço da pandemia e as diversas mutações apresentadas pelo vírus, esses kits necessitam de adaptação e estudos para melhorias, sendo assim os laboratórios que realizam esse tipo de teste também devem se adaptar aos novos cenários e procurar kits que sejam mais adequados para sua rotina e sua população (Wang et al, 2021).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar comparativamente diferentes kits comerciais baseados em RT-qPCR para o diagnóstico SARS-CoV-2 em amostras de swab nasofaríngeo obtidas através de um hospital particular de Aracaju, Sergipe.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar a padronização e o diagnóstico de SARS-CoV-2 através dos kits da Seegene Allplex™ SARS-CoV-2 Assay da Seegene, sendo utilizadas duas metodologias, com e sem extração do RNA, do kit QIA Prep&Amp Viral RNA UM Kit da Qiagen, do kit Molecular SARS-CoV-2 (EDx) do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos e do kit BIOMOL OneStep/COVID-19 do Instituto de Biologia Molecular do Paraná- IBMP.
- Comparar os resultados, a sensibilidade e a taxa de coincidência de cada kit através do diagnóstico por RT-qPCR para SARS-CoV-2.
- Avaliar o número do Limite de Ciclo (Ct) dos alvos em cada kit e correlacioná-los aos resultados.
- Realizar uma avaliação comparativa quali-quantitativa do diagnóstico de SARS-CoV-2 nas amostras biológicas entre todos os kits utilizados e o Limite de Ciclo (Cts) obtidos de todos os alvos.

4. METODOLOGIA

4.1 Considerações éticas e de biossegurança

O presente estudo recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Sergipe, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, com o número de parecer 5.529.359 no dia 15 de julho de 2022, contido no Anexo I.

O estudo não apresenta nenhum tipo de risco físico ou moral para os participantes, não possui divulgação de informações confidenciais nem invasão de privacidade ou perguntas de cunho sensível para os participantes, não utiliza de questionários e não interfere na vida ou rotina do participante.

O descarte do material é feito de forma adequada seguindo a Resolução Nº 306 de 07 de dezembro de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA nº 358 de 29 de abril de 2005, assim como segue as boas práticas de biossegurança do laboratório, considerando que o setor de Biologia Molecular trabalha com amostras infectantes, produtos químicos potencialmente nocivos à saúde e ao meio ambiente e utilização de luz ultravioleta, classificado como risco biológico de classe III, portanto é utilizado todos os EPI's necessários para evitar contaminação tanto da amostra, quanto do ambiente e do operador.

4.2 Amostras

Foram utilizadas 200 amostras de swab nasofaríngeo imergidas em 3ml de cloreto de sódio a 0,9% colhidas em julho de 2022 e armazenadas em um freezer a -70°C para conservação viral, cedidas pela Rede Primavera Assistência Médica Hospitalar em consenso com a Universidade Federal de Sergipe. As amostras foram previamente utilizadas para realização de RT-qPCR para SARS-CoV-2 em pacientes com suspeita de infecção.

4.3 Materiais e Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste estudo foram doados por laboratórios parceiros. O kit de extração Quick-DNA/RNA™ Viral MagBead da Zymo Research foi doado pelo Lacen (Laboratório Público Central de Sergipe) juntamente com um álcool isopropílico necessário para preparação dos reagentes e quatro kits com capacidade para 100 reações cada de RT-PCR Seegene Allplex™ SARS-CoV-2 Assay da Seegene; quatro kits com capacidade para 100 reações cada de RT-PCR KIT Molecular SARS-CoV-2 (EDx) do Bio-Manguinhos e quatro kits com capacidade para cem reações cada de

BIOMOL OneStep/COVID-19 do IBMP. Materiais como ponteiras com filtro de 1000 µL, 10 µL, 200 µL e 20 µL, tubo eppendorf de 1,5 ml, tubos cônicos de 15 ml e placa de qPCR com 96 poços foram fornecidos pela Universidade Federal de Sergipe, através do Laboratório de Genética Molecular e Biotecnologia (GMBio) e pela Profa. Dra. Tatiana Rodrigues De Moura do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Sergipe. Já o espaço onde o experimento foi realizado, os equipamentos utilizados, capelas de fluxo, pipetas e EPI's como touca descartável, propé, capote, máscara N95 foram fornecidos pela Rede Primavera Hospitalar e realizado no setor de Biologia Molecular do Hospital Primavera.

4.4 Descrição dos kits de amplificação para o diagnóstico de SARS-CoV-2

Foram utilizados quatro kits diferentes para detecção de SARS-CoV-2 sendo três deles com a presença da etapa de extração do RNA e dois deles sem a etapa de extração. O kit um é o Seegene Allplex™ SARS-CoV-2 Assay da Seegene, nele são detectados quatro genes específicos do vírus, o gene N, RdRP, gene E e o gene S. Esse kit pode ser usado tanto com a etapa de extração prévia do RNA quanto sem a etapa de extração, sendo os protocolos diferentes para cada ocasião. O kit dois é o QIA Prep&Amp Viral RNA UM Kit da Qiagen, é um kit de detecção rápida, utilizando apenas um reagente chamado Prep Buffer para preparar a reação para a etapa de amplificação, gastando apenas dois minutos nesse processo e amplifica somente um gene específico para o SARS-CoV-2, o RdRP. O kit três é o kit Molecular SARS-CoV-2 (EDx) do Instituto Bio-Manguinhos, em que é detectado somente um gene específico para SARS-CoV-2, o gene E. Já o kit quatro é o BIOMOL OneStep/COVID-19 do IBMP, são detectados dois genes específicos para o SARS-CoV-2, o gene N e a ORF-1ab. Essas informações estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1 - Descrição básica de cada kit utilizado

Fabricante	País	Número de Catálogo	Condição de Armazenamento	Gene(s) alvo
Qiagen	Alemanha	221415	de -30°C a -15°C	RdRP
Seegene Bio-Manguinhos IBMP	Coreia do Sul Brasil Brasil	RV 10247Y MS 80142170045 IU LS-001	$\leq -20^{\circ}\text{C}$ de -30°C a -10°C de -30°C a -15°C	N, RdRP, E, S E N, ORF-1ab

4.5 Local de realização dos procedimentos e protocolos de limpeza

O experimento foi realizado nas dependências do Hospital Primavera, que possui duas salas reservadas para a Biologia Molecular seguindo rígidos protocolos de limpeza. A sala de extração de amostras, que possui os equipamentos necessários para a realização da extração dos materiais, é restrita somente a funcionários responsáveis pelo setor, onde os manipuladores só entram com os EPIs obrigatórios, sendo eles propés, capote descartável, touca descartável, máscara N95 e luvas descartáveis. A sala contém duas capelas de fluxo laminar uma para manipulação de amostras e outra para manipulação de reagente, nesta as amostras não são manipuladas para evitar contaminação, e na capela de extração há manipulação de materiais “sujos”, ou seja, ainda não extraídos e purificados. Há uma outra sala adjacente chamada de sala da amplificação, onde o equipamento termociclador se encontra, havendo somente manipulação de amostras já preparadas para o processo de amplificação no equipamento QuantStudio 5 Real-Time PCR System da ThermoFisher Scientific. Há rígidos protocolos de limpeza antes e depois da manipulação de qualquer material nas cabines biológicas, antes da manipulação é feita uma limpeza com álcool 70% nas cabines e nos materiais que serão utilizados, como pipetas e suportes e a luz ultravioleta (UV) é ligada por 15 minutos. Após estes procedimentos, o protocolo de limpeza das cabines e dos materiais utilizados é composto por 6 etapas:

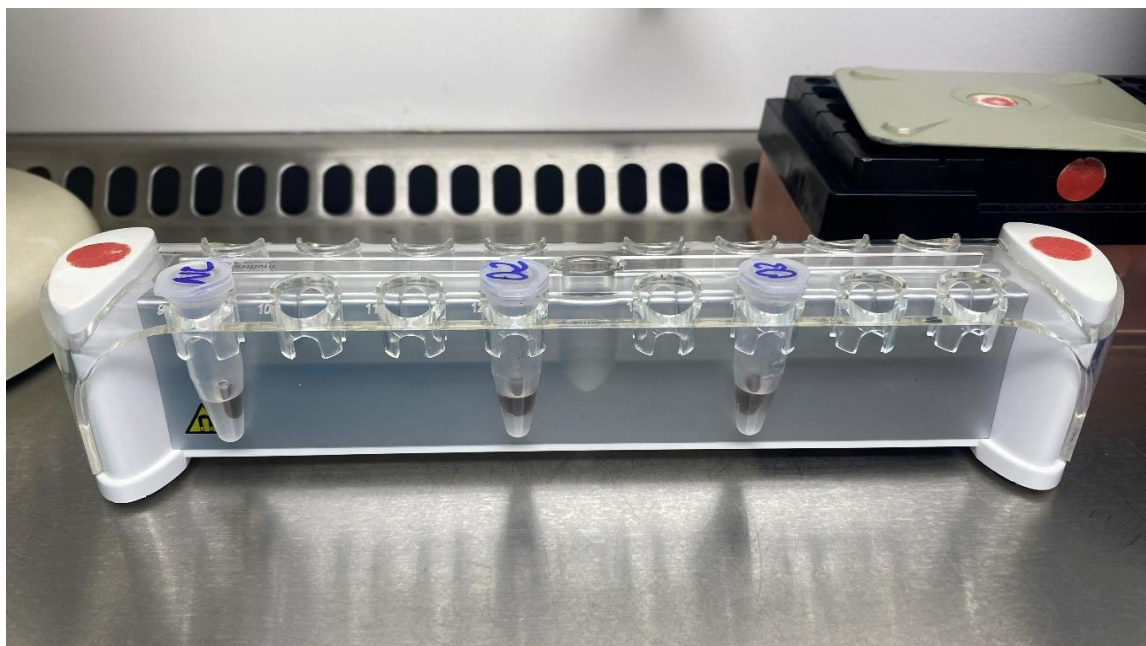
1. Limpeza com água destilada;
2. Limpeza com hipoclorito a 10%;
3. Limpeza com água destilada novamente;
4. Limpeza com álcool 70%;
5. Limpeza com descontaminante de RNase;
6. Ligação da UV por 30 minutos.

Uma vez por semana é realizado procedimento de limpeza semanal, que inclui limpeza de equipamentos, bancadas, chão e vidros e uma vez por mês é realizado limpeza mensal, que inclui a descontaminação do QuantStudio 5.

4.6 Protocolo de extração do RNA

O presente estudo utilizou o kit de extração Quick-DNA/RNA™ Viral MagBead da Zymo Research, um kit que utiliza a metodologia das beads magnéticas para separar e purificar DNA ou RNA de uma amostra. As beads magnéticas são esferas que funcionam atraindo substâncias contrárias à sua carga eletromagnética, ou seja, as beads são positivamente carregadas tendo afinidade com os ácidos nucleicos que possuem cargas negativas. Ao entrar em contato com as beads, o ácido nucleico se liga a elas e assim é adicionada uma estante ou rack magnética que funciona como uma espécie de imã para atrair as beads juntamente com o ácido nucleico. Assim, é possível eliminar as outras substâncias presentes na amostra fazendo um processo de lavagem para purificar o RNA ou DNA. Após o processo de lavagem é adicionada uma solução de eluição, que pode ser água livre de RNase ou tampões de eluição incluídos no kit (no caso do kit utilizado nesse estudo não é fornecido o tampão de eluição, é adicionado água livre de RNase como eluente), nele fica contido o material genético purificado e pronto para ser amplificado. Para esse tipo de extração é necessário a aquisição de uma rack ou estante magnética ou de aparelhos automatizados (Matias, 2021). No experimento foi utilizado uma estante magnética modelo DynaMag™-2, demonstrado na Figura 2.

Figura 3 - Estante magnética modelo DynaMag™-2 Magnet da ThermoFisher Scientific com número de catálogo 12321D.



4.6.1 Extração Quick-DNA/RNA™ Viral Mag Bead da Zymo Research

Nesse estudo foi aplicado um protocolo adaptado para o tipo de amostra utilizada.

O kit de extração da Zymo Research é utilizado para extração de DNA e RNA através da utilização de beads magnéticas. É composto por 8 reagentes:

- DNA/RNA Shield com 1000 ml
- Viral DNA/RNA Buffer com 1L
- Proteinase K liofilizada 20mg
- Proteinase K Storage Buffer
- MagBinding Beads com 24 ml
- MagBead DNA/RNA Wash 1 com 330 ml
- MagBead DNA/RNA Wash 2 com 220 ml
- DNase/RNase-Free Water com 550 ml

Esses reagentes necessitam de uma preparação prévia para serem utilizados, de acordo com as informações do fabricante e com o catálogo do kit adquirido. Foi utilizado

o kit com catálogo número R2130, então os reagentes foram preparados de acordo com o Anexo II.

Após a preparação, o kit está pronto para uso. Todos os reagentes devem ser armazenados em temperatura ambiente, exceto a proteinase K que após preparada deve ser armazenada congelada em freezer de 0°C a -30°C, preferencialmente em alíquotas para evitar ciclos de congelamento e descongelamento.

O kit é compatível com diversos tipos de amostras como plasma, soro, urina, cultura celular, sangue total, saliva, suspensão celular, swabs, fezes e amostras de biópsia. O RNA foi extraído de amostras de swab nasofaríngeo mergulhadas em 3ml de cloreto de sódio a 0,9%. O kit também é compatível com protocolos manuais e automatizados. O protocolo fornecido pelo fabricante para extração de DNA/RNA para todas as amostras está descrito no Anexo III.

Porém, para extração manual com estante magnética e swab nasofaríngeo mergulhados em salina com esse protocolo padrão não foi possível obter o RNA extraído corretamente, então foi testado e adaptado um novo protocolo para essa situação, como demonstrado a seguir:

- Preparação com 800 µl de DNA/RNA Shield e 400 µl de amostra
- Adicionar 200 µl de Viral DNA/RNA Buffer em 200 µl da mistura anterior e misturar bem
- Adicionar 10 µl de Proteinase K
- Adicionar 40 µl de MagBinding Beads e mexer em vórtex por 20 minutos
- Transferir o tubo para uma estante magnética até que as beads estejam separadas e grudadas no tubo. Descartar o sobrenadante
- Adicionar 500 µl de MagBead DNA/RNA Wash 1, misturar bem e descartar o sobrenadante
- Adicionar 500 µl de MagBead DNA/RNA Wash 2, misturar bem e descartar o sobrenadante
- Adicionar 500 µl de Etanol a 95% ou 100%, misturar bem e descartar o sobrenadante

- Adicionar 500 µl de Etanol a 95% ou 100%, misturar bem e descartar o sobrenadante
- Deixar as beads secar por 4 minutos ou até secar completamente
- Adicionar 50 µl de água livre de DNase/RNase para eluir o DNA/RNA e misturar bem
- Transferir 50 µl da eluição para um eppendorf novo

As principais modificações foram aumento do volume da amostra, aumento do volume de Beads e de Proteinase K. Para o teste do novo protocolo, a cada modificação no volume dos reagentes por etapa da extração foi feito um RT-qPCR com o kit da Seegene para testar se o protocolo estava funcionando e amplificando com bons valores de Ct. Ao final dos testes foi feita uma comparação com a extração de outro kit de extração com um protocolo já estabelecido para extrações com swab nasofaríngeo e para reações de amplificação de SARS-CoV-2 com a mesma amostra, comparando a qualidade da extração e determinando o bom funcionamento do kit.

4.7 Divisão dos grupos para realização do experimento

As 200 amostras de swab nasofaríngeo foram selecionadas de acordo com o resultado já conhecido feito através do kit QIA Prep&Amp Viral RNA UM Kit da Qiagen, o único critério de exclusão utilizado foi a não utilização de amostras de menores de 18 anos. É importante salientar que todo o processo, tanto de extração quanto de amplificação foi realizado por um único operador. As amostras foram identificadas somente através de código de barras, sem identificação de dados pessoais de nenhum paciente. Foram utilizadas 117 amostras detectáveis para SARS-CoV-2 e 83 amostras não detectáveis para SARS-CoV-2, seguindo as interpretações fornecidas pelo kit da Qiagen. As amostras foram divididas em oito grupos, sendo oitavo e último grupo destinado apenas para as repetições, ou seja, amostras que não obtiveram resultado por alguma falha na reação do RT-qPCR ou na etapa da extração.

Cada grupo continha 31 amostras a serem extraídas, levando em consideração que as extrações são feitas manualmente através de estante magnética (Figura 1) e levam em média 1 hora e 40 minutos a cada ciclo de 8 amostras. Apesar da estante comportar 16 eppendorfs foram feitas apenas 8 amostras a cada ciclo para evitar contaminação pois os eppendorfs ficam muito próximos uns dos outros. A cada grupo de extração de 31 amostras foi adicionado um controle negativo, ou seja, utiliza-se água livre de RNase no

lugar de uma amostra como controle da reação, garantindo que não houve contaminação. Nos grupos 1 e 2 e 3 e 4 foram feitas uma qPCR para cada kit com 62 amostras, totalizando três qPCRs a cada 62 amostras, tendo em vista que a placa de PCR utilizada foi a de 96 poços, compatível com o QuantStudio 5. Nos grupos 5, 6 e 7 foi realizada apenas uma qPCR de cada kit para 76 amostras. No último grupo foram feitas repetições, totalizando 6 amostras. O RNA extraído foi armazenado em freezer a -20°C por até no máximo duas semanas para a realização da reação de RT-qPCR, tempo recomendado para que o RNA não esteja degradado. A divisão dos grupos está detalhada na Tabela 2.

Tabela 2 - Divisão de grupos para a extração do RNA das amostras de swab nasofaríngeo

Grupos de amostras	Quantidade de amostras por extração	Quantidade de amostras para o PCR	Quantidade de PCR
1	31	62	3
2	31		
3	31		
4	31		
5	31	76	3
6	31		
7	14		
8	6 repetições	6	3

Para a divisão de grupos para protocolo Seegene sem extração foi fracionado em apenas 3 grupos, haja a vista que não necessita de extração prévia, sendo um protocolo mais rápido. A placa de amplificação comporta 94 amostras + 1 controle negativo e 1 controle positivo, portanto o grupo 1 e 2 foram executadas 94 amostras e por último o grupo 3 foi destinado a 12 amostras + 8 repetições dos dois PCRs anteriores.

Tabela 3 - Divisão de grupos para realização do RT-PCR no kit Seegene Allplex™ SARS-CoV-2 Assay no protocolo sem extração.

Grupos	Quantidade de amostras	Quantidade de PCRs
1	94	1
2	94	1
3	12 + 8 repetições	1

4.8 Especificidade de cada kit de amplificação do RNA

4.8.1 Seegene Allplex™ SARS-CoV-2 Assay da Seegene

O kit Seegene Allplex™ se destaca por detectar 4 alvos ao mesmo tempo, além da presença de um Controle Interno (IC) que garante mais segurança à reação. Os genes detectados são gene E detectado pelo fluorocromo FAM, gene RdRP e o gene S detectados pelo mesmo fluorocromo ROX e o gene N detectado pelo fluorocromo CY5, além do Controle Interno detectado pelo VIC, sendo esses específicos para RT-qPCR realizado no Applied Biosystems™ 7500 da Thermo Fisher Scientific, sistema utilizado pelo QuantStudio 5. A amplificação é dividida em 5 etapas como descrito no Anexo IV.

A reação tem duração total de 122 minutos. As informações do perfil térmico e dos genes e seus respectivos fluorocromos devem ser cadastradas no termociclador e assim será criado um template específico para cada kit.

Um outro diferencial desse kit é que é possível fazer o RT-qPCR com ou sem a extração prévia da amostra, se optar por realizar a RT-qPCR com a presença da etapa de extração é necessária a adição de 10 µl do RP-V IC 2 junto aos reagentes de extração, sendo os volumes da preparação do mastermix da reação de PCR 5 µl de SARS2 MOM, 5 µl de EM8 e 5 µl de RNase-Free Water e após a pipetagem do mastermix na placa de qPCR, adicionar 5 µl da amostra previamente extraída. Já se optar por realizar a reação sem a etapa de extração é necessário que haja uma preparação da amostra realizada com a utilização do termociclador. Nessa preparação adiciona-se 45 µl de água livre de RNase e 15 µl da amostra em uma placa de qPCR ou em tubos ópticos e leva-os para o termociclador incubando a 98°C por 3 minutos e declinando a temperatura a 4°C por 5 minutos. A preparação da mastermix deve ser feita com 5 µl de SARS2 MOM, 5 µl de EM8, 4 µl de RNase-Free Water e 1 µl de RP-V IC 2, totalizando 15 µl de mastermix com 5 µl da preparação da amostra realizada.

Após a amplificação, os resultados obtidos devem ser avaliados de acordo com o Anexo V.

Para que a corrida seja válida o Ct tanto do Controle Negativo quanto das amostras devem ser menores ou iguais a 40. Para cada corrida é feito um mapa de amplificação com a quantidade dos reagentes de acordo com o número de amostras e acrescenta-se o número do código de barras para posterior identificação no termociclador, como demonstrado no Anexo VI.

Para a amplificação com o protocolo sem extração, o volume dos reagentes difere do método sem extração, como demonstrado no Anexo VII.

4.8.2 SARS-CoV-2 (EDx) do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos.

O kit SARS-CoV-2 EDx do Instituto Bio-Manguinhos detecta apenas um alvo, o gene E e um controle interno chamado de RP, o gene E é detectado pelo fluorocromo FAM e o controle RP é detectado pelo fluorocromo VIC. A amplificação é dividida em 4 etapas como descrito no Anexo VIII.

A reação tem duração total de 77 minutos. Os componentes do kit são: um controle negativo (NC), um controle positivo (PC), uma Mistura de PCR e um Mix E/RP. Todos os componentes devem ser armazenados em freezer de -30°C a -10°C.

Após a amplificação, os resultados obtidos devem ser avaliados de acordo com o Anexo IX.

Para que a corrida seja válida o Ct do Controle Negativo deve ser menor ou igual a 40 e do controle positivo menor ou igual a 37. Já as amostras devem ter $Ct \leq 40$ para o Gene E e $Ct \leq 35$ para o controle interno RP. O mapa da amplificação é feito de acordo com o Anexo X.

4.8.3 BIOMOL OneStep/COVID-19 do Instituto de Biologia Molecular do Paraná- IBMP.

O kit SARS-CoV-2 IBMP detecta dois alvos, o gene N e o gene ORF 1ab além de um Controle Interno (IC), o gene N é detectado pelo fluorocromo VIC, o gene ORF 1ab é detectado pelo fluorocromo FAM e o Controle Interno é detectado pelo fluorocromo ROX. A amplificação é dividida em 5 etapas como descrito no Anexo XI.

Neste kit é necessário ressuspender o mix de enzimas liofilizadas e incubá-lo a temperatura ambiente por 30 minutos antes da utilização. A mistura da reação pode ser utilizada por até uma semana quando armazenada a 4°C

Após a ressuspensão do mix e a incubação, a amplificação é feita de acordo com o mapa no Anexo IV. A reação tem um total de 131 minutos no termociclador. Após a amplificação, os resultados obtidos devem ser interpretados de acordo com o Anexo XII.

O Ct do Controle Positivo deve ser menor ou igual a 35 para que a corrida seja válida, já o Ct das amostras deve ser considerado válido até 40. O mapa da amplificação é feito de acordo com o Anexo XIII.

4.8.4 QIA Prep&Amp Viral RNA UM Kit da Qiagen

O QIA Prep&Amp se destaca por ser um kit comumente chamado de “extraction-free”, ou seja, livre de extração. A preparação da amostra consiste em uma única etapa que dura 2 minutos, é adicionado diretamente na placa de amplificação um combinado de 8µl de amostra e 2µl de um reagente chamado Prep Buffer, que prepara o genoma viral para a etapa de amplificação, protegendo a molécula de RNA de degradação e impede os possíveis fatores inibitórios da qPCR. O kit só detecta um alvo, o gene RdRP, detectado pelo fluorocromo FAM e tem a presença de dois controles internos, o RNA IC (Molde + Ensaio IC de RNA) detectado pelo fluorocromo Cy5 e HS IC (Controle interno de amostragem humana) detectado pelo fluorocromo VIC (Manual do Kit UM de RNA Viral QIAprep&, 2020). A amplificação é dividida em 5 etapas como descrito no Anexo XIV.

Existe uma etapa de tratamento térmico adicional na preparação da reação descrita pelo fabricante, que é opcional, em que 50 µl da amostra é submetida a uma incubação a 70°C no termociclador por 10 minutos e depois centrifugado brevemente, porém nesse estudo esta etapa não foi realizada.

Os componentes do kit são: Tampão de Preparação (Prep Buffer) Mistura Principal de RNA Viral, Mistura de 2X de primer/sonda, Molde + Ensaio de IC de RNA, Ensaio de IC de Amostragem Humana, Corante de Referência Rox e Água livre de RNase. O Prep Buffer é composto por vários aditivos que preparam a amostra tornando as moléculas de RNA disponíveis e impedindo a degradação e inibição da qPCR, a Mistura Principal de RNA Viral é formada por 4 componentes necessários para a reação, a DNA polimerase, aqui chamada de DNA Polimerase Quantnova, que está em uma forma inativada e só será ativada a uma temperatura de 95°C na etapa de incubação da reação, a Transcriptase Reversa que também só será ativa na etapa de transcrição reversa a 50° C, um tampão que contém aditivos que permitem a ciclagem mais rápida da reação e uma mistura de dNTPs, pares de bases específicos que irão iniciar a reação.

A reação tem um total de duração de 55 minutos. Após a amplificação, os resultados devem ser interpretados de acordo com o Anexo XV.

O limite de Ct para Controle de Amostragem Humana (HS IC) deve ser menor ou igual a 35 e Controle Interno (RNA IC) abrange uma margem entre 30 a 34 para que a corrida seja válida, já o valor de Ct das amostras não é indicado pelo fabricante, portanto foi considerado válido até 40. Todos os reagentes devem ser armazenados a uma

temperatura de -15°C a -30°C. Os volumes de cada componente e o mapa da amplificação podem ser vistos no Anexo XVI.

4.9 Análise Estatística

A análise exploratória de dados foi feita com o cálculo de frequência simples e percentual. A concordância entre os testes foi realizada através da estatística Kappa (Cohen, 1960), A análise inferencial bivariada utilizou o teste de McNemar (SIEGEL e CASTELLAN Jr, 2006) para realizar a associação dos resultados considerando os testes positivos por pelo menos 3 kits diferentes. Foram utilizados modelos de Regressão Logística (McNemar, 1947), com função de ligação log, para verificar a qualidade da previsibilidade do padrão ouro, em que foram obtidas as estatísticas de sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e a área abaixo da curva ROC (AUC) (Dobson, 1990; Fawcett, 2006; Nelder e Wedderburn, 1972; Robin *et al.*, 2011). Os valores de Ct para os casos com resultado detectável, foram comparados através do teste de Kruskal-Wallis (Kruskal & Wallis, 1952), com post-hoc de Dunn (Dunn, 1964), e os resultados foram representados graficamente através do gráfico Boxplot.

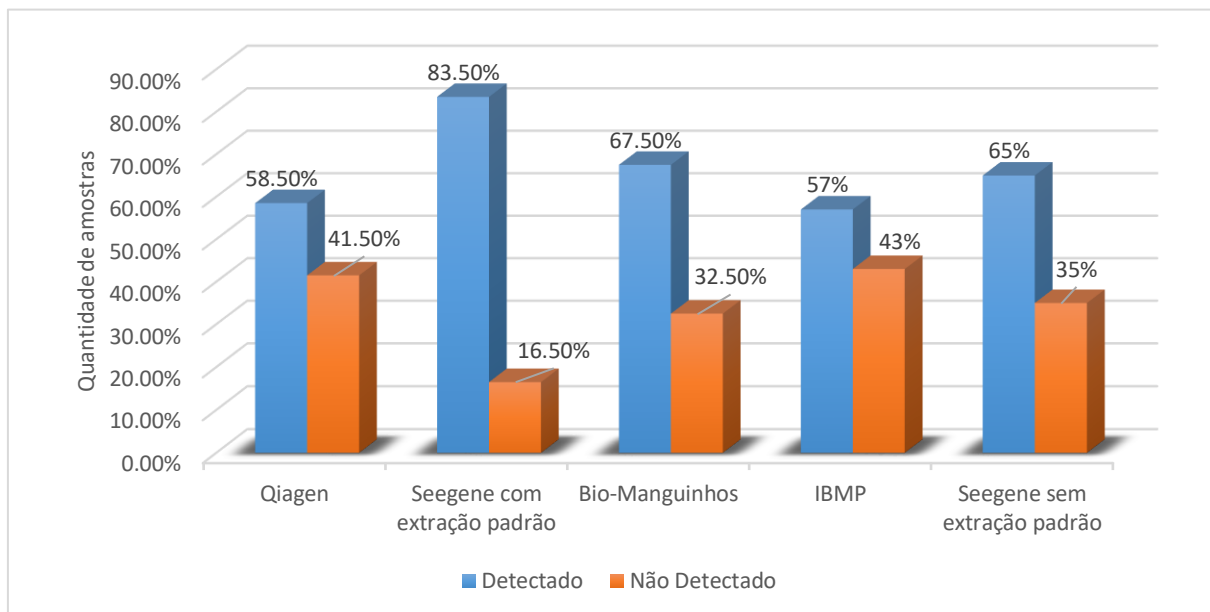
Os dados foram organizados no programa Microsoft Excel, e todas as análises estatística foram realizadas no software R, versão 4.3.1 (The R Core Team, 2023). O nível de significância adotado em todo o trabalho é de 5%.

5 RESULTADOS

Foram analisadas 200 amostras de swab nasofaríngeo imergidas em 3ml de cloreto de sódio a 0,9% colhidas em julho de 2022 e armazenadas em freezer – 70°C. Todas as amostras foram submetidas ao mesmo processo de extração, sendo que foi necessário apenas uma extração para realização do RT-PCR com os três kits de amplificação e então posteriormente foi realizada a amplificação com o kit Seegene Allplex™ com o protocolo sem extração. Após isso, foram checadas as repetições necessárias, ou seja, amostras que porventura tiveram sua reação inválida ao decorrer das corridas, sendo repetidas em seus respectivos kits. Todas as reações foram realizadas com no mínimo um controle negativo e um controle positivo, sendo um controle negativo para cada extração realizada, para garantir que as reações não sofressem contaminações. As amostras foram escolhidas aleatoriamente de acordo com o resultado prévio já existente do kit QIA Prep&Amp, sendo essas Detectado para SARS-CoV-2 ou Não Detectado para SARS-CoV-2, sendo escolhidas 117 amostras detectáveis (58,5%) e 83 amostras não detectáveis (41,5%), conforme o resultado do kit da Qiagen.

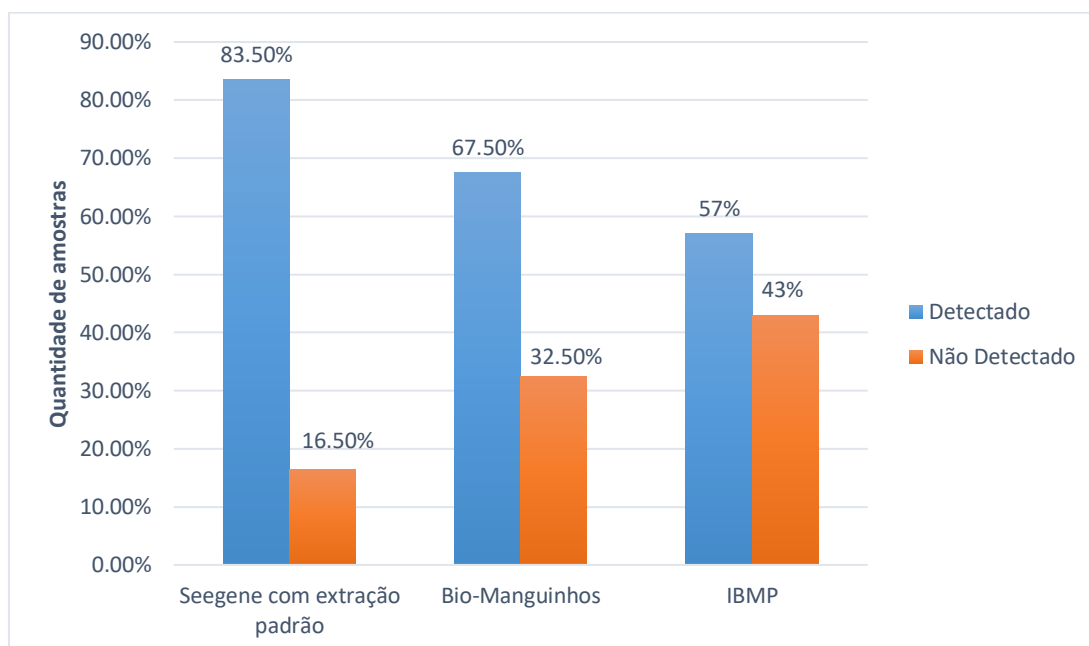
Na Figura 4 é possível observar o quantitativo de amostras detectáveis e não detectáveis para SARS-CoV-2 de cada kit. O maior número de amostras positivas é do kit Seegene com a extração padrão com 164 amostras detectáveis e 36 não detectáveis, o equivalente a um percentual de 83,5% e 16,5% respectivamente. Seguido do mesmo kit sem a extração padrão com 130 amostras detectáveis (65%) e 70 amostras não detectáveis (35%), bem próximo a ele vem o kit da bio-manguinhos com 135 amostras detectáveis (67,5%) e 65 amostras não detectáveis (32,5%). Com um número menor de amostras detectáveis está o kit Qiagen, que não possui protocolo de extração, com 117 amostras detectáveis (58,5%) e 83 amostras não detectáveis (41,5%) e o kit IBMP, que o protocolo envolve a extração padrão com 114 amostras detectáveis e 86 amostras não detectáveis com percentual de 57% e 43% respectivamente.

Figura 4 - Nessa figura é demonstrado o percentual de amostras detectáveis e não detectáveis de cada kit, em azul o percentual de amostras positivas e em laranja o percentual de amostras negativas, considerando 100% a quantidade total de 200 amostras.



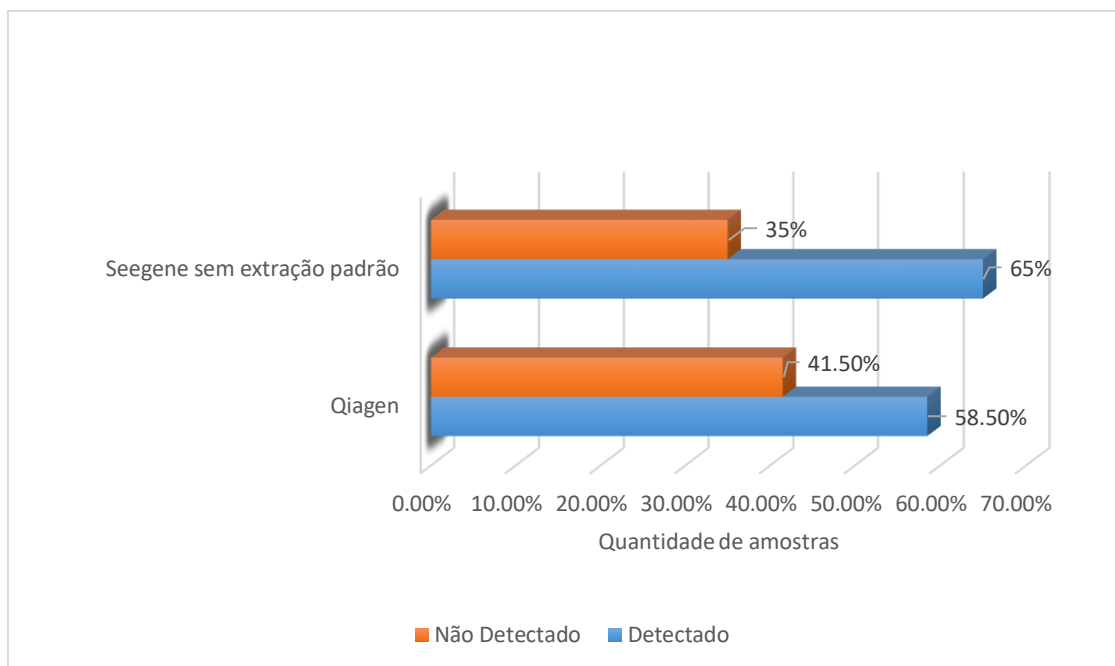
Já na Figura 5 é comparado somente os kits que possuem o protocolo de extração padrão, tendo um número considerável de divergências entre eles, apesar dos três terem sido realizados com o mesmo protocolo e com uma única extração. Enquanto o kit da Seegene tem 83,5% de positividade, o bio-manguinhos tem cerca de 67,5% e o IBMP tem 57% de positividade.

Figura 5 - Descrição do percentual de amostras detectáveis e não detectáveis de kits que utilizam o protocolo de extração padrão, são eles o kit Seegene Allplex™, Bio-Manguinhos e IBMP, demonstrando maior positividade no kit Seegene e menor positividade no kit IBMP.



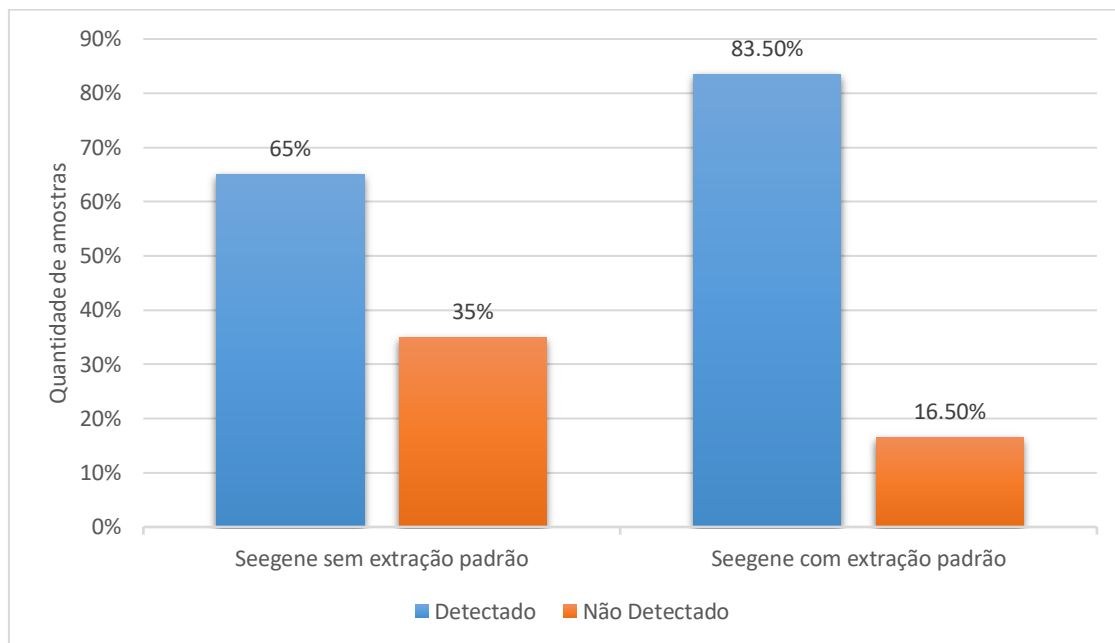
Na Figura 6 foi comparado somente os kits que não possuem um protocolo de extração padrão, além da ausência da extração existe a diferença na quantidade de alvos, enquanto o Seegene detecta quatro alvos o Qiagen detecta apenas um. São 65% de amostras detectáveis no kit Seegene sem a extração padrão enquanto no Qiagen são 58,5% de amostras detectáveis.

Figura 6 - Percentual de amostras detectáveis e não detectáveis em kits sem a etapa da extração padrão, são eles o Seegene Allplex™ e o Qiagen, apresentando números relativamente próximos entre eles.



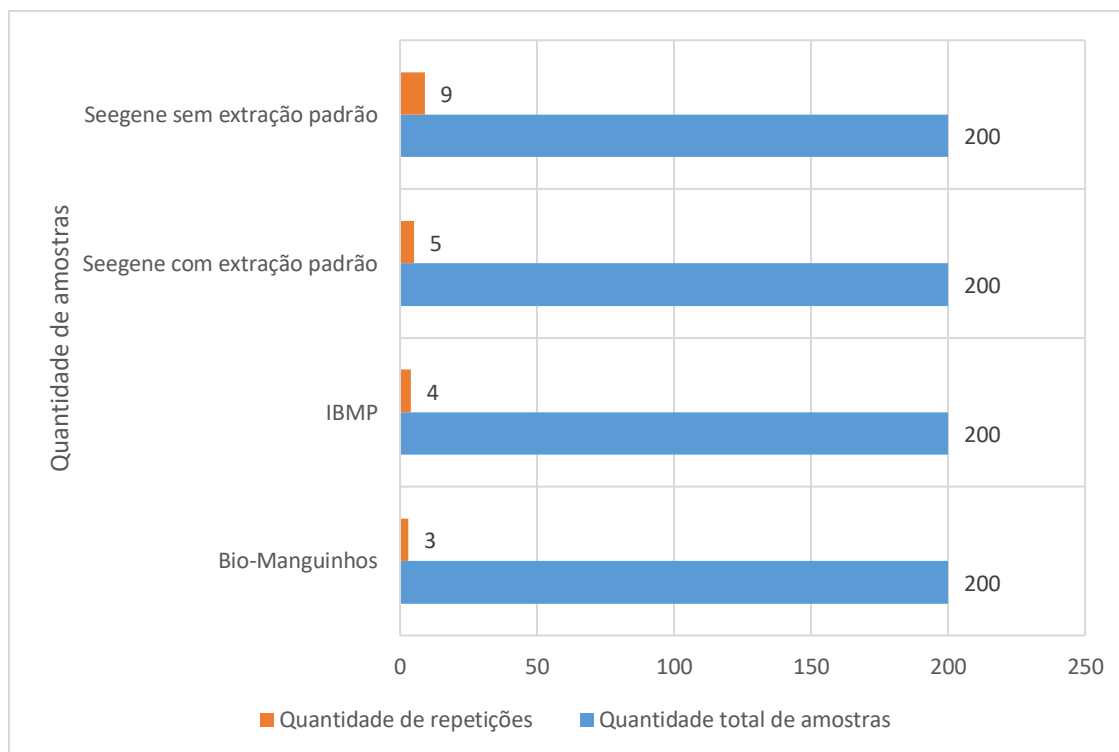
Foi comparado, também, na Figura 7, o mesmo kit da Seegene utilizando os protocolos com extração padrão e sem extração padrão, sendo observado divergências mais significativas, enquanto o Seegene com a extração padrão teve 83,50% de amostras detectáveis e 16,50% de amostras não detectáveis, o Seegene sem a extração padrão detectou 65% de amostras detectáveis e 35% de amostras não detectáveis.

Figura 7 - Percentual de resultados detectáveis e não detectáveis utilizando o mesmo kit Seegene Allplex™ com e sem a etapa de extração padrão, sendo observado um maior índice de positividade (83,50%) no protocolo com a extração padrão enquanto o protocolo sem extração padrão apresentou positividade de 65%.



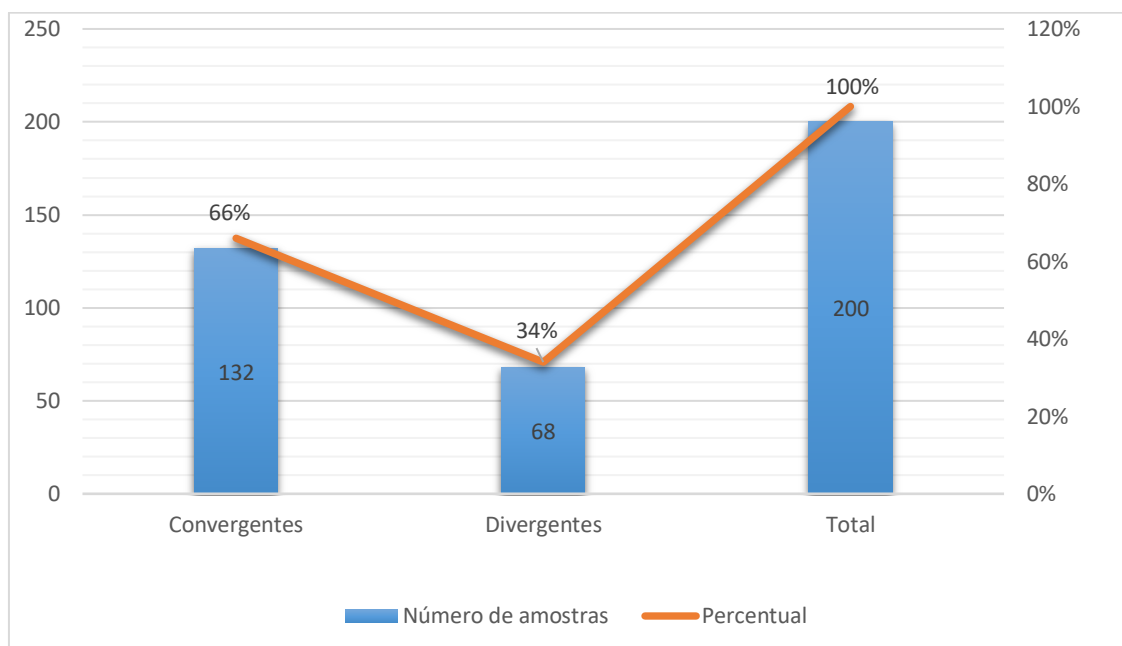
Na Figura 8 é possível observar uma comparação entre a quantidade de repetições de cada kit, é possível perceber que kits que utilizam a extração padrão tem um número menor de repetições do que o kit que não utiliza a extração pois este está mais sujeito a interferentes diversos já que não passa por um processo completo de purificação do RNA. As repetições são constatadas de acordo com a tabela de interpretações de resultado de cada fabricante, sendo necessária quando o Controle Interno da reação em específico não amplifica. É então realizado todo o processo novamente, de extração (caso o kit possua essa etapa) e de amplificação. O kit Seegene com o protocolo extração padrão necessitou de 5 repetições, enquanto o kit Bio-Manguinhos necessitou apenas de 3 repetições. O kit IBMP foram necessárias 4 repetições e com o kit Seegene sem extração padrão foram necessárias 9 repetições.

Figura 8 - Número de repetições necessárias para cada kit considerando um número amostral de 200, sendo possível observar em maior quantidade de repetições no kit Seegene sem extração padrão.



Ao final da comparação entre todos os kits houve um percentual de 66% amostras com resultados convergentes e 34% amostras com resultados divergentes, considerando convergente quando o resultado é o mesmo em todos os kits e divergente quando há pelo menos um resultado diferente entre todos os kits, como mostra a Figura 9.

Figura 9 - Percentual de amostras convergentes e divergentes entre todos os kits, ou seja, se uma amostra obteve o mesmo resultado em todos os kits foi considerada convergente e se obteve resultado diferente em pelo menos um kit, foi considerada divergente, ao total foi observado 66% de convergência e 34% de divergência.



Na Tabela 4 são descritos os resultados da comparação entre todos os kits levando em consideração amostras detectadas e não detectadas, aquelas que deram o mesmo resultado em pelo menos 3 das 5 metodologias utilizadas. Também é demonstrado o P-valor de cada kit, que diz se as diferenças entre os kits são ou não significativas, quanto menor o P-valor mais significativa é a diferença entre eles. Como o nível de significância adotado pelo trabalho foi de 5%, os valores significantes de p são os menores que 0,05. Utilizando o exemplo do kit Qiagen houveram 112 testes detectados que concordaram em pelo menos 3 kits diferentes, dando um percentual de 97,4% de positivos e 68 testes não detectados que foram concordantes entre pelo menos 3 kits, gerando um percentual de 80%, ao contrário dos resultados divergentes onde 17 resultados foram detectados em outros kits e no Qiagen o resultado foi não detectado, gerando um percentual de 20% e 3 testes que deram não detectado em outros kits e no Qiagen foram considerados detectados, com um percentual de apenas 2,6%, ocasionando um p-valor significativo de 0,004. Portanto, de acordo com o valor de p, as diferenças foram significativas no kit Qiagen ($p = 0,004$), Seegene com extração padrão (0,000) e IBMP ($p = 0,001$), enquanto os kits Bio-Manguinhos ($p = 0,181$) e Seegene sem extração ($p = 1,000$) não tiveram diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 4 - Valores e percentuais de concordância e discordância entre os kits levando em consideração detectados e não detectados em pelo menos 3 dos 5 kits testados e, também, o p-valor de todos eles demonstrando sua significância ou não.

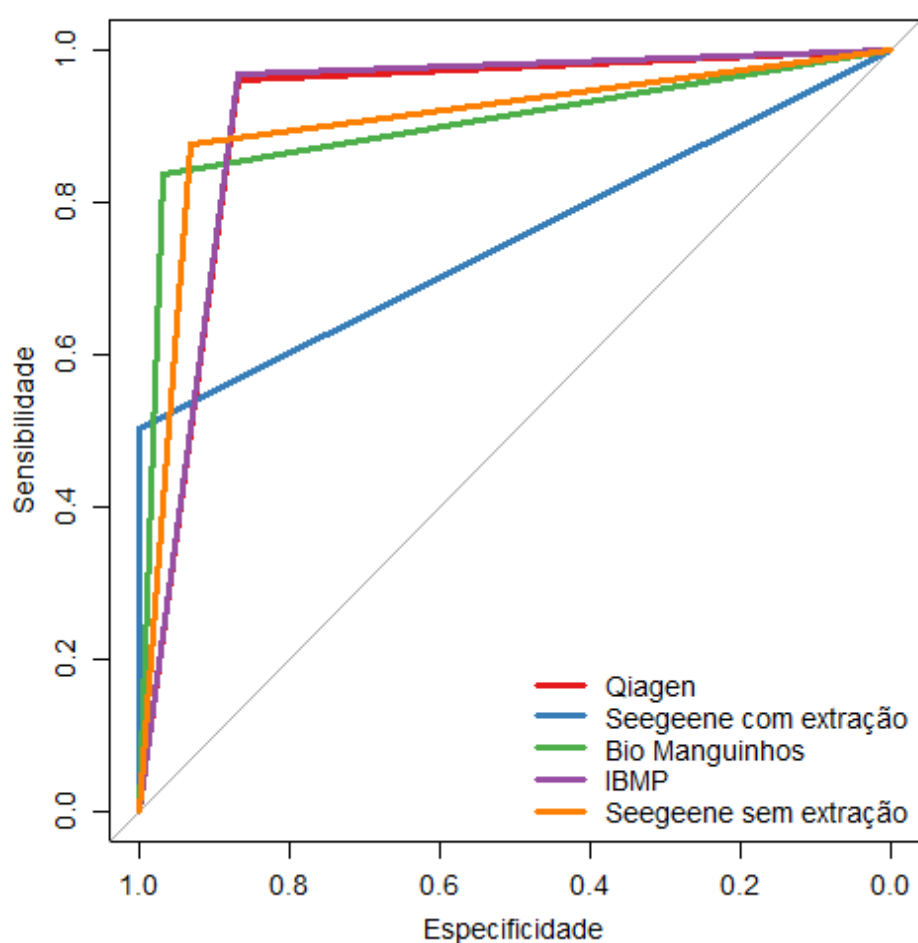
Variável/Categoria	Padrão Ouro		P-valor
	Detectado	Não detectado	
Qiagen			
Detectado	112 (97,4)	3 (2,6)	0,004
Não detectado	17 (20,0)	68 (80,0)	
Seegene com extração			
Detectado	129 (78,7)	35 (21,3)	0,000
Não detectado	0 (0,0)	36 (100,0)	
Bio Manguinhos			
Detectado	125 (92,6)	10 (7,4)	0,181
Não detectado	4 (6,2)	61 (93,8)	
IBMP			
Detectado	112 (98,2)	2 (1,8)	0,001
Não detectado	17 (19,8)	69 (80,2)	
Seegene sem extração			
Detectado	120 (93,0)	9 (7,0)	1,000
Não detectado	9 (12,7)	62 (87,3)	

Concomitantemente, na tabela 5 é demonstrado, através da Regressão Logística, os percentuais de sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e a área abaixo da curva ROC (AUC). É perceptível que os kits Seegene com extração e o Bio-Manguinhos apresentam uma melhor performance em termos de sensibilidade, com 100% e 96,90%, porém temos uma grande queda, principalmente no kit Seegene com extração, em relação a especificidade (50,70%) em comparação a kits como Qiagen (95,77%) e IBMP (97,18%). Os valores de acurácia, ou seja, a ponderação entre os valores de sensibilidade e especificidade estão equilibrados entre todos os kits diferente do Valor Preditivo Positivo e do Valor Preditivo Negativo. A AUC ou área abaixo da curva ROC está demonstrada tanto na Tabela 5 quanto na Figura 10.

Tabela 5 - estatísticas de sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e a área abaixo da curva ROC (AUC) utilizando o modelo de Regressão Logística do teste de McNemar.

Estatística	Qiagen	Seegene com extração	Bio Manguinhos	IBMP	Seegene sem extração
Sensibilidade	86,82	100,00	96,90	86,82	93,02
Especificidade	95,77	50,70	85,92	97,18	87,32
Acurácia	90,00	82,50	93,00	90,50	91,00
Valor Preditivo Positivo	97,39	78,66	92,59	98,25	93,02
Valor Preditivo Negativo	80,00	100,00	93,85	80,23	87,32
AUC	0,75	0,75	0,91	0,92	0,90

Figura 10 - Demonstração da curva ROC entre sensibilidade e especificidade entre todos os kits.



Na tabela 6 é demonstrado a estatística em relação aos valores de Cts dos alvos RdRP, E, N, RdRP/S e ORF-1ab de cada kit separadamente, sendo calculado o número de amostras em que aquele alvo foi detectado, mediana dos Cts, o desvio-padrão, o coeficiente de variação e o número mínimo e máximo detectado em cada alvo. É perceptível que a mediana dos alvos N, RdRP/S do kit Seegene nas duas metodologias

são maiores, assim como o gene E no kit Bio-Manguinhos. O maior número de Ct (Ct máximo) também foram encontrados nesses mesmos alvos.

Tabela 6 - Descrição da variação de Cts por gene alvo em cada kit, incluindo a mediana, desvio-padrão, coeficiente de variação, valores de Ct mínimo e máximo.

Kit e seus genes-alvo		Número amostral	Média	Desvio-Padrão	Coeficiente de variação	Ct mínimo	Ct máximo
Qiagen	RdRP	112	23,06	5,47 d	23,74	13,58	34,94
Seegene	E	149	26,70	6,66 ab	24,94	14,66	40,39
com	N	154	28,60	6,13 ac	21,44	16,21	39,18
extração	RdRP/S	158	29,70	5,95 c	20,02	17,50	42,37
Bio-manguinhos	E	131	28,86	5,73 ac	19,85	18,60	39,93
IBMP	N	114	26,59	4,65 ab	17,50	16,57	36,97
	ORF-1ab	112	26,23	5,02 b	19,13	16,86	38,99
Seegene	E	122	26,43	6,38 ab	24,12	12,42	38,28
sem	N	125	28,85	5,19 ac	17,98	20,22	39,40
extração	RdRP/S	120	29,78	4,47 c	15,02	21,76	41,50

Na tabela 7 foi possível criar um coeficiente de concordância Kappa de Cohen, que demonstra o quanto o resultado de cada kit concordou, fazendo uma comparação entre cada kit entre eles mesmos. Cada valor de Kappa indica um nível de concordância e também uma porcentagem. De 0 a 0,20 o nível de concordância é considerado nenhum (de 0 a 4%), de 0,21 a 0,39 o nível de concordância é mínimo (entre 4 e 15%), de 0,40 a 0,59 nível de concordância é considerado fraco (de 15% a 35%), de 0,60 a 0,79 nível de concordância é moderado (de 35 a 63%), de 0,80 a 0,90 nível de concordância é forte (entre 64% e 81%) e por fim números acima de 0,90 tem um nível de concordância quase perfeito (de 82% a 100%). Portanto é possível observar que os níveis de concordância não passam do nível moderado, sendo os maiores entre os kits Qiagen e IBMP (0,77) e os kits Qiagen e Seegene sem extração (0,71).

Tabela 7 - Nessa tabela é observado o coeficiente de concordância Kappa de Cohen, demonstrando a concordância dos resultados dos kits entre si, ou seja, os kits onde os resultados foram mais parecidos, sendo destacado a concordância entre os kits Qiagen e IBMP e Qiagen e Seegene sem extração.

	Seegene com extração	Bio-Manguinhos	IBMP	Seegene sem extração
Qiagen	0.41 (0.30 - 0.53)	0.66 (0.56 - 0.77)	0.77 (0.67 - 0.86)	0.71 (0.61 - 0.81)
Seegene com extração		0.55 (0.42 - 0.67)	0.45 (0.34 - 0.56)	0.50 (0.37 - 0.62)
Bio-Manguinhos			0.70 (0.60 - 0.80)	0.64 (0.53 - 0.76)
IBMP				0.68 (0.57 - 0.78)

6 DISCUSSÃO

A técnica de RT-PCR é considerada a padrão-ouro na detecção do SARS-CoV-2, usada tanto como um dos critérios para definição do diagnóstico quanto para alta hospitalar, ajudando também na definição do tratamento adequado (Yang et al, 2022). Entretanto, apesar de todas as vantagens, a técnica também possui limitações e está sujeita principalmente a falsos negativos, tendo em vista que sua sensibilidade pode ser afetada por múltiplos fatores como dias de sintoma, método de coleta, carga viral, manipulação da amostra e também desempenho dos kits utilizados (Wang et al, 2021). Diferentes kits foram aprovados para uso emergencial durante a pandemia, porém em situações não emergenciais esse tipo de kit demoraria de 3 a 5 anos de estudo para verificação de eficácia em um grande número de amostras clínicas e com constantes otimizações, comprometendo assim o desempenho do produto (Yang et al, 2022).

Todos os kits utilizados nesse estudo foram aprovados pelos órgãos competentes responsáveis para uso emergencial durante a pandemia e todos eles continuam sendo utilizados até o presente momento, inclusive os dois kits fabricados no Brasil (Bio-Manguinhos e IBMP).

Nesse estudo o objetivo principal foi realizar uma análise comparativa entre os 4 kits de RT-qPCR para o diagnóstico de SARS-CoV-2 com amostras clínicas escolhidas aleatoriamente, com grande variação de Cts, para que a comparação seja o mais real possível dentro de uma rotina laboratorial, incluindo pacientes com diferentes cargas virais que estão em busca de um diagnóstico preciso. É de grande importância selecionar o kit mais adequado para cada rotina, considerando custo-benefício, tempo de resposta diagnóstica e precisão nos resultados. A partir de um número amostral de 200, observamos uma variação significativa entre os kits, principalmente em amostras com carga viral baixa, sendo assim foi possível observar que os kits se mantêm com uma boa positividade quando os Cts se apresentam baixos, indicando que a amostra apresenta alta carga viral.

Nessa análise foram utilizados conceitos estatísticos de sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo e negativo. Segundo Kawamura (2022), a importância desses conceitos está ligada ao nível de eficiência de um teste, isso possibilita que o laboratório tome condutas e decisões acertadas e exclua da sua rotina testes pouco eficazes, isso fará com que os resultados apresentem maior grau de acerto. Dentro do contexto desse trabalho, a sensibilidade de um teste é a capacidade desse de

apresentar resultados positivos diante de um indivíduo doente, já a especificidade é a capacidade de um indivíduo que não possui doença ter seu teste dentro da normalidade. Nessa conjuntura há os testes falsos positivos e falsos negativos. Testes altamente sensíveis tendem a apresentar sua especificidade baixa, enquanto a testes com alta especificidade tendem a ter a sensibilidade mais baixa. A acurácia equivale a um grau de exatidão, ou seja, é a capacidade do teste experimental oferecer de fato um resultado real. O valor preditivo positivo é a capacidade do teste ter um resultado positivo e o paciente realmente possuir a doença e o valor preditivo negativo é a capacidade do teste apresentar valores negativos quando o paciente de fato não possuir a doença. Já a curva ROC é o cruzamento de informações sobre sensibilidade e especificidade, identifica resultados mais equilibrados entre esses dois parâmetros, é a partir da curva ROC que o valor de AUC é calculado (Kawamura, 2022).

Na análise comparativa de Gdoura et al (2022), que comparou 4 kits distintos em 260 amostras de swab nasofaríngeo, 70,8% (184) das amostras foram concordantes e 29,2% (76) foram discordantes, considerando amostras detectadas para SARS-CoV-2 todos os alvos com Ct até 39. Entre as amostras discordantes os Cts dos alvos positivos variaram entre 13 e 39 tendo uma média de ± 33 , sendo o gene N considerado o mais problemático por ser muito susceptível a mutações, principalmente depois da aparição da variante de preocupação Alpha. Além disso o estudo relaciona os números altos de Cts do gene N com prováveis resultados falso positivos ou com sinais tardios de positividade em pacientes já convalescentes.

No nosso estudo foram encontrados valores muito semelhantes de concordância e discordância, sendo 66% (132) das amostras concordantes e 34% (68) discordantes, considerando Cts de amostras positivas até 40, apresentando uma variação entre 12,42 39,18. O coeficiente de variação do gene N diferiu em cada kit porém também apresenta valores de mediana mais elevados em comparação aos outros alvos, tendo variação de 28,60 no kit Seegene com extração, 28,85 no kit Seegene sem extração, a exceção a esses valores é o valor de mediana do kit IBMP (26,59), considerando que este apresentou baixa positividade de amostras (114), comparado a positividade do gene N no kit Seegene com extração (154) e no kit no kit Seegene sem extração (125).

Já um outro estudo de Rangaiah et al (2021), o perfil de concordância foi de 81,33% em amostras detectadas e 18,67% em amostras não detectadas, considerando a comparação entre 12 kits comerciais distintos, porém com um número amostral de 75,

sendo que os valores de Cts dos alvos diferem significativamente entre os 12 kits. Nesse estudo um dos kits utilizados é o Allplex 2019-nCoV da Seegene que é a versão anterior do kit Seegene Allplex™ SARS-CoV-2 Assay, este obteve sensibilidade de 98,36% e especificidade de 100%. Foi verificado que há diferenças significativas entre valores de Cts dos genes E, N e ORF-1ab ($p < 0,001$) porém essa significância não foi observada entre os genes S e RdRP.

Já em nosso estudo utilizamos as duas metodologias no kit Seegene Allplex™, com e sem extração padrão, a sensibilidade e especificidade do kit com a extração padrão foi, respectivamente, de 100% e 50,70%, já a metodologia sem extração, os valores observados foram de 93,02% de sensibilidade e 87,32% de especificidade. Portanto, em comparação com os outros kits utilizados, a diferença do Seegene sem extração padrão foi significativa ($p < 0,000$) porém a do Seegene com extração padrão não foi significativa ($p < 1,000$).

Em estudo de Fukasawa et al (2021), foram comparados em 205 amostras de swab nasofaríngeo e orofaríngeo em 7 ensaios de RT-qPCR específicos para SARS-CoV-2 dentre eles o Seegene Allplex™ SARS-CoV-2 Assay, o SARS-CoV-2 (EDx) Bio-Manguinhos e o BIOMOL OneStep/COVID-19 IBMP. Foi encontrado uma média de valores de sensibilidade entre 83,6% e 100%, sendo que para o kit Seegene Allplex™ a sensibilidade encontrada foi de 97,3%, para o kit da Bio-Manguinhos foi de 87,7% e para o kit IBMP foi de 87,7%, enquanto no nosso estudo a sensibilidade desses testes foi de 100%, 96,9% e 86,8% respectivamente, considerando que no estudo de Fukasawa o kit Seegene Allplex™ é utilizado na metodologia com a extração padrão. Não foram encontradas diferenças significativas em relação a especificidade dos kits, variando entre 97,78% e 100% enquanto no presente estudo a especificidade variou entre 50,7% e 97,1%.

Os achados de Fukasawa et al (2021) ainda descrevem que os valores médios de Ct variam de 27 a 31 e o menor coeficiente de variação se encontrou no gene RdRP, sendo este o alvo menos sensível, enquanto na presente dissertação a média dos valores de Ct variaram entre 23 e 30 e o menor coeficiente de variação foi encontrado no alvo RdRP/S (15,02) já o maior coeficiente de variação foi encontrado no gene N (24,94). Em seu estudo ele menciona que a mediana foi semelhante para todos os ensaios, somente foram achadas divergências significativas entre o alvo RdRP de dois kits testados, o in-house IAL assay e o Seegene e entre o gene E entre Bio-Manguinhos e o Seegene. Semelhante

ao estudo em questão, nossos resultados também geraram diferença significativa entre a média dos alvos RdRP do kit Qiagen e do kit Seegene com e sem extração padrão e entre o gene E do Bio-Manguinhos e do Seegene com e sem extração padrão, com adição do gene N que também apresentou diferenças entre os kits Seegene com e sem extração padrão e o kit IBMP. Já as duas metodologias do Seegene apresentam valores de Cts muito parecidos.

Ainda segundo Fukasawa et al (2021), a OMS considerou que resultados detectados para SARS-CoV-2 deveriam ser considerados com a presença de no mínimo dois genes-alvo específicos ou com a presença de um gene-alvo detectado com um subsequente sequenciamento do vírus, porém essa decisão foi revisada pouco tempo depois pela OPAS que testes de alvo único poderiam ser utilizados com a presença do gene E.

O kit da Bio-Manguinhos, que possui apenas o gene E como alvo detectável teve uma sensibilidade de 96,90% nesse estudo, considerando que a variante circulante no momento da coleta das amostras, em julho de 2022, era provavelmente a linhagem BA.2 da Ômicron, que era a variante circulante mais presente no Brasil aquele período, segundo dados da Rede Genômica da Fundação Oswaldo Cruz (Linhagem BA.2 da variante Ômicron passa a ser a dominante do Coronavírus no Brasil, diz Fiocruz, 2022). Essa variante possui mutações principalmente em aminoácidos da proteína S, ou seja, não há indícios de mutações expressivas na proteína N (Hui et al, 2022) isso explica os bons números de sensibilidade desse kit no presente estudo. O estudo de Fukasawa et al (2021) ainda cita que existe uma diversidade genômica grande nos genes RdRP e N entre as diversas variantes existentes ao contrário do que ocorre com o gene E. Entretanto o kit não possui uma margem de segurança caso outras variantes que possuam mutações no gene E venham a aparecer, considerando que o SARS-CoV-2 é um vírus com altas taxas de mutação (Hui et al, 2022).

Gdoura et al (2022) também relatou em seu estudo que o gene E no protocolo utilizado para o kit BERLIN (um dos kits utilizados por ele em sua comparação) foi um gene alvo que permaneceu conservado e se mostrou mais sensível em comparação ao gene RdRP, ou seja, apresentaram valores menores de Ct, que teve mediana de 28,9, enquanto o gene RdRP apresentou mediana de 30,5. Isso também ocorreu em nosso estudo, já que a mediana do gene RdRP variou entre 29,70 e 29,78 enquanto a mediana do gene E variou entre 26,70 e 26,43 no kit Seegene, demonstrando que nesse kit o gene

E se mostrou mais sensível que o gene RdRP. O que difere em nosso trabalho são as medianas do gene RdRP no kit Qiagen (23,06) que se apresentam consideravelmente mais baixas em comparação a todos os outros kits, esse fato pode ser explicado pela baixa sensibilidade do kit, considerando o Ct máximo amplificado por esse foi de 34,94.

Um estudo de Shen et al (2020) comparou 94 amostras positivas para SARS-CoV-2 em 6 kits comerciais diferentes, excluindo amostras com valor de Ct maior que 35. A sensibilidade deles variou entre 100% e 90,4%, sendo que o valor preditivo positivo variou entre 100% e 95,74% e o valor preditivo negativo variou entre 100% e 87,67. Enquanto em nosso trabalho o valor preditivo positivo encontrado variou entre 98,25 e 78,66 e o valor preditivo negativo variou entre 100% e 80%. No mesmo estudo é identificado que o gene RdRP é menos sensível em comparação ao gene ORF-1ab, nos valores obtidos em nosso trabalho também é possível afirmar que o gene-alvo RdRP é menos sensível em relação ao gene ORF-1ab pois o kit consegue detectar valores de Cts apenas até 35 enquanto o gene ORF-1ab conseguiu detectar Cts de até 39.

Gdoura et al (2022) cita em seu estudo que valores de Ct maiores que 28 podem gerar sequências não específicas devido a uma inativação da Taq polimerase e sugeriu que valores acima de 28 deveriam ser desconsiderados, porém em nosso estudo o valor de Ct foi considerado seguindo a orientação de cada fornecedor, ou seja, foi considerado detectado amostras com Ct até 40.

O estudo de Barros et al (2022) que comparou o kit Seegene Allplex™ SARS-CoV-2 Assay com a metodologia sem extração com um kit comercial com a metodologia de extração presente, sugeriu que valores de Cts acima entre 35 e 40 seriam sugestivos de falsos positivos, recomendando que nessa metodologia fossem considerados somente valores de Ct até 35. No nosso estudo foi observado que esse kit em específico possui valores de Cts maiores comparados aos outros kits, porém se valores de Cts acima de 35 não fossem considerados, seriam gerados resultados falsos negativos, já que mesmo com valores altos de Cts os resultados nos outros kits utilizados para comparação se mostraram positivos.

Ainda em estudo de Barros et al (2022), foi comparado resultado com valor máximo de Ct de 35 e de 40. Quando o valor do Ct foi ampliado até 40, amostras que não foram consideradas positivas passaram a ser, principalmente devido ao gene N, que demonstrou valores máximos de Ct até 39,89. O mesmo aconteceu em nosso estudo, tendo Ct máximo do gene N de 39,40. Se compararmos a quantidade de amostras

detectadas no gene N do kit Seegene com extração, temos um número de 154 amostras, enquanto no Seegene sem extração é observado 125 amostras, que corrobora com a baixa especificidade do Seegene com extração, indicando que o percentual de amostras detectadas desse kit pode ter sido gerado por resultados falso-positivos.

Barros et al (2022) também demonstrou correlação entre os genes-alvo, observadas entre os genes E e RdRP, genes E e N e genes N e RdRP. Enquanto em nosso trabalho a maior correlação foi observada entre os genes E e N. Já os kits que possuem maior correlação são os kits IBMP e Qiagen e Seegene sem extração e Qiagen, que possuem nível de concordância considerado moderado. Essas diferenças são constatadas, também, na Figura 10, onde é demonstrado a curva ROC, sendo possível observar os kits que possuem mais equilíbrio entre a sensibilidade e especificidade, liderados pelo kit Qiagen e IBMP, seguidos pelo Seegene sem extração e Bio-Manguinhos, finalizando com o kit Seegene com extração.

As repetições realizadas foram de reações que não amplificaram o controle interno, as amostras que porventura foram consideradas inconclusivas pelo respectivo kit foram consideradas negativas ou positivas dependendo da análise da curva, do Ct e do que cada kit determina em sua interpretação, não havendo resultados inconclusivos ou repetições para esses resultados. Assim foi possível determinar a quantidade de repetições que cada kit necessitou, observando uma maior quantidade no kit Seegene sem extração (9) comparado às metodologias com a extração padrão. Segundo Fenaux et al (2022) essas repetições são esperadas em kits com a ausência da extração pois o RNA não passa pelo processo de purificação, portanto a reação sofre com muito mais interferentes que podem inativar a PCR.

O estudo de Fenaux et al (2022) determinou o desempenho do kit QIA Prep&Amp Viral RNA UM Kit, um método sem extração que possui grande vantagem por ter um tempo de diagnóstico curto. 156 amostras de swab nasofaríngeo em diferentes meios de transporte foram submetidas a avaliação, sendo que 8 dentre as 156 (cerca de 5,1%) amostras não amplificaram o controle interno, sendo necessário a repetição da reação. A sensibilidade dos resultados foi de 100% em amostras com Ct < 34, de 56,7% em Ct entre 34 e 38 e 11,1% em Ct > 38. Assim como no estudo de Fenaux et al (2022), no nosso estudo o kit QIA Prep&Amp também se mostra menos sensível em amostras com Cts mais altos, possuindo um coeficiente de variação de 24,94, sendo o maior CT detectável 34,94, bem abaixo de Cts de genes no kit da Seegene por exemplo, onde o alvo RdRP no

kit Seegene com extração detectou um Ct máximo de 42,37 e o Seegene sem extração detectou um Ct máximo de 41,50. O estudo conclui que esse método pode ser utilizado como backup nos laboratórios, substituindo protocolos mais seguros caso haja necessidade.

O estudo teve como limitações a ausência de diluições seriadas, para verificar a quantidade de material genético extraído e, portanto, a sensibilidade dos kits tal como não foi realizada painel viral para a verificação da existência de outros vírus respiratórios nas amostras analisadas, para detecção de possíveis reações cruzadas interferindo na especificidade dos produtos. Porém estudos como o de Barros et al (2022) e Shen et al (2020) que realizaram diluições e fizeram painel viral para identificação de reação cruzada possuem os mesmos parâmetros e elementos para comparação, não invalidando os resultados do nosso trabalho.

7 CONCLUSÃO

Considerando nossos achados, podemos concluir que a qualidade dos kits não está atrelada somente a um único fator. A etapa de extração é um importante fator para eliminação de possíveis interferentes das reações, porém a quantidade de alvos também deve ser levada em consideração, tendo em contas que kits que possuem uma maior quantidade de alvos tendem a ser mais sensíveis do que kits que só possuem um ou dois alvos, considerando que temos uma grande quantidade de variantes e possíveis mutações em qualquer um dos genes analisados. No geral existem vantagens e desvantagens em cada kit, é de suma importância avaliar regulamente os protocolos e kits utilizados, adequando-os a atual rotina e considerando o surgimento das novas variantes. Entretanto, todos os kits apresentam sensibilidade satisfatória para a realização da detecção do SARS-CoV-2 por RT-qPCR.

8 REFERÊNCIAS

ABBOTT, S. et al. **Estimating the time-varying reproduction number of SARS-CoV-2 using national and subnational case counts.** Wellcome Open Research, v. 5, p. 112, 1 jun. 2020.

AL BAYAT, S. et al. **Can the cycle threshold (Ct) value of RT-PCR test for SARS CoV2 predict infectivity among close contacts?** Journal of Infection and Public Health, v. 14, n. 9, p. 1201–1205, set. 2021.

ALHAMID, G. et al. **SARS-CoV-2 detection methods: A comprehensive review.** Saudi Journal of Biological Sciences, v. 29, n. 11, p. 103465, nov. 2022.

ALI, A. et al. **Seroprevalence of SARS-CoV-2: Insights into the epidemiology of the pandemic.** Journal of Infection and Public Health, v. 16, n. 8, p. 1256–1261, 1 ago. 2023.

ASTUTI, I.; YSRAFIL. **Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response.** Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews, v. 14, n. 4, p. 407–412, abr. 2020.

BAKR A. T. et al. **Next-generation nanophotonic-enabled biosensors for intelligent diagnosis of SARS-CoV-2 variants.** v. 880, p. 163333–163333, 1 jul. 2023.

BARROS, F. R. O. et al. **Performance of RT-qPCR detection of SARS-CoV-2 in unextracted nasopharyngeal samples using the Seegene Allplex 2019-nCoV protocol.** Journal of Virological Methods, v. 300, p. 114429, fev. 2022.

BHAT, E. A. et al. **SARS-CoV-2: Insight in genome structure, pathogenesis and viral receptor binding analysis – An updated review.** International Immunopharmacology, v. 95, p. 107493, jun. 2021.

BLOEMEN, M. et al. **Fast detection of SARS-CoV-2 variants including Omicron using one-step RT-PCR and Sanger sequencing.** Journal of Virological Methods, v. 304, p. 114512, jun. 2022.

BROWN, E. et al. **The potential impact of COVID-19 on psychosis: A rapid review of contemporary epidemic and pandemic research.** Schizophrenia Research, v. 222, maio 2020.

BROOM, J. et al. **Experiences of the SARS-CoV-2 pandemic amongst Australian healthcare workers: from stressors to protective factors.** Journal of Hospital Infection, v. 121, p. 75–81, mar. 2022.

BULLARD, J. et al. **Predicting infectious SARS-CoV-2 from diagnostic samples.** Clinical Infectious Diseases, p. 638, 22 maio 2020.

CAROD-ARTAL, F.C. **Neurological complications of coronavirus and COVID-19.** v. 70, n. 9, p. 311–322, 1 maio 2020.

COSTA, L. G. V. DA et al. **Risk factors for SARS-CoV-2 infection and epidemiological profile of Brazilian anesthesiologists during the COVID-19 pandemic: cross-sectional study.** Brazilian Journal of Anesthesiology (English Edition), v. 72, n. 2, p. 176–184, 1 mar. 2022.

COHEN, J. (1960). **A Coefficient of Agreement for Nominal Scales.** Educational and Psychological Measurement, 20(1), 37–46.

CORDEIRO, G. M., & DEMÉTRIO, C. G. B. (2010). **Modelos Lineares Generalizados e Extensões.** UFRPE / ESALQ.

DEVI, M. J.; GAFFAR, S.; HARTATI, Y. W. **A review post-vaccination SARS-CoV-2 serological test: Method and antibody titer response.** Analytical Biochemistry, v. 658, p. 114902, 1 dez. 2022.

DIANI, E. et al. **Assessment of SARS-CoV-2 IgG and IgM antibody detection with a lateral flow immunoassay test.** Heliyon, v. 7, n. 10, p. e08192, out. 2021.

DOCKERY, D. M. et al. **The Ocular Manifestations and Transmission of COVID-19: Recommendations for Prevention.** The Journal of Emergency Medicine, maio 2020.

DOBSON, A. J. **An introduction to generalized linear models.** Chapman & Hall/CRC, 1990.

DUNN, O. J. **Multiple Comparisons Using Rank Sums.** Technometrics, 6(3), 241–252, 1964.

EDUARDO, C. et al. **The impact of the COVID-19 pandemic on the use of diagnostic imaging examinations in the Brazilian unified healthcare system (SUS).** Health Policy and Technology, v. 12, n. 1, p. 100725–100725, 1 mar. 2023.

ELRASHDY, F.; REDWAN, E. M.; UVERSKY, V. N. **Intrinsic disorder perspective of an interplay between the renin-angiotensin-aldosterone system and SARS-CoV-2.** Infection, Genetics and Evolution, v. 85, p. 104510, nov. 2020.

EMAM, M. et al. **Positive selection as a key player for SARS-CoV-2 pathogenicity: Insights into ORF1ab, S and E genes.** Virus Research, v. 302, p. 198472, set. 2021.

FAWCETT, T. **An introduction to ROC analysis.** Pattern Recognition Letters, v. 27, n. 8, p. 861–874, jun. 2006.

FARASANI, A. **Genetic analysis of the 2019 coronavirus pandemic with from real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction.** Saudi Journal of Biological Sciences, nov. 2020.

FERREIRA, G. M. et al. **Molecular characterization and sequencing analysis of SARS-CoV-2 genome in Minas Gerais, Brazil.** *Biologicals*, v. 80, p. 43–52, 1 out. 2022.

FUKASAWA L. O. et al. **Comparative performances of seven quantitative Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction assays (RT-qPCR) for detecting SARS-CoV-2 infection in samples from individuals suspected of COVID-19 in São Paulo, Brazil.** *Journal of clinical virology plus*, v. 1, n. 1-2, p. 100012–100012, 1 jun. 2021.

GALVÊAS, D.; BARROS, F.; FUZO, C. A. **A forensic analysis of SARS-CoV-2 cases and COVID-19 mortality misreporting in the Brazilian population.** *Public Health*, v. 196, p. 114–116, jul. 2021.

GDOURA, M. et al. **SARS-CoV2 RT-PCR assays: In vitro comparison of 4 WHO approved protocols on clinical specimens and its implications for real laboratory practice through variant emergence.** *Virology Journal*, v. 19, n. 1, 28 mar. 2022.

GUAN, W-J. et al. **Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China.** *The New England Journal of Medicine*. V. 382, n. 18, p. 1708-1720, 30 abril 2020.

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

GUO, T. **Long-Term Changes and Variability of Ecologically-Based Climate Indices along an Altitudinal Gradient on the Qinghai-Tibetan Plateau.** *Climate*, v. 9, n. 1, p. 1, 24 dez. 2020.

HARDENBROOK, N. J.; ZHANG, P. **A structural view of the SARS-CoV-2 virus and its assembly.** *Current Opinion in Virology*, v. 52, p. 123–134, 1 fev. 2022.

HASSAN, M. et al. **Neurological complications of SARS-CoV-2: A single-center case series authors.** Brain Hemorrhages, v. 2, n. 4, p. 161–164, dez. 2021.

HILLARY, V. E.; CEASAR, S. A. **An update on COVID-19: SARS-CoV-2 variants, antiviral drugs, and vaccines.** Heliyon, v. 9, n. 3, p. e13952, mar. 2023.

HUI, K. P. Y. et al. **Replication of SARS-CoV-2 Omicron BA.2 variant in ex vivo cultures of the human upper and lower respiratory tract.** EBioMedicine, v. 83, p. 104232, 1 set. 2022.

ISLAM, M. M.; KOIRLA, D. **Toward a next-generation diagnostic tool: A review on emerging isothermal nucleic acid amplification techniques for the detection of SARS-CoV-2 and other infectious viruses.** Analytica Chimica Acta, p. 339338, dez. 2021.

JAHIRUL ISLAM, MD. et al. **A review on structural, non-structural, and accessory proteins of SARS-CoV-2: Highlighting drug target sites.** Immunobiology, v. 228, n. 1, p. 152302, jan. 2023.

JIN, X. et al. **Epidemiological, clinical and virological characteristics of 74 cases of coronavirus-infected disease 2019 (COVID-19) with gastrointestinal symptoms.** Gut, v. 69, n. 6, p. 1002–1009, 24 mar. 2020.

JING, S. et al. **Vaccine hesitancy promotes emergence of new SARS-CoV-2 variants.** Journal of Theoretical Biology, v. 570, p. 111522–111522, 1 ago. 2023.

KANDWAL, S.; FAYNE, D. **Genetic conservation across SARS-CoV-2 non-structural proteins – Insights into possible targets for treatment of future viral outbreaks.** Virology, v. 581, p. 97–115, abr. 2023.

KASAL, D. A. B.; DE LORENZO, A.; TIBIRIÇÁ, E. **COVID-19 and Microvascular Disease: Pathophysiology of SARS-Cov-2 Infection With Focus on the Renin-Angiotensin System.** Heart, Lung and Circulation, set. 2020.

KAWAMURA, T. **Interpretação de um teste sob a visão epidemiológica: eficiência de um teste.** Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 79, n. 4, out. 2002.

KRUSKAL, W. H.; WALLIS, W. A. **Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis.** Journal of the American Statistical Association, v. 47, n. 260, p. 583, dez. 1952.

LAW, M. et al. **Efficacy and effectiveness of inactivated vaccines against symptomatic COVID-19, severe COVID-19, and COVID-19 clinical outcomes in the general population: a systematic review and meta-analysis.** The Lancet Regional Health - Western Pacific, p. 100788–100788, 1 maio 2023.

LEO, B. F. et al. **An overview of SARS-CoV-2 transmission and engineering strategies to mitigate risk.** Journal of Building Engineering, p. 106737, 8 maio 2023.

LIU, K. et al. **Clinical characteristics of novel coronavirus cases in tertiary hospitals in Hubei Province.** Chinese Medical Journal, v. 133, n. 9, p. 1025–1031, maio 2020.

Linhagem BA.2 da variante ômicron passa a ser a dominante do coronavírus no Brasil, diz Fiocruz. Disponível em: <<https://g1.globo.com/saude/noticia/2022/06/24/linhagem-ba2-da-variante-omicron-passa-a-ser-a-predominante-do-coronavirus-no-brasil-diz-fiocruz.ghtml>>. Acesso em: 9 ago. 2023.

LOPEZ-MORALES, J. et al. **Multiplexed On-Yeast Serological Assay for Immune Escape Screening of SARS-CoV-2 Variants.** iScience, p. 106648, abr. 2023.

MAME DIARRA NDIAYE et al. **Using a Multiplex Serological Assay to Estimate Time Since SARS-CoV-2 Infection and Past Clinical Presentation in Malagasy Patients.** 1 jan. 2022.

MCNEMAR, Q. **Note on the sampling error of the difference between correlated proportions or percentages.** Psychometrika, v. 12, n. 2, p. 153–157, jun. 1947.

Manual do Kit UM de RNA Viral QIAprep&. 1ª Edição. 2020.

MALIK, M.; HNATKOVA, K. **QT interval duration and QT/heart rate relationship.** Sex and Cardiac Electrophysiology, p. 97–116, 2020.

MATIAS, F. **Práticas e Protocolos Básicos de Biologia Molecular.** São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda., 30 abril 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Coronavírus Brasil.** Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/> Acesso em 07/03/2022.

NEWBY, M. L. et al. Natural variations within the glycan shield of SARS-CoV-2 impact viral spike dynamics. 17 ago. 2022.

NELDER, J. A.; WEDDERBURN, R. W. M. **Generalized Linear Models.** Journal of the Royal Statistical Society. Series A (General), 135(3370–384), 1972.

NOVAES ROCHA, V. **Viral replication of SARS-CoV-2 could be self-limitative – The role of the renin-angiotensin system on COVID-19 pathophysiology.** Medical Hypotheses, v. 145, p. 110330, dez. 2020.

OSAMOR, V. C. et al. **COVID-19 Vaccines: Computational tools and Development.** Informatics in Medicine Unlocked, p. 101164, jan. 2023.

OMS anuncia nomenclaturas simples e fáceis de pronunciar para variantes de interesse e de preocupação do SARS-CoV-2. Organização Pan-americana de Saúde, 01 jul 2021. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/1-6-2021-oms-anuncia-nomenclaturas-simples-e-faceis-pronunciar-para-variantes-interesse-e>. Acesso em 03/08/2023.

PATIL, N. et al. **Factors associated with poor outcomes among COVID-19 patients with gastrointestinal symptoms.** Gastro Hep Advances, 26 ago. 2022.

Phylodynamics. Disponível em: <https://phylodynamics.pandemicprepardness.org/dist/start.html?id=TGF0aW4lMjBBbWVyaWNh&s=1&h=0>. Acesso em: 13 ago. 2023.

RANGAIAH, A. et al. **Detection of SARS-CoV2 in Clinical Samples: Target-specific Analysis of Qualitative Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction(RT-PCR) Diagnostic Kits.** IJID Regions, nov. 2021.

RICHARDSON, S. et al. **Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes Among 5700 Patients Hospitalized With COVID-19 in the New York City Area.** JAMA, v. 323, n. 20, 22 abr. 2020.

R CORE TEAM. **R: The R Project for Statistical Computing.** Disponível em: <https://www.r-project.org/> Acesso em 15/06/2023.

ROBIN, X. et al. **pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves.** BMC Bioinformatics, v. 12, n. 1, 17 mar. 2011.

SATARI H. I. et al. **Safety Profile of Inactivated COVID-19 Vaccine in Indonesian Adults.** Vaccine: X, p. 100331–100331, 1 jun. 2023.

SADOFF, J. et al. **Interim Results of a Phase 1–2a Trial of Ad26.COV2.S Covid-19 Vaccine.** New England Journal of Medicine, V. 384, p. 1824-1835, 13 jan. 2021.

SEARA-MORAIS, G. J. et al. **Mobility restrictions during the COVID-19 pandemic and reduced outpatient HIV and syphilis testing in Brazil.** v. 27, n. 3, p. 102771–102771, 1 maio 2023.

SENOK, A. et al. **Saliva as an Alternative Specimen for Molecular COVID-19 Testing in Community Settings and Population-Based Screening.** Infection and Drug Resistance, v. Volume 13, p. 3393–3399, out. 2020.

SEYEDMIRZAEI, H. et al. **Effects of COVID-19 pandemic on depression in patients with schizophrenia: A mini-review of the current evidence.** Journal of Affective Disorders, v. 332, p. 143–149, 1 jul. 2023.

SHEN, L. et al. **Comparison of four commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19 in China.** Journal of Clinical Laboratory Analysis, v. 35, n. 1, 15 dez. 2020.

SHI, S. et al. **Association of Cardiac Injury With Mortality in Hospitalized Patients With COVID-19 in Wuhan, China.** JAMA Cardiology, v. 5, n. 7, 25 mar. 2020.

TSATSAKIS, A. et al. **SARS-CoV-2 pathophysiology and its clinical implications: An integrative overview of the pharmacotherapeutic management of COVID-19.** Food and Chemical Toxicology, v. 146, p. 111769, dez. 2020.

TRAUT, C. C.; BLANKSON, J. N. **Bivalent mRNA vaccine-elicited SARS-CoV-2 specific T cells recognise the omicron XBB sublineage.** The Lancet Microbe, v. 4, n. 6, p. e388–e388, 1 jun. 2023.

TRUONG, T. T.; BARD, J. D.; BUTLER-WU, S. M. **Rapid antigen assays for SARS-CoV-2: Promise and peril.** Clinics in Laboratory Medicine, mar. 2022.

ULHAQ, Z. S.; SORAYA, G. V. **Interleukin-6 as a potential biomarker of COVID-19 progression.** Médecine et Maladies Infectieuses, v. 50, p. 382-383, abr. 2020.

URAKI R. et al. **Efficacy of antivirals and bivalent mRNA vaccines against SARS-CoV-2 isolate.** The Lancet Infectious Diseases, CH.1.1. v. 23, n. 5, p. 525–526, 1 maio 2023.

VAN KASTEREN, P. B. et al. **Comparison of commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19.** Journal of Clinical Virology, p. 104412, maio 2020.

WAGENHÄUSER, I. et al. **Clinical performance evaluation of SARS-CoV-2 rapid antigen testing in point of care usage in comparison to RT-qPCR.** EBioMedicine, v. 69, p. 103455, jul. 2021.

WAGES, J. M. **POLYMERASE CHAIN REACTION.** Encyclopedia of Analytical Science, p. 243–250, 2005.

WANG, J. et al. **Bivalent mRNA vaccines against three SARS-CoV-2 variants mediated by new ionizable lipid nanoparticles.** International Journal of Pharmaceutics, p. 123155–123155, 1 jul. 2023.

WU, Y. et al. **Nervous system involvement after infection with COVID-19 and other coronaviruses.** Brain, Behavior, and Immunity, v. 87, p. 18 — 22, 30 mar. 2020.

XIAO, H. et al. **CRISPR techniques and potential for the detection and discrimination of SARS-CoV-2 variants of concern.** TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 161, p. 117000, abr. 2023.

YANG, M. et al. **Performance verification of five commercial RT-qPCR diagnostic kits for SARS-CoV-2.** Clinica Chimica Acta, v. 525, p. 46–53, jan. 2022.

ZHOU, Y. et al. **Advancements in detection of SARS-CoV-2 infection for confronting COVID-19 pandemics.** Laboratory Investigation, 8 set. 2021.

9 ANEXOS

Anexo I – Parecer substanciado aprovado do Comitê de ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Sergipe, de número 5.529.359.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Comparação Entre 2 Kits Comerciais De Reação De Cadeia De Polimerase Em Tempo Real (RT-PCR) Para SARS-COV-2 Utilizados Na Pandemia No Estado De Sergipe

Pesquisador: Adriana Guimarães dos Santos

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 59618022.4.0000.5546

Instituição Proponente: Programa de Pós Graduação em Biotecnologia-ProBio

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.529.359

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo "Informações Básicas da Pesquisa" (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1961798.pdf) e do "Projeto Detalhado / Brochura Investigador" (novoprojetocovidversaocep.pdf), postados em 07/06/2022.

Introdução:

A pandemia do novo coronavírus, nomeado de SARS-CoV-2, assolou o mundo em 2019, com mais de 460 milhões de casos ao redor do globo, até a presente redação desse estudo, sendo mais de 29 milhões de casos registrados somente no Brasil, levando mais de 655 mil brasileiros a óbito nesse período, de acordo com dados fornecidos pelo governo diariamente (Coronavirus Brasil, 2022). Originalmente o coronavírus foi identificado em meados de 2002 na cidade chinesa de Guangdong, devido a uma epidemia atípica de pneumonia em seus moradores, foi identificado então como SARS-CoV, já em 2012, o oriente médio viveu um novo surto de coronavírus denominado de MERS-CoV, com altas taxas de letalidade, sendo considerada uma das piores epidemias da região. (Hardenbrook e Zhang, 2022). O SARS-CoV-2 foi então considerada uma pandemia em 2020, com taxas de letalidade mais baixas, porém com uma alta taxa de transmissão. A partir de então vimos esforços sem precedentes de cientistas e

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº

Bairro: Sanatório

UF: SE

Município: ARACAJU

Telefone: (79)3194-7208

CEP: 49.060-110

E-mail: cep@academico.ufs.br



profissionais da saúde em todo mundo para desenvolver vacinas, métodos terapêuticos e diagnósticos que pudessem conter ou melhor atender as demandas do sistema de saúde atual, impactando diretamente na economia global e na vida de todos os indivíduos. (Hardenbrook e Zhang, 2022). A transmissão do vírus pode ser por diversas vias, as principais são as vias aéreas, através de gotículas de saliva e secreção deixadas no ar por pessoas infectadas e mediante contato indireto com superfícies contaminadas. Uma variedade de sintomas e sequelas ainda estão sendo investigados, porém os mais comuns são febre, falta de ar, perda de olfato e/ou paladar e dor de cabeça, entretanto em pessoas idosas ou com comorbidades esses sintomas podem evoluir para uma síndrome respiratória aguda grave, levando ao óbito em poucos dias. É importante lembrar também que a infecção pode ser totalmente assintomática e mesmo assim o indivíduo pode continuar transmitindo o vírus, por isso a grande importância do isolamento social para a contenção da pandemia. (Islam e Koirala, 2021). O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA de fita simples e com um dos maiores genomas virais conhecidos (Islam e Koirala, 2021). É um vírus envelopado, do gênero - coronavírus, contendo 4 estruturas principais, o ORF, estrutura de leitura aberta do coronavírus, a proteína do nucleocapsídeo (N), proteína do envelope (E) e proteínas de superfície (S), sendo os genes que codificam essas proteínas comumente usados para detecção molecular do vírus (Yang et al, 2022). A superfície externa é totalmente

recoberta por proteínas spike (S), o que a faz ser uma das maiores proteínas de fusão. É dividida em duas subunidades, a S1 que confere flexibilidade a estrutura do vírus, que os tornam mais fáceis de se ligarem aos receptores celulares do hospedeiro e a S2 que proporciona a fusão da membrana viral com a célula hospedeira, desempenhando um papel fundamental para o sucesso da infecção viral. Já a proteína do envelope (E) é uma proteína pequena que faz parte do canal transmembranar, ou seja, cria um canal entre as membranas do vírus e da célula hospedeira, diferente da proteína do nucleocapsídeo (N), considerado o principal componente proteico do vírus pois é responsável por empacotar o RNA dentro do vírus. (Hardenbrook e Zhang, 2022). Essas principais estruturas são alvos importantes na utilização de técnicas moleculares de detecção diagnóstica do vírus, como o RT-PCR, Reação em Cadeira de Polimerase em Tempo Real. A medida que a pandemia foi avançando, surgiram diversos métodos diagnósticos de detecção da infecção viral, cada um com suas particularidades, vantagens e desvantagens, devendo sempre ser avaliado de acordo

com a resposta que o paciente precisa no momento. Surgiram testes baseados na detecção do antígeno viral, através de ensaios imunocromatográficos, atualmente muito utilizados devido a sua

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº

Bairro: Sanatório

CEP: 49.060-110

UF: SE

Município: ARACAJU

Telefone: (79)3194-7208

E-mail: cep@academico.ufs.br



resposta rápida e mais acessível, tanto economicamente quanto em questão de estrutura operacional, que detectam a infecção ativas em curso (Wagenhäuser et al, 2021), como também surgiram testes sorológicos baseados na detecção de anticorpos IgM e IgG, que são mais indicados em casos de monitoramento de infecção, já que a Imunoglobulina M reagente indica infecções ativas e a Imunoglobulina G indicam presença de anticorpos de memória, ou seja, paciente que tiveram a infecção prévia, sintomática ou assintomática, além de também apresentarem como vantagem a rapidez na testagem e menor custo financeiro porém como desvantagem apresentam uma menor sensibilidade, principalmente em pacientes com infecção com menos de 10 dias do início dos sintomas, de acordo com o estudo realizado por Diani et al, 2021. Diante de tantos estudos, o teste padrão-ouro para detecção do SARS-CoV-2 continua sendo o teste molecular por RT-PCR, pois dentre todos é o que possui maior sensibilidade ao longo do curso da infecção, até o 7º dia de sintoma, uma vez que ele detecta a presença especificamente do RNA viral. Essa detecção é feita por meio da extração e amplificação do RNA viral presente na amostra do indivíduo, o material mais comum para síndromes respiratórias é o swab nasofaríngeo porém outros materiais como secreção broncoalveolar e saliva também podem ser usados para o mesmo fim. A extração e purificação do RNA pode ser feita manualmente ou de forma automática com o uso de reagentes específicos, porém a amplificação necessita obrigatoriamente de um termociclador, ou seja, de um aparelho que altere a temperatura das amostras para que a reação de cadeia em polimerase aconteça. As temperaturas variam de acordo com o kit, os primers as sondas e o aparelho utilizado e dependem do número de ciclos e de cada etapa de amplificação, entretanto as fases de desnaturação, hibridização e anelamento sempre estão presentes. (Islam e Koirla, 2021). A amplificação é baseada no acoplamento dos primers com a sonda que emite fluorescência, caso haja presença de RNA na amostra, e quantificada de acordo com o Ct ou Limiar de Ciclo, que é o número que determina se um teste é ou não positivo, caracterizado como número de ciclos necessários para o início da amplificação. Portanto o Ct é inversamente proporcional à carga viral presente na amostra, ou seja, quanto maior a carga viral menor o número do Ct pois mais rápido a amplificação se iniciará. Ainda não existem estudos suficientes para determinar a relação entre a carga viral e a gravidade da doença ou a uma maior sintomatologia, porém muitos já fazem essa correlação. (Bayat et al, 2021). Com o surgimento da pandemia o mundo viu a necessidade de desenvolver novos kits comerciais cada vez mais rápidos e mais específicos que acompanhassem a evolução da doença e as mutações existentes. A grande maioria das mutações no vírus estão presentes na proteína spike, comprometendo a detecção do gene S em kits com essa especificidade (Bloemen et al, 2022). Nesse contexto, observa-se que

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº

Bairro: Sanatório

CEP: 49.060-110

UF: SE

Município: ARACAJU

Telefone: (79)3194-7208

E-mail: cep@academico.ufs.br



existe um grande potencial científico atrelado a esse tema, possibilitando descobertas a todo momento em relação ao vírus e ao seu diagnóstico, com o objetivo de ajudar tanto a comunidade científica quanto a população e os profissionais da saúde responsáveis pela linha de frente do covid-19. Dito isto, o presente estudo tem como objetivo comparar 4 kits comerciais utilizados atualmente para detecção de RT-PCR de SARSCoV-2, diferenciá-los em termos de custo benefício, tempo de resposta diagnóstica e melhor comportamento frente a atual situação pandêmica do mundo.

Hipótese:

O presente estudo espera que os resultados sejam compatíveis em sua maioria, porém existem variáveis, como baixa carga viral, que podem tornar uma porcentagem dos resultados divergentes. Espera-se que exista uma menor sensibilidade no kit QIA Prep&Amp Viral RNA UM Kit da Qiagen, por ser um kit que pula a etapa de extração, assim como espera-se que algumas amostras não amplifiquem, principalmente o gene S, devido a presença de variantes no estado de Sergipe no período em que as amostras foram testadas.

Metodologia Proposta:

Serão utilizadas amostras de swab nasofaríngeo imergidas em 3ml de cloreto de sódio a 09% colhidas em janeiro de 2022 e armazenadas em um freezer a -70°C para conservação viral, cedidas pela Rede Primavera Assistência Médica Hospitalar em consenso com a Universidade Federal de Sergipe. As amostras foram previamente utilizadas para realização de RT-PCR para SARS-CoV-2 em pacientes com suspeita da infecção, sendo estes tanto pacientes internados na rede hospitalar, quanto pacientes da rede externa laboratorial, sendo assim, não haverá nenhum conflito de interesse entre a pesquisa, o hospital e o paciente. Serão utilizados 2 kits diferentes para detecção de SARS-CoV-2 com o mesmo material, sendo os dois específicos para SARS-CoV-2. O kit 1 é o TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit da ThermoFisher Scientific, nele é detectado 3 genes específicos do vírus, o gene N, ORF e gene S, sendo considerado detectável para SARS-CoV-2 se dois dos três alvos amplificarem até o Ct de 40 ciclos, este será cedido pela Universidade Federal de Sergipe em parceria com o Departamento de Morfologia. O kit 2 é o QIA Prep&Amp Viral RNA UM Kit da Qiagen, é um kit de extração rápida, utilizando apenas um gene reagente e 2 minutos para completar sua extração do RNA e amplifica somente um gene específico, utilizado para diagnóstico molecular mais simples e prático. Este resultado já foi obtido pelo Hospital Primavera que utilizou esta técnica para diagnóstico

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº

Bairro: Sanatório

CEP: 49.060-110

UF: SE

Município: ARACAJU

Telefone: (79)3194-7208

E-mail: cep@academico.ufs.br



Continuação do Parecer: 5.529.359

laboratorial. Os dois são utilizados pelo mesmo laboratório em situações diferentes, de acordo com a exigência da demanda.

Critério de Exclusão:

Serão excluídos pacientes menores de 18 anos, não havendo nenhum outro critério de exclusão ou inclusão.

Metodologia de Análise de Dados:

Para a sistematização e observação dos resultados, os dados serão tabulados e com eles feitos os gráficos pertinentes (Excel, GraphPadPrism).

Todos os dados serão expressos como média $\pm$ Erro Padrão Médio (EPM). Para a decisão estatística, será usado o teste ANOVA one-way seguido de teste de Tukey ou o teste t- student, a depender do caso.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Fazer uma comparação entre os resultados de RT-PCR para SARS-CoV-2 em amostras de swab nasofaríngeo obtidas através de um hospital particular de Aracaju, Sergipe em 2 kits comerciais diferentes presentes no mercado, discutindo as concordâncias e discordâncias entre eles, a diferença de metodologia, o tempo de resposta diagnóstica e o custo benefício de cada um.

Objetivo Secundário:

- Descrever a metodologia de cada kit e seus reagentes, tanto da extração do RNA quanto da amplificação.
- Realizar RT-PCR para SARSCoV-2 em 2 kits diferentes, utilizando o mesmo equipamento de amplificação, o Quantstudio™ 5 Real Time- PCR System for Human Identification da ThermoFisher Scientific.
- Avaliar os resultados obtidos através do kit TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit da ThermoFisher Scientific.
- Avaliar os resultados obtidos através do kit QIA Prep&Amp Viral RNA UM Kit da Qiagen.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº	CEP: 49.060-110
Bairro: Sanatório	
UF: SE	Município: ARACAJU
Telefone: (79)3194-7208	E-mail: cep@academico.ufs.br



O presente estudo apresenta um único risco envolvido, um possível constrangimento relacionado ao resultado dos testes que será contornado pela não divulgação da identidade dos participantes, portanto não possui divulgação de informações confidenciais nem invasão de privacidade ou perguntas de cunho sensível aos participantes, não utiliza de questionários e não interfere na vida ou rotina do participante, não oferece nenhum tipo de

dano individual ou coletivo, imediato ou posterior. O descarte do material é feito de forma adequada seguindo as normas da ANVISA e acreditado pela ONA, assim como segue as boas práticas de biossegurança do laboratório, considerando que o setor de Biologia Molecular trabalha com amostras infectantes, produtos químicos potencialmente nocivos à saúde e ao meio ambiente e utilização de luz ultravioleta, classificado como risco biológico de classe III, portanto é utilizado todos os EPI's necessários para evitar contaminação tanto da amostra, quanto do ambiente e do operador.

Benefícios:

A pesquisa oferece benefícios à população e à ciência, principalmente em tempos pandêmicos, onde se faz necessária pesquisas para entender melhor os processos relacionados ao novo coronavírus, ampliando a discussão sobre o diagnóstico dessa nova doença, apresentando um debate sobre a principal técnica de diagnóstico do vírus, possibilitando tanto ao público em geral quanto aos pesquisadores e empresários a escolher melhor o método diagnóstico e o melhor kit de RT-PCR que abranja de forma mais homogênea uma população em específico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Realização da coleta de dados do resultado e das amostras de swab nasofaríngeo coletadas em Janeiro e Fevereiro de 2022 em um hospital particular de Aracaju, Sergipe para diagnóstico de RT-PCR com o Kit QIA Prep&Amp Viral RNA UM Kit da Qiagen, com as mesmas amostras será realizado o RT-PCR para detecção do vírus SARS-COV-2 com outro kit, o TaqPath COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit da ThermoFisher Scientific e feito a comparação entre seus resultados.

Equipe de Pesquisa:

Adriana Guimarães dos Santos

Estudo unicentrico- Hospital da rede privada do estado de Sergipe.

Apoio Financeiro: Financiamento Próprio. Orçamento Apresentado: R\$ 1.664,92

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº

Bairro: Sanatório

CEP: 49.060-110

UF: SE

Município: ARACAJU

Telefone: (79)3194-7208

E-mail: cep@academico.ufs.br



Tamanho da Amostra no Brasil: 200

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram observados óbices éticos.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Sergipe, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP informa que de acordo com a Resolução CNS nº 466/12, Diretrizes e normas XI. 1 – A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais e XI. 2 - XI.2 - Cabe ao pesquisador: a) apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa; b) elaborar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e/ou Termo de Assentimento Livre e Esclarecido, quando necessário; c) desenvolver o projeto conforme delineado; d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento; f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa; g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1961798.pdf	07/06/2022 17:57:54		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	novoprojetocovidversaocep.pdf	07/06/2022 17:36:27	Adriana Guimarães dos Santos	Aceito
Solicitação	termodecompromissoeconfidencialm	07/06/2022	Adriana Guimarães	Aceito

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº

Bairro: Sanatório

CEP: 49.060-110

UF: SE

Município: ARACAJU

Telefone: (79)3194-7208

E-mail: cep@academico.ufs.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SERGIPE - UFS



Continuação do Parecer: 5.529.359

Assinada pelo Pesquisador Responsável	entee.pdf	17:19:21	dos Santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termodecompromissocompressed.pdf	07/06/2022 17:18:44	Adriana Guimarães dos Santos	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	termodeanuenciaprimavera.pdf	07/06/2022 17:15:31	Adriana Guimarães dos Santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	justificativatcle.pdf	07/06/2022 17:10:36	Adriana Guimarães dos Santos	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRostoassinado.pdf	07/06/2022 16:29:02	Adriana Guimarães dos Santos	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARACAJU, 15 de Julho de 2022

Assinado por:
FRANCISCO DE ASSIS PEREIRA
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº

Bairro: Sanatório

CEP: 49.060-110

UF: SE

Município: ARACAJU

Telefone: (79)3194-7208

E-mail: cep@academico.ufs.br

Anexo II- Preparação dos reagentes antes do uso de acordo com informações do fabricante com número de catálogo R2130.

Protocol

The protocol consists of: (I) Buffer Preparation, (II) Sample Preparation, (III) Total Nucleic Acid Purification and/or (IV) DNA and RNA Purification

(I) Buffer Preparation

- ✓ Add 20 ml (R2130) or 80 ml (R2131) isopropanol to the **MagBead DNA/RNA Wash 1** concentrate.
- ✓ Add 30 ml (R2130) or 120 ml (R2131) isopropanol to the **MagBead DNA/RNA Wash 2** concentrate.
- ✓ To prepare 1X solution of **DNA/RNA Shield™**, mix equal amounts of the supplied 2X concentrate with nuclease-free water (not provided) and mix well.
- ✓ Reconstitute lyophilized **Proteinase K** at 20 mg/ml with **Proteinase K Storage Buffer** and mix by vortexing. Use immediately or store frozen aliquots:
#D3001-2-20 (20 mg), add 1.04 ml **buffer**
- ✓ Reconstitute each vial of lyophilized **DNase I** with **DNase/RNase-Free Water** in a conical tube (not provided). Mix by gentle inversion and store frozen aliquots.
#E1011-A (1500 U), add 13.5 ml **water**
#E1009-A (250 U), add 2.25 ml **water**

For each sample to be treated, prepare **DNase I Reaction Mix** (scale up proportionally): Add 45 µl **DNase I** (reconstituted) and 5 µl **DNA Digestion Buffer** in a nuclease-free tube (not provided), mix by gentle inversion and place on ice until ready to use.

(III) Total Nucleic Acid Purification

1. Add 200 µl (1 volume) **DNA/RNA Lysis Buffer** to 200 µl sample and mix well¹.
2. Add 400 µl ethanol (95-100%) to the sample and mix well¹.
3. Add 30 µl **MagBinding Beads** and mix well¹ for 20 minutes.
Important: **MagBinding Beads** settle quickly, ensure that beads are kept in suspension while dispensing.
4. Transfer the plate/tube to the magnetic stand² until beads have pelleted, then aspirate³ and discard the cleared supernatant.
5. Add 500 µl **MagBead DNA/RNA Wash 1** and mix well¹. Pellet the beads^{2,3} and discard the supernatant.
6. Add 500 µl **MagBead DNA/RNA Wash 2** and mix well¹. Pellet the beads^{2,3} and discard the supernatant.
7. Add 500 µl ethanol (95-100%) and mix well¹. Pellet the beads^{2,3} and discard the supernatant.
8. Repeat step 7.
9. **DNase I treatment** (optional)
(D1) Add 50 µl **DNase I Reaction Mix** and mix gently for 10 minutes.
(D2) Add 500 µl **DNA/RNA Prep Buffer** and mix well¹ for 10 minutes. Pellet the beads^{2,3} and discard the supernatant.
(D3) Repeat steps 7-8.
10. Dry the beads for 10 minutes or until dry⁴.
11. To elute DNA/RNA from the beads, add ≥ 50 µl **DNase/RNase-Free Water** and mix well¹ for 5 minutes.
12. Transfer the plate/tube to the magnetic stand² until beads have pelleted, then aspirate³ and dispense the eluted DNA/RNA to a new plate/tube.

The eluted DNA/RNA can be used immediately or stored frozen.

1 For all buffer additions and incubation steps, **mix well** by pipetting the beads up and down several times and/or by shaking (vortexing) at ~1,300 rpm. Optimization may be required.

2 Use a strong-field magnetic stand or separator (e.g., ZR-96 MagStand, P1005; sold separately) until beads have pelleted.

3 Some beads will adhere to the sides of the well. When removing the supernatant, aspirate slowly to allow these beads to be pulled to the magnet as the liquid level is lowered.

4 Beads will change in appearance from glossy black when still wet to a dull brown when fully dry. Alternatively, a heat block can be used (25-55°C).

Anexo IV- Perfil térmico da reação de RT-qPCR do kit Seegene.

Etapas	Nº de ciclos	Temperatura	Duração
1	1	50 °C	20 minutos
2		95 °C	15 minutos
3	45	95 °C	10 segundos
4		60 °C	30 segundos
5		72 °C	10 segundos

Anexo V- Interpretação de resultados do kit Seegene Allplex™ SARS-CoV-2 Assay.

Resultado Alvo			Resultado	Interpretação
Gene E	Gene RdRP/E	Gene N	de IC	
+	+	+	+/-	Detectável para SARS-CoV-2
+	-	+	+/-	
-	+	+	+/-	
+	+	-	+/-	
-	+	-	+/-	
-	-	+	+/-	Presuntivo Positivo para SARS-CoV-2 (Recomenda-se repetir a reação)
+	-	-	+/-	
-	-	-	+	Não detectável para SARS-CoV-2
-	-	-	-	Inválido (Repetir corrida)

[illegible]

[illegible]

Anexo VIII- Perfil térmico da reação de RT-PCR do kit Bio-Manguinhos.

Etapas	Nº de ciclos	Temperatura	Duração
1	1	45 °C	15 minutos
2		95 °C	02 minutos
3	40	95 °C	15 segundos
4		58 °C	30 segundos

Anexo IX- Interpretação de resultados do kit SARS-CoV-2 EDx da Bio-Manguinhos.

Interpretação dos Resultados

Gene E	RP (Controle Interno)	Interpretação
+	+ ou -	Detectável para SARS-CoV-2
-	+	Não detectável para SARS-CoV-2
-	-	Repetir extração e RT-PCR

[illegible]

Anexo XI – Perfil térmico da reação de RT-PCR do kit IBMP.

Etapas	Nº de ciclos	Temperatura	Duração
1	1	50 °C	15 minutos
2		95 °C	03 minutos
3	40	95 °C	15 segundos
4		55 °C	40 segundos
5	1	25 °C	10 segundos

Anexo XII- Interpretação de resultados do kit SARS-CoV-2 IBMP.

Resultado para SARS-CoV-2	Gene ORF1ab	Gene N	Controle Interno	Controle Positivo	Controle Negativo
Detectável	+	+	+/-	+	-
Detectável*	+	-*	+/-	+	-
Não detectável	-	-	+	+	-
Não detectável**	-**	+	+/-	+	-
Inválido	+	+	+	+	+
Inválido	-	-	-	-	-

*Repetir a extração e caso o gene N permaneça negativo e o Ct do gene ORF1ab seja igual ou inferior a 30 a interpretação é detectável para SARS-CoV-2.

**Repetir a extração e caso o gene ORF1ab permaneça negativo a interpretação é não detectável para SARS-CoV-2.

Anexo XIV- Perfil térmico da reação de RT-PCR do kit Qiagen.

Etapas	Nº de ciclos	Temperatura	Duração
1	1	25 °C	2 minutos
2	1	50 °C	10 minutos
3	1	95 °C	2 minutos
4	40	95 °C	5 segundos
5		58 °C	30 segundos

Anexo XV- Interpretação de resultados do kit QIA Prep&Amp.

Interpretação dos Resultados			
Gene RdRP (N1N2)	RNA IC (Controle Interno)	HS IC (Controle de Amostragem)	Interpretação
+	+	+	Detectável para SARS-CoV-2
+	+	-	Detectável para SARS-CoV-2
+	-	-	Detectável para SARS-CoV-2
+	-	+	Detectável para SARS-CoV-2
-	+	+	Não detectável para SARS-CoV-2
-	+	-	Inconclusivo (Repetir teste)
-	-	+	Repetir teste
-	-	-	Repetir teste

[illegible]