



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

DANILO NOBRE DA SILVA

PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM TESTE
IMUNOENZIMÁTICO QUANTITATIVO ANTI-SARS-CoV-2

SÃO CRISTÓVÃO

2021

DANILO NOBRE DA SILVA

**PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM TESTE
IMUNOENZIMÁTICO QUANTITATIVO ANTI-SARS-CoV-2**

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

Linha de pesquisa: Desenvolvimento e controle de fármacos e medicamentos

Orientadora: Profa. Dra. Dulce Marta Schimieguel Mascarenhas Lima

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Arthur Cardoso Almeida

SÃO CRISTÓVÃO

2021

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S586p Silva, Danilo Nobre da
Padronização e validação de um teste imunoenzimático quantitativo anti-SARS-CoV-2 / Danilo Nobre da Silva ; orientadora Dulce Marta Schimieguel Mascarenhas Lima.– São Cristóvão, SE, 2021.
79 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Sergipe, 2021.

1. COVID-19 (Doença). 2. SARS (Doença). 3. Ensaio de Imunoadsorção Enzimática. I. Lima, Dulce Marta Schimieguel Mascarenhas, orient. II. Título.

CDU 615.074:578.834

DANILO NOBRE DA SILVA

**PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM TESTE
IMUNOENZIMÁTICO QUANTITATIVO ANTI-SARS-CoV-2**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Sergipe, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.

São Cristóvão, 29 de outubro de 2021.

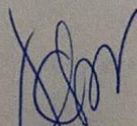
BANCA EXAMINADORA



Prof.^a. Dr.^a. Dulce Marta Schimieguel Mascarenhas Lima
Universidade Federal de Sergipe

Documento assinado digitalmente
 RAFAEL CIRO MARQUES CAVALCANTE
Data: 11/10/2022 09:23:08-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Rafael Ciro Marques Cavalcante
Universidade Federal de Sergipe



Prof. Dr. Clomar Alves dos Santos
Universidade Federal de Sergipe

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a todas as
vítimas da COVID-19 e a toda
comunidade científica brasileira.
Dedico também a toda comunidade
LGBTQIA+
É sobre representatividade!*

AGRADECIMENTOS

Toda a minha gratidão a Deus por guiar meus caminhos e me fazer seguir com fé e resiliência mundo a fora ao longo das oportunidades e desafios a mim concedidos. Agradeço pelas bênçãos e livramentos diários, pelas pessoas que estão comigo, até mesmo as que passaram pelo meu caminho, por minha saúde e por me fazer forte para chegar até esse momento tão sonhado. Minha eterna gratidão!

À toda a minha família e amigos queridos por todo suporte e incentivo por todo esse tempo de minha dedicação aos estudos, por entender todas as minhas ausências e abdições de momentos ímpares junto a vocês. Serei eternamente grato!

A minha querida orientadora *Prof^a Dr^a Dulce Marta Schimieguel Mascarenhas Lima* por toda confiança, disposição e paciência comigo por eu não ser fácil de lidar, mas principalmente sou grato por todos os seus ensinamentos e cuidados ao longo dessa minha jornada. Sou grato a Deus por tê-la colocado em meu caminho.

Expresso minha gratidão a todos os colegas, professores e profissionais do Departamento de Farmácia e demais colaboradores da Universidade Federal de Sergipe por todo o apoio que me deram ao longo da realização do meu trabalho.

Aos amigos que fiz durante a minha trajetória como mestrando do PPGCF, em especial aos colegas do EPISERGIPE, levarei sempre comigo todo o carinho recebido e cada história entre as viagens que cada um deixou em minha vida.

Aos meus colegas do Grupo de Pesquisa em Hematologia da UFS, por todo empenho em todos os experimentos e por todos os momentos compartilhados como uma grande família. Em especial a Nathanielly Lima pela amizade e parceria do início ao fim e garantir que seria “tranquilo” toda essa aventura.

À CAPES, FAPITEC-SE e CNPQ pelo auxílio financeiro que viabilizou a execução deste projeto.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para o êxito deste trabalho, minha eterna gratidão!

RESUMO

PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM TESTE IMUNOENZIMÁTICO QUANTITATIVO ANTI-SARS-CoV-2. DANILO NOBRE DA SILVA, SÃO CRISTÓVÃO, 2021.

Desde a declaração do vírus SARS-CoV-2 como responsável por causar a pandemia da COVID-19 em 2020, vários esforços foram iniciados e continuam sendo feitos para o controle, diagnóstico e manejo terapêutico. Testes imunocromatográficos e por imunofluorescência (FIA) foram desenvolvidos baseados na pesquisa qualitativa de anticorpos contra o SARS-CoV-2 e recomendados para investigar a prevalência da infecção. Porém, muitos deles apresentam baixa sensibilidade e especificidade. Entretanto, o teste sorológico quantitativo utilizado em diagnósticos de inúmeras infecções, o ensaio imunoenzimático (ELISA), apresenta alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, podendo ser este um teste mais adequado para diagnóstico, acompanhamento da evolução da COVID-19 e resposta à imunização. O objetivo desse trabalho foi padronizar e validar um ensaio imunoenzimático quantitativo *in house* para diagnóstico e acompanhamento da COVID-19. Os testes iniciais foram realizados em amostras de pacientes com COVID-19 para padronização da técnica, e posterior validação. Primeiramente, foi realizada a padronização das etapas do ensaio imunoenzimático. Depois, foram determinados a curva padrão, o *cut off*, e realizados os testes para a validação do teste. Para as análises estatísticas foi considerado o nível de significância $p < 0,05$. O *cut off* foi determinado pela média da concentração dos CN (3,59ng/mL) obtidos em março/2019, antes da COVID-19, mais dois desvios padrão. $\text{cut off} = 11,49\text{ng/mL}$. Na validação, o ensaio apresentou 53% de sensibilidade e 94% de especificidade, comparado ao FIA. Avaliando-se que o kit FIA utilizado é um teste qualitativo, foi avaliada a precisão desse ensaio sorológico por apresentar um número elevado de falsos negativos entre as amostras estudadas e considerou-se a comparação com outro teste. Foi realizada outra análise com o teste de anticorpos neutralizantes anti-RBD-S1 e resultou em 94% de sensibilidade e 91% de especificidade. A proteína N recombinante foi selecionada neste trabalho por sua elevada antigenicidade e imunogenicidade, multipotencialidade funcional, relação com a patogênese viral, e que a maioria dos testes imunoenzimáticos atualmente comercializados baseiam-se em estudos com a proteína *spike*. O ensaio imunoenzimático indireto quantitativo anti-IgG para SARS-CoV-2 *in house* é um teste tecnicamente simples e rápido, possui melhor rendimento e resultados de fácil leitura e interpretação. Contrariando a maioria dos testes sorológicos comerciais atualmente com metodologias qualitativas, este teste tem a vantagem de ser um teste quantitativo, fornecendo resultados mais robustos e com maior especificidade. A aplicação deste ensaio fornece informações importantes para o diagnóstico, manejo terapêutico e acompanhamento da recuperação dos pacientes com COVID-19 e conseqüentemente, para o planejamento do controle epidemiológico da doença. Dessa forma, o ensaio imunoenzimático quantitativo indireto foi padronizado e validado para a detecção de anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2, determinando, então, a concentração adequada do antígeno, as diluições do anticorpo primário e secundário, o *cut off* e a da curva padrão, gerando um novo teste de alta qualidade, alta sensibilidade, alta especificidade e de baixo custo.

PALAVRAS-CHAVE: SARS-CoV-2; proteína recombinante; ELISA.

ABSTRACT

STANDARDIZATION AND VALIDATION OF A QUANTITATIVE ANTI-IgG IMMUNOENZYMATIC TEST FOR SARS-CoV-2. DANILO NOBRE DA SILVA, SÃO CRISTÓVÃO, 2021.

Since the declaration of the SARS-CoV-2 virus as responsible for causing the COVID-19 pandemic in 2020, several efforts have been initiated and continue to be made towards control, diagnosis and therapeutic management. Immunochromatographic and immunofluorescence (FIA) tests were developed based on the qualitative investigation of antibodies against SARS-CoV-2 and recommended to investigate the prevalence of the infection. However, many of them have low sensitivity and specificity. However, the quantitative serological test used in the diagnosis of numerous infections, the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), has high sensitivity, specificity and reproducibility, which may be a more suitable test for diagnosis, monitoring of the evolution of COVID-19 and response to immunization. The objective of this work was to standardize and validate an in-house quantitative enzyme immunoassay for the diagnosis and follow-up of COVID-19. Initial tests were performed on samples from patients with COVID-19 to standardize the technique and later validate it. First, the standardization of the steps of the immunoenzymatic assay was carried out. Afterwards, the standard curve, the cut off, and the tests for the test validation were determined. For statistical analysis, the significance level of $p < 0.05$ was considered. The cut off was determined by the mean concentration of CN (3.59ng/mL) obtained in March/2019, before COVID-19, plus two standard deviations. cut off=11.49ng/mL. At validation, the assay had 53% sensitivity and 94% specificity compared to FIA. Considering that the FIA kit used is a qualitative test, the precision of this serological assay was evaluated because it presented a high number of false negatives among the samples studied, and a comparison with another test was considered. Another analysis was performed with the anti-RBD-S1 neutralizing antibody test and resulted in 94% sensitivity and 91% specificity. Recombinant protein N was selected in this work for its high antigenicity and immunogenicity, functional multipotentiality, relationship with viral pathogenesis, and that most immunoenzymatic tests currently marketed are based on studies with the spike protein. The in-house quantitative indirect anti-IgG immunoenzymatic assay for SARS-CoV-2 is a technically simple and fast test, with better yield and results that are easy to read and interpret. Contrary to most commercial serological tests currently with qualitative methodologies, this test has the advantage of being a quantitative test, providing more robust results and with greater specificity. The application of this assay provides important information for the diagnosis, therapeutic management and monitoring of the recovery of patients with COVID-19 and, consequently, for planning the epidemiological control of the disease. Thus, the indirect quantitative enzyme immunoassay was standardized and validated for the detection of anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies, then determining the adequate concentration of the antigen, the primary and secondary antibody dilutions, the cut off and the standard curve, generating a new test of high quality, high sensitivity, high specificity and low cost.

KEY-WORDS: *ELISA; SARS-CoV-2; recombinant protein.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura genômica do SARS-CoV e SARS-CoV-2	18
Figura 2: Proteínas da estrutura do SARS-CoV-2	19
Figura 3: Estrutura e replicação do SARS-CoV-2	20
Figura 4: ELISA direto	23
Figura 5: ELISA indireto	24
Figura 6: ELISA sanduíche	25
Figura 7: ELISA competitivo	26
Figura 8: Padronização da concentração da proteína N	36
Figura 9: Efeitos de diferentes bloqueios na redução de ligações inespecíficas	37
Figura 10: Determinação da diluição da amostra	39
Figura 11: Determinação da diluição do anticorpo secundário	40
Figura 12: Curva padrão número 2 do anticorpo secundário anti-IgG ligado à peroxidase utilizando diluição de 1/500 de anticorpo primário (pool de amostras)	42
Figura 13: Curva padrão número 3 do anticorpo secundário anti-IgG ligado à peroxidase utilizando diluição de 1/500 de anticorpo primário (pool)	43
Figura 14: Distribuição gráfica dos resultados de absorbância em duplicata obtidos no ensaio imunoenzimático quantitativo de amostras obtidas antes da pandemia com teste FIA não reagente (controle negativo)	44

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro1: Níveis de agravamento da COVID-19	17
Tabela 1: Características epidemiológicas dos pacientes testados no estudo	35
Tabela 2: Leituras das absorbâncias do ensaio imunoenzimático quantitativo para anti-SARS-CoV-2, de amostras controle positivo e negativo, utilizando 100 ng de proteína N com diferentes títulos do anticorpo primário e anticorpo secundário na diluição 1:10.000, filtro de 450 nm	38
Tabela 3: Leituras das absorbâncias obtidas na primeira curva padrão do ensaio imunoenzimático com a concentração da proteína recombinante “N” de 100 ng/poço	41
Tabela 4: Valores das absorbâncias em duplicata obtidos na terceira curva padrão do ensaio imunoenzimático na concentração de 100 ng/poço da proteína recombinante “N”, e diluições de 1/100, 1/200 e 1/500 de anticorpo primário (<i>pool</i> de amostras)	42
Tabela 5: Valores das absorbâncias obtidos na terceira curva padrão do ensaio imunoenzimático quantitativo para SARS-CoV-2 na concentração de 100 ng/poço da proteína recombinante “N”, e diluição de 1/500 de anticorpo primário (<i>pool</i> de amostras positivas para IgG anti-SARS-CoV-2)	43
Tabela 6: Valores das concentrações de amostras obtidas antes da pandemia com teste FIA não reagente (controle negativo) obtidas através do ensaio imunoenzimático quantitativo para IgG anti-SARS-CoV-2	45
Tabela 7: Sensibilidade e especificidade para IgG do ensaio imunoenzimático anti-SARS-CoV-2 x FIA	46
Tabela 8: Sensibilidade e especificidade para IgG do ensaio imunoenzimático anti-SARS-CoV-2 x anti-RBD-S1	46
Tabela 9: Total de amostras positivas e negativas para os testes de FIA, do ensaio imunoenzimático anti-SARS-CoV-2 e anti-RBD-S1	47
Tabela 10: Acurácia, VPP, VPN e razão de verossimilhança para teste positivo (RV) do ensaio imunoenzimático anti-SARS-CoV-2 x anti-RBD-S1	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2019-nCoV (2019 *novel coronavirus*)
229E (coronavírus humano 229E)
A (acurácia)
Abs (absorbância)
ANOVA (análise de variância)
Anti (anticorpo)
ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária)
BSA (*Bovine Serum Albumin*)
BVS (Biblioteca Virtual em Saúde)
 $C_6H_8O_7$ (ácido cítrico)
CCBS (Centro de Ciências Biológicas e da Saúde)
CD8+
CEP (Comitê de Ética em Pesquisa)
CHIKV (vírus Chikungunya)
CN (controle negativo)
CNS (Conselho Nacional de Saúde)
CoV (coronavírus)
COVID-19 (*coronavirus disease 2019*)
CP (controle positivo)
Cut off (limiar de reatividade)
DENV (dengue vírus)
DFA (Departamento de Farmácia)
Dp (desvio padrão)
E (especificidade)
E. coli (*Escherichia coli*)
ECA 2 (enzima conversora de angiotensina 2)
ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)
EpiSERGIPE (Evolução da Prevalência de Infecção por COVID-19 em Sergipe)
FIA (imunofluorescência)
FN (falso negativo)
FP (falso positivo)

gold standard (padrão ouro)

GSCF

H₂O₂ (peróxido de hidrogênio)

H₂SO₄ (ácido sulfúrico)

Hematox (Laboratório de Hematologia e Toxicologia)

his-tag (poli-histidina)

HKU1 (coronavírus humano HKU1)

ICB (Instituto de Ciências Biomédicas)

IgA (imunoglobulina A)

IgG (imunoglobulina G)

IgM (imunoglobulina M)

IL (interleucina)

IP10

LACEN/SE (Laboratório Central de Saúde Pública de Sergipe)

likelihood ratio (razão de verossimilhança para teste positivo)

M (média)

MCP1

MERS-CoV (*Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*)

MIP1A

mRNA (RNA mensageiro)

Na₂HPO₄ (fosfato de sódio)

Nc (porção C-terminal do SARS-CoV-2)

NES (*nuclear export signs*)

NL63 (coronavírus humano NL63)

NLS (*nuclear location signal*)

NSP (*nonstructural protein*)

OC43 (coronavírus humano OC43)

OMS (Organização Mundial da Saúde)

OPD (*ortho phenylenediamine*)

ORF (*open reading frame*)

ORF3b

PBS (*Phosphate Buffered Saline*)

Perox (peroxidase)

Pp (poliproteínas)

Proteína E (proteína de envelope)
Proteína M (glicoproteína de membrana)
Proteína N (proteína de nucleocapsídeo)
Proteína S (proteína *spike*)
R (índice de correlação entre os dados)
RBD-S1
RDC ()
RE (retículo endoplasmático)
RNA (*ribonucleic acid*)
RNP (ribonucleoproteína)
RT-PCR (*real-time polymerase chain reaction*)
RV (razão de verossimilhança para teste positivo)
S (sensibilidade)
SARS-CoV (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*)
SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*)
SBPCML (Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial)
SDRA (síndrome do desconforto respiratório agudo)
SES (Secretaria de Estado da Saúde)
TCLE (termo de consentimento livre e esclarecido)
TMPRSS2 (*transmembrane protease, serine 2*)
TNF α
UFS (Universidade Federal de Sergipe)
USP (Universidade de São Paulo)
UTI (unidade de terapia intensiva)
UTR (*untranslated region*)
VN (valor negativo)
VP (valor positivo)
VPN (valor preditivo negativo)
VPP (valor preditivo positivo)
WHO (World Health Organization)
ZIKV (zika vírus)
 β -coronavírus (betacoronavírus)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	COVID-19 e coronavírus	18
2.2	Proteína de nucleocapsídeo do coronavírus	23
2.3	Métodos diagnósticos: ensaio imunoenzimático (ELISA)	24
2.4	Padronização e validação de um teste	29
3	OBJETIVOS	31
3.1	Objetivo Geral	31
3.2	Objetivos Específicos	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1	Locais de estudo, aspectos éticos e obtenção das amostras	32
4.2	Obtenção da proteína recombinante “N”	33
4.3	Padronização do ensaio imunoenzimático quantitativo indireto para detecção de anti-IgG do SARS-CoV-2	33
4.4	Determinação do <i>cut off</i> e da curva padrão do ensaio	34
4.5	Validação do ensaio imunoenzimático quantitativo indireto para detecção de anti-IgG do SARS-CoV-2	35
4.6	Análises estatísticas	36
5	RESULTADOS	37
5.1	Características das amostras obtidas	37
5.2	Determinação da concentração do antígeno e bloqueio da sensibilização	38
5.3	Determinação da diluição da amostra	40
5.4	Determinação da diluição anticorpo secundário e curva padrão	42
5.5	Determinação do <i>cut off</i>	46
5.6	Validação do ensaio imunoenzimático quantitativo indireto para detecção de anti-IgG do SARS-CoV-2	48
5.6.1	Análise da sensibilidade e especificidade	48
5.6.2	Acurácia, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e razão de verossimilhança	49
5.6.3	Reação cruzada SARS-CoV-2, dengue, zika e chikungunya	50

6	DISCUSSÃO	51
7	CONCLUSÕES	55
	REFERÊNCIAS	56
	APÊNDICES	62
	Apêndice A: termo de consentimento livre e esclarecido – TCLE	63
	Apêndice B: preparo do reagente colorimétrico para revelação (ensaio imunoenzimático)	65
	Apêndice C: Bula do ensaio imunoenzimático	66
	Material suplementar: Tabelas	68
	ANEXOS	71
	Anexo A: parecer do comitê de ética em pesquisa (EPISERGIPE)	72
	Anexo B: TCLE e parecer do comitê de ética e pesquisa (EFEITOS DO TREINAMENTO FUNCIONAL EM IDOSAS COM SOBREPESO)	74

1. INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus SARS-CoV-2 (*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*), causador da COVID-19 (*coronavirus disease 19*), desencadeia manifestações clínicas heterogêneas, caracterizadas principalmente por acometimento pulmonar com febre, tosse seca e dificuldade respiratória, e pode causar danos aos demais órgãos e sistemas. Essas manifestações clínicas são semelhantes às de outras infecções virais, sendo necessário um diagnóstico diferencial preciso (WANG et al., 2020).

O teste padrão ouro para diagnóstico da COVID-19 é a reação em cadeia da polimerase em tempo real (*real-time polymerase chain reaction – RT-PCR*) que detecta o material genético do vírus, sendo indicado para um diagnóstico precoce realizado nos primeiros dias após a infecção. Os testes imunocromatográficos e sorológicos por sua vez, são baseados na pesquisa de anticorpos e recomendados para investigar a prevalência da infecção e acompanhamento da evolução da resposta imune, sendo menos sensíveis nos primeiros dias de sintomas comparados ao RT-PCR. Estes métodos diagnósticos podem apresentar interferentes nas análises para detectar os anticorpos contra o SARS-CoV-2, como por exemplo, a reatividade cruzada com outros anticorpos (YAN et al., 2020). Desde o início da pandemia da COVID-19 foram desenvolvidos diversos testes diagnósticos qualitativos e quantitativos empregando as metodologias de imunocromatografia, imunofluorescência e quimioluminescência, muitos deles apresentando baixa especificidade e sensibilidade (YUCE; FILIZTEKIN; OZKAYA, 2021).

Em contrapartida, a metodologia do ensaio imunoenzimático ELISA, utilizada desde a década de 1970 em inúmeros exames de diagnóstico rotineiro de infecções virais, bacterianas e por protozoários, apresenta uma alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, podendo ser utilizada em larga escala durante situações emergenciais de epidemias e pandemias. Esta metodologia pode empregar ferramentas biotecnológicas como as proteínas recombinantes, podendo ser antígenos ou anticorpos primários e secundários com potencial antigênico. Nos últimos meses, diversos esforços foram feitos para o desenvolvimento de antígenos recombinantes que possam ser utilizados tanto no diagnóstico quanto na produção de vacinas da COVID-19. Entre esses antígenos estão as proteínas recombinantes do SARS-CoV-2, com as proteínas “S”, “M” e “N” (VAZ et al., 2018; AMANAT et al.,

2020). A proteína N está relacionada com a replicação e transcrição do RNA viral, formação e manutenção do complexo ribonucleoproteína (RNP), regulação do ciclo celular e na interação vírus-hospedeiro (LAN et al., 2020; McBRIDE; ZYL; FIELDING, 2014).

A partir da construção dessas proteínas recombinantes, novos métodos diagnósticos rápidos e confiáveis que possam ser utilizados na redução da taxa de transmissão e no curso da COVID-19, começaram a ser desenvolvidos. Dentre eles, estão os imunoenaios *in house* como uma alternativa por serem tecnicamente mais simples, de baixo custo e mais rápidos, além de possuir melhor rendimento pela possibilidade de ser um teste quantitativo e com resultados de fácil leitura, interpretação e de maior qualidade. Neste contexto, este trabalho teve o objetivo de padronizar e validar um ensaio imunoenzimático quantitativo, como forma de auxiliar no diagnóstico em grande escala e detecção da prevalência da COVID-19.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 COVID-19 E CORONAVÍRUS

A infecção pelo novo coronavírus foi declarada em 11 de março de 2020 pela Organização Mundial da Saúde como pandemia, denominada COVID-19 e, desde então, é uma crise mundial de saúde pública (WHO, 2020). No mundo, até 1 de outubro de 2021, o número de infectados excedeu 234 milhões de pessoas, resultando em 4.800.375 mortes. No Brasil, cerca de 21.459.117 casos e 597 mil mortes, e em Sergipe, foram 278 mil infecções e 6.010 óbitos (WHO, 2021; BRASIL, 2021).

A mortalidade da COVID-19 pode ser considerada baixa, em torno de 0,6%. Porém, os idosos (15%) e pessoas com comorbidades, como diabetes e hipertensão, apresentam maior risco de mortalidade do que as pessoas mais jovens e sem comorbidades, possivelmente devido a alterações nos receptores da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA 2) (WILSON, 2020; MORLEY; VELLAS, 2020).

A COVID-19 apresenta manifestações clínicas heterogêneas, abrangendo um amplo espectro e de diferentes níveis de agravamento (quadro 1), que varia de um curso assintomático a uma síndrome do desconforto respiratório agudo com alto risco de morte. É caracterizada principalmente por febre, tosse seca, fadiga, falta de ar, dor muscular, confusão, dor de cabeça, dor de garganta, rinorréia, dor no peito, diarreia, náusea, vômito, calafrios, produção de expectoração, hemoptise, dispneia, pneumonia bilateral, anorexia, anosmia, ageusia, leucopenia, linfopenia, distúrbios olfatórios e do paladar, e níveis mais elevados de citocinas plasmáticas (IL2, IL7, IL10, GSCF, IP10, MCP1, MIP1A e TNF α) principalmente em pacientes de internados em unidade de terapia intensiva (UTI) (WANG et al., 2020).

Frequentemente, pode causar danos pulmonares e danos ao trato gastrointestinal, fígado e ao sistema nervoso, entre outros órgãos e sistemas. Algumas manifestações clínicas são semelhantes às de outras infecções virais, sendo sempre necessário um diagnóstico diferencial para melhor controle e manejo da doença. Os pacientes geralmente apresentam linfopenia, aumento de proteína C reativa, desidrogenase láctica e ferritina, diminuição de procalcitonina, elevados níveis de interleucina-6 e uma contagem reduzida de linfócitos T CD8+ (LIU et al., 2020).

Quadro 1: Níveis de agravamento da COVID-19

Leve	Febre, tosse, fadiga, opacidades pulmonares em vidro fosco , sem pneumonia ou pneumonia leve.
Grave	Dispneia, saturação de oxigênio no sangue $\leq 93\%$, frequência respiratória $\geq 30/\text{min}$, relação pressão parcial de oxigênio arterial e fração de oxigênio inspirado < 300 e/ou infiltrados pulmonares $> 50\%$ em 24 a 48 h, (UTI necessária).
Crítico	Síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), insuficiência respiratória, choque séptico e/ou disfunção ou falência de múltiplos órgãos, coagulação, acidose metabólica de difícil correção, choque séptico.

Fonte: adaptado e traduzido de WANG et al., 2020.

Os coronavírus (CoV) pertencem à família Coronaviridae sob a ordem Nidovirales, que pode ser subdividida em quatro gêneros principais: α , β , γ e δ . O novo coronavírus, designado inicialmente como 2019-nCoV, e, posteriormente SARS-CoV-2, é o sétimo membro da família pertencente aos β -coronavírus e teve seu primeiro surto em dezembro de 2019 em Wuhan, China. Os primeiros pacientes infectados foram visitantes frequentes do “Mercado Atacadista de Frutos do Mar” de Huanan no distrito de Jianghan, onde frutos do mar, morcegos, galinhas, faisões e outros animais frescos eram vendidos, presumindo-se inicialmente estar associado a uma doença zoonótica (JALAVA, 2020; ZHENG, 2020).

Entre os seis coronavírus, quatro espécies (229E, OC43, NL63 e HKU1) foram consideradas levemente patogênicas, enquanto as outras duas espécies, SARS-CoV (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*) e MERS-CoV (*Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*) foram altamente patogênicas em humanos imunocomprometidos (CUI; LI; SHI, 2019).

No início da epidemia de pneumonia em Wuhan, os cientistas obtiveram as sequências completas do genoma de cinco pacientes infectados com SARS-CoV-2. Essas sequências do genoma compartilham 79,5% de identidade de sequência com o SARS-CoV. Obviamente, o SARS-CoV-2 é divergente do SARS-CoV e, com isso, cientistas alinharam a sequência completa do genoma do SARS-CoV-2 a outros genomas disponíveis de betacoronavírus (LAI et al., 2020; ZHANG et al., 2020).

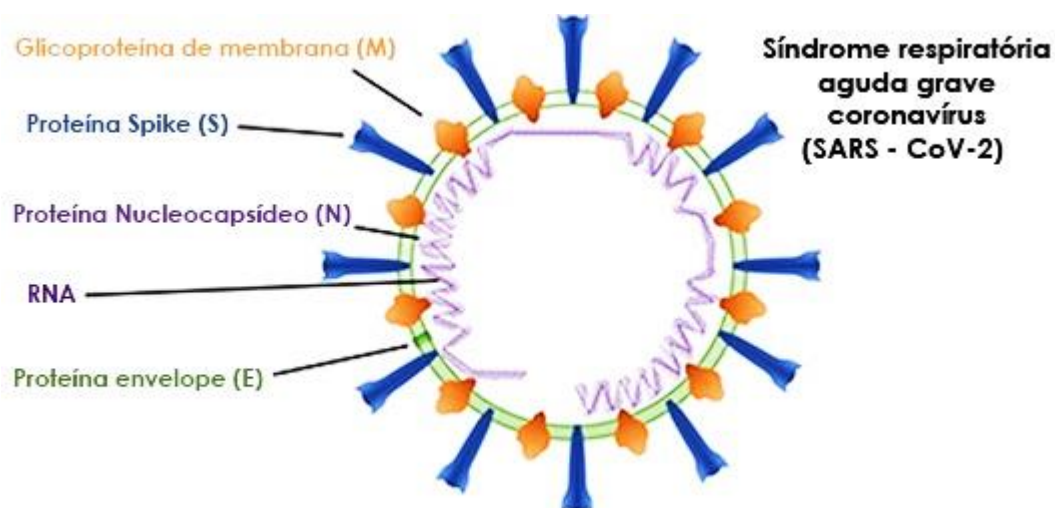
Figura 1: Estrutura genômica do SARS-CoV e SARS-CoV-2



O genoma dos CoV compreende a região não traduzida 5' e 3' (UTR) e a estrutura de leitura aberta (ORF) 1a / b (caixas azuis). Os genes estruturais presentes no terminal 3' codificam as proteínas estruturais, sendo a *spike* (S; caixas brancas), envelope (E; caixas amarelas), membrana (M; caixas vermelhas) e nucleocapsídeo (N; caixas verdes), que são preservadas em todos os CoV. Além disso, os genes acessórios intercalados entre os genes estruturais codificam as proteínas acessórias. Não há diferença notável na ORF1 entre eles, mas ela codifica proteínas não estruturais (NSP) de comprimentos diferentes e há uma distinção entre os genes acessórios. A linha pontilhada marcada em vermelho mostra uma variação notável entre o SARS-CoV-2 e o SARS-CoV. Fonte: KADAM et al., 2021.

De forma geral, o genoma dos coronavírus (Figura 1) é um RNA de fita simples de sentido positivo que é maior do que qualquer outro vírus de RNA (27–32 kb). A proteína do nucleocapsídeo (N) forma o capsídeo fora do genoma e o genoma é ainda embalado por um envelope que está associado a três proteínas estruturais: proteína de membrana (M), proteína *spike* (S) e proteína de envelope (E) (BRIAN; BARIC, 2005). Assim como os outros membros da família dos coronavírus, o SARS-CoV-2 contém quatro proteínas estruturais (S, E, M e N) (Figura 2), sendo que possui dezesseis proteínas não estruturais (*nonstructural proteins*, nsp1–16) e o tamanho do genoma do SARS-CoV-2 que foi sequenciado recentemente é de aproximadamente 29,9 kb. (LU et al., 2020).

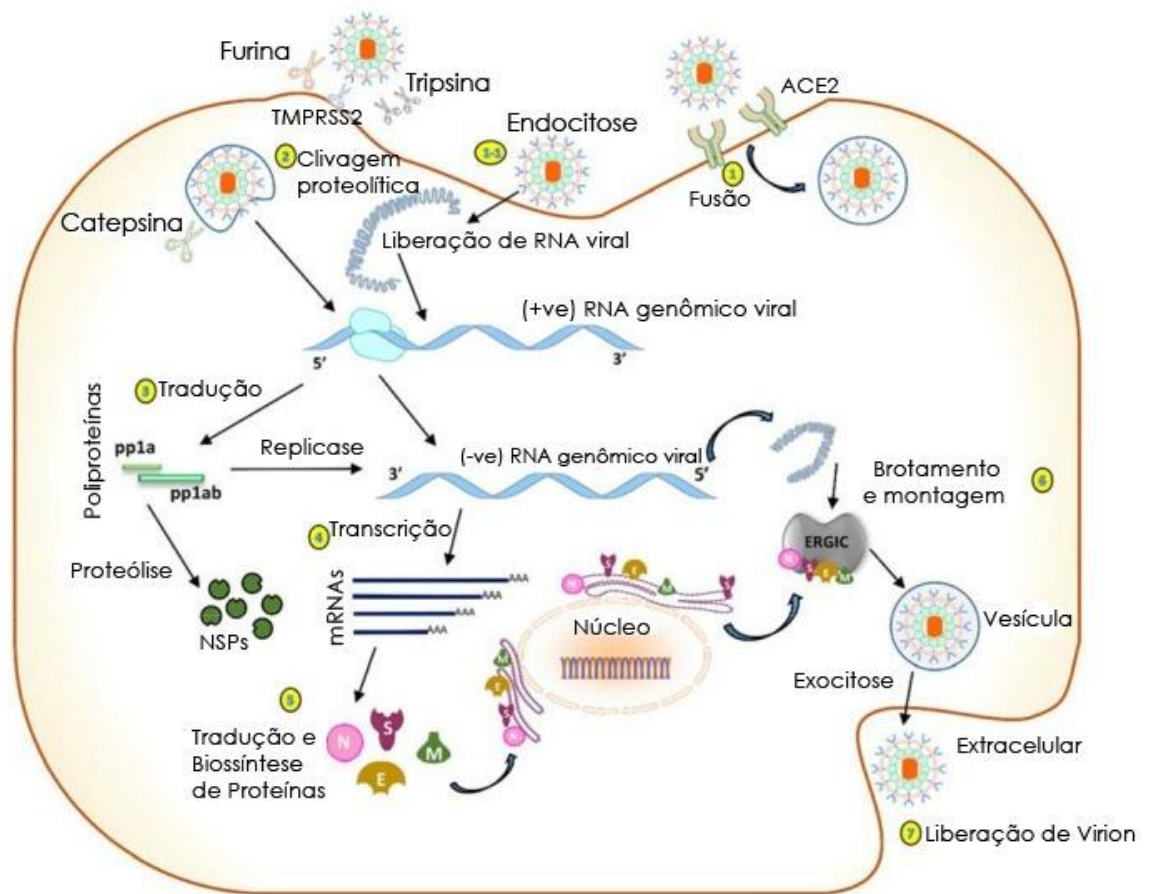
Figura 2: Proteínas da estrutura do SARS-CoV-2



Fonte: Adaptado de KANG et al., 2020.

A Figura 3 mostra a estrutura viral, a sua entrada na célula hospedeira e a replicação do SARS-CoV-2. A infecção pelo SARS-CoV-2 começa com a ligação da proteína *spike* ao receptor ACE2 e o processo de invasão é desencadeado por proteases da célula hospedeira (furina, tripsina, TMPRSS2 e catepsina). O SARS-CoV-2 libera RNA na célula hospedeira, e o RNA é traduzido em poliproteínas de replicase viral pp1a e pp1ab e subsequentemente cliva em proteínas não estruturais (NSP). As cópias de RNA de fita negativa de comprimento total do genoma viral são produzidas pela enzima replicase usando o genoma de RNA de fita positiva de comprimento total como molde. Durante a transcrição, a RNA polimerase produz uma série de mRNAs subgenômicos e se traduz nas proteínas virais (S, E, N e M). As proteínas virais e o RNA do genoma são montados em vírions no complexo de Golgi e no retículo endoplasmático (RE), que estão brotando em ERGIC (compartimento intermediário RE-Golgi) e liberados para fora da célula por meio de vesículas (YESUDHAS; SRIVASTAVA; GROMIHA, 2020). Como a entrada do coronavírus nas células hospedeiras é mediada pela proteína S, e essa forma homotrímeros que se projetam da superfície viral. Logo, a proteína S é crítica para a entrada dos coronavírus e, portanto, é um alvo antiviral atraente (LI, 2016).

Figura 3: Estrutura e replicação do SARS-CoV-2



Fonte: Adaptado e traduzido de YESUDHAS; SRIVASTAVA; GROMIHA, 2020.

2.2 PROTEÍNA DE NUCLEOCAPSÍDEO DO CORONAVÍRUS

A proteína de nucleocapsídeo do coronavírus (proteína N) é uma proteína estrutural com aproximadamente 90% de similaridade com a sequência de aminoácidos da proteína N do SARS-CoV. O nucleocapsídeo protege o genoma e garante sua replicação e transmissão, forma complexos com o RNA genômico, interage com a proteína da membrana viral durante a montagem do vírion e desempenha um papel crítico no aumento da eficiência da transcrição e montagem do vírus (KANG et al., 2020; McBRIDE; ZYL; FIELDING, 2014).

Estudos recentes confirmaram que a proteína N é uma proteína multifuncional. As funções da proteína N incluem replicação e transcrição do RNA viral, formação e manutenção do complexo ribonucleoproteína (RNP) (LAN et al., 2020). Além disso, também é relatado que a proteína N está envolvida na interação vírus-hospedeiro. Ela regula o ciclo celular do hospedeiro, incluindo apoptose, para facilitar a multiplicação e disseminação do vírus (McBRIDE; ZYL; FIELDING, 2014). Muito recentemente, três sinais de localização nuclear (NLS1-NLS3) e dois sinais de exportação nuclear (NES1 e NES2) são relatados na proteína N do SARS-CoV-2 que supostamente desempenham um papel crucial na montagem da proteína viral (KUMAR et al., 2020).

A proteína N desempenha um papel importante na patogênese viral. Os coronavírus parecem ter desenvolvido mecanismos para superar a resposta imune inata do hospedeiro, incluindo a resposta do interferon, um dos principais componentes da imunidade inata. As células infectadas com o SARS-CoV não permitem a produção de interferon e, portanto, parece provável que o SARS-CoV, como muitos outros vírus, desenvolveu mecanismos para subverter a resposta do interferon (SPIEGEL et al., 2005). A proteína N do SARS-CoV é um dos três antagonistas do interferon β (IF β), junto ao ORF3b e ORF6 (KOPECKY-BROMBERG et al., 2007), pois inibe a síntese do interferon tipo 1. Logo, esta inibição da resposta do interferon provavelmente contribui para a patogênese viral (LU et al., 2011).

A imunogenicidade da proteína N é extremamente relevante e pode causar uma resposta de anticorpos dominada pela imunoglobulina G (IgG), altamente restrita, que é direcionada mais frequentemente e predominantemente ao nucleocapsídeo (LEUNG et al., 2004; McBRIDE; ZYL; FIELDING, 2014).

Em uma pesquisa direcionada ao diagnóstico e à triagem de outros coronavírus, anticorpos policlonais de coelho demonstraram maior imunorreatividade para algumas regiões da proteína N em amostras de soro, destacando-a como uma forte candidata para uso em projetos de ferramentas de diagnóstico dos coronavírus (LIANG et al., 2013).

Apesar de alguns estudos, a maneira pela qual as proteínas do coronavírus desempenham seus papéis durante o ciclo de vida viral ainda não é claramente compreendida. Entretanto, a compreensão do papel da proteína N na infecção pelo coronavírus pode oferecer uma visão sobre o desenvolvimento de novas ferramentas antivirais que visam às interações entre as proteínas da célula do hospedeiro e as proteínas virais que podem ser potencialmente usadas para combater a ameaça representada pelo novo coronavírus (LEUNG et al., 2004; LIANG et al., 2013).

2.3 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS: ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

Desde a descoberta do SARS-CoV-2, causador da COVID-19, tem sido promissora a procura por novos métodos diagnósticos rápidos e confiáveis que possam ser utilizados em seu diagnóstico com o objetivo de reduzir a taxa de transmissão do vírus e o curso da pandemia.

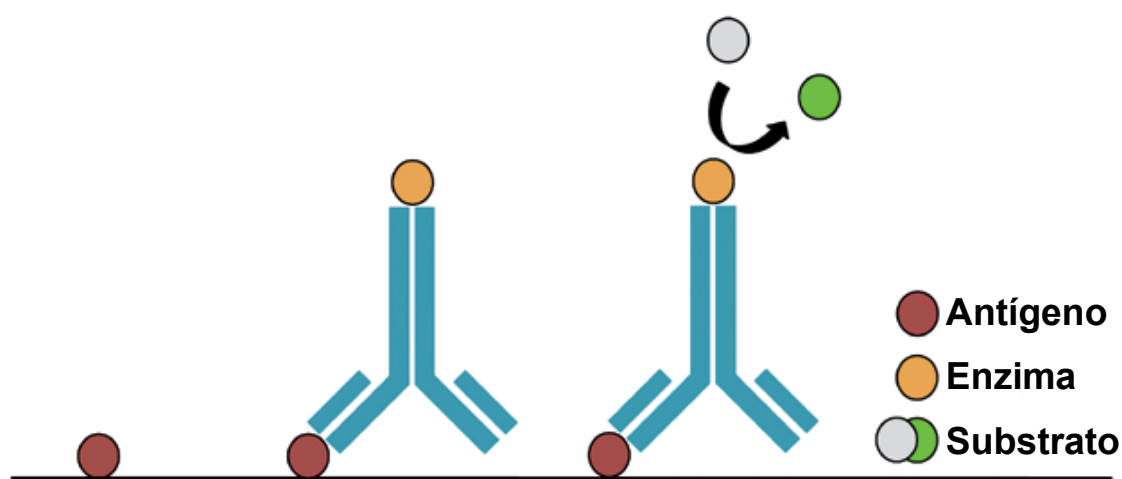
Dentre os métodos diagnósticos utilizados atualmente, estão inseridos os ensaios imunoenzimáticos. Estas técnicas permitem medidas quantitativas diretas da interação antígeno-anticorpo por medida de atividade enzimática sobre um substrato. Esses métodos têm substituído os outros devido a sua melhor sensibilidade, especificidade, estabilidade dos reagentes e sua variedade de sistemas de detecção (VAZ et al., 2018).

O ensaio de imunoabsorção enzimática ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) é o método imunoenzimático mais comum para analisar as concentrações de proteínas/peptídeos em fluidos biológicos para mostrar reações antígeno-anticorpo para auxiliar no diagnóstico e monitoramento de diversas doenças (AYDIN, 2015).

ELISA direto

A técnica pioneira para os outros tipos de ELISA foi desenvolvida simultaneamente em 1971 por Eva Engvall e Peter Perlmann e por Bauke Van Weemen e Anton Schuurs. O ELISA direto é capaz de determinar a quantidade de antígenos de alto peso molecular. Para realizá-la, a superfície da placa é revestida diretamente com o anticorpo ou antígeno. Um anticorpo ou antígeno marcado com enzima permite a medição certa. A incubação é seguida por uma lavagem que remove os antígenos ou anticorpos não ligados do meio. Então o substrato apropriado é adicionado ao meio para produzir uma reação vista através da coloração. A reação é medida para determinar a quantidade de antígeno ou anticorpo (AYDIN, 2015; ENGVALL; PERLMANN, 1971; VAN WEEMEN; SCHUURS, 1971).

Figura 4: ELISA direto



Fonte: Adaptado e traduzido de Shah; Maghsoudlou, 2016.

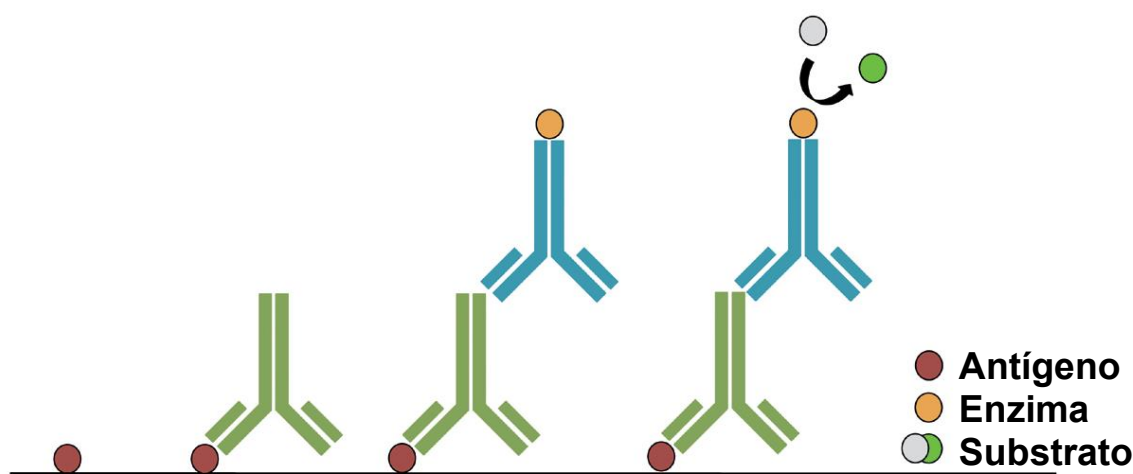
O antígeno adsorvido à fase sólida reage diretamente com um anticorpo, específico para o antígeno, ligado a uma enzima, formando um complexo insolúvel. Essa prova é utilizada para detecção de antígenos, entretanto, é um ensaio pobre para pesquisar antígenos brutos. É útil para proceder à titulação de anticorpos conjugados às enzimas marcadas utilizando antígenos purificados (DANTAS, 2004; MADRUGA et al., 2001). No ELISA direto utiliza-se a IgG e o conjugado produzido em apenas uma espécie animal, e requer um IgG e seu respectivo conjugado, para

cada vírus a ser detectado, e o que o torna mais caro (ALMEIDA; LIMA, 2001; DANTAS, 2004).

ELISA indireto

Para o ELISA indireto, o antígeno de interesse é fixado na placa por absorção passiva e uma solução de bloqueio é adicionada para saturar todos os locais não ligados nos poços, seguido de uma incubação com um anticorpo primário. Então, adiciona-se um anticorpo secundário ligado a uma enzima (geralmente ligado a peroxidase) para se ligar ao anticorpo primário. O substrato produz uma coloração e sua intensidade é mensurada (LIN, 2015).

Figura 5: ELISA indireto



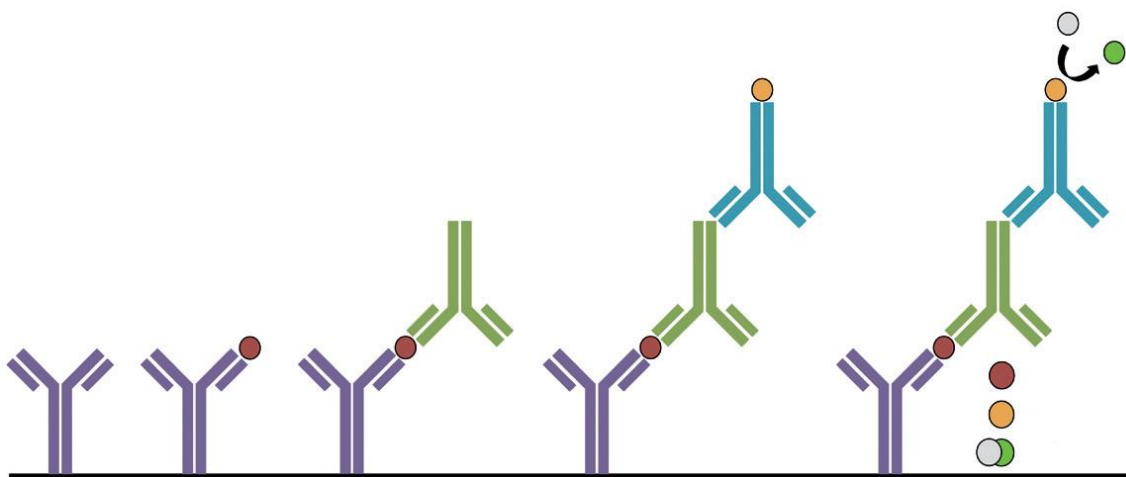
Fonte: Adaptado e traduzido de Shah; Maghsoudlou, 2016.

É um ensaio amplamente utilizado para a detecção e/ou quantificação de anticorpos em amostras de soro, com destaque em estudos soroepidemiológicos. A especificidade dessa prova é garantida principalmente pela qualidade do antígeno adsorvido à placa (MADRUGA et al., 2001). Neste utilizam-se duas IgG, uma para reconhecer o antígeno e outra (anti-IgG) produzida em diferentes espécies de animal que reconhece a primeira IgG, com a qual se ligará (ALMEIDA; LIMA, 2001; DANTAS, 2004).

ELISA sanduíche

A técnica foi desenvolvida em 1977 por Kato e colaboradores. Neste método ELISA, os poços são revestidos com um anticorpo e um bloqueio. A amostra é adicionada aos poços da microplaca revestida com o anticorpo; então, a placa é incubada por algum tempo e lavada. A lavagem remove os antígenos não ligados. Quando o antígeno específico para o anticorpo ligado é encontrado, esses antígenos não podem ser removidos. Após a etapa de lavagem, os anticorpos que são marcados com a enzima específica para o antígeno são adicionados e incubados. Após a incubação e lavagem, se houver antígenos no meio, estes não podem ser removidos porque os anticorpos estão ligados a eles. A fim de revelar a atividade enzimática, um substrato de enzima é adicionado ao meio e a coloração é aparente. A coloração mostra um resultado positivo, enquanto a falta de coloração indica falta de enzimas ou um resultado negativo. Como a proteína relevante está presa entre duas moléculas de anticorpo, este método é chamado de ELISA sanduíche. O ELISA sanduíche foi relatado como 2 a 5 vezes mais sensível do que todos os outros tipos (AYDIN, 2015; KATO et al., 1977).

Figura 6: ELISA sanduíche



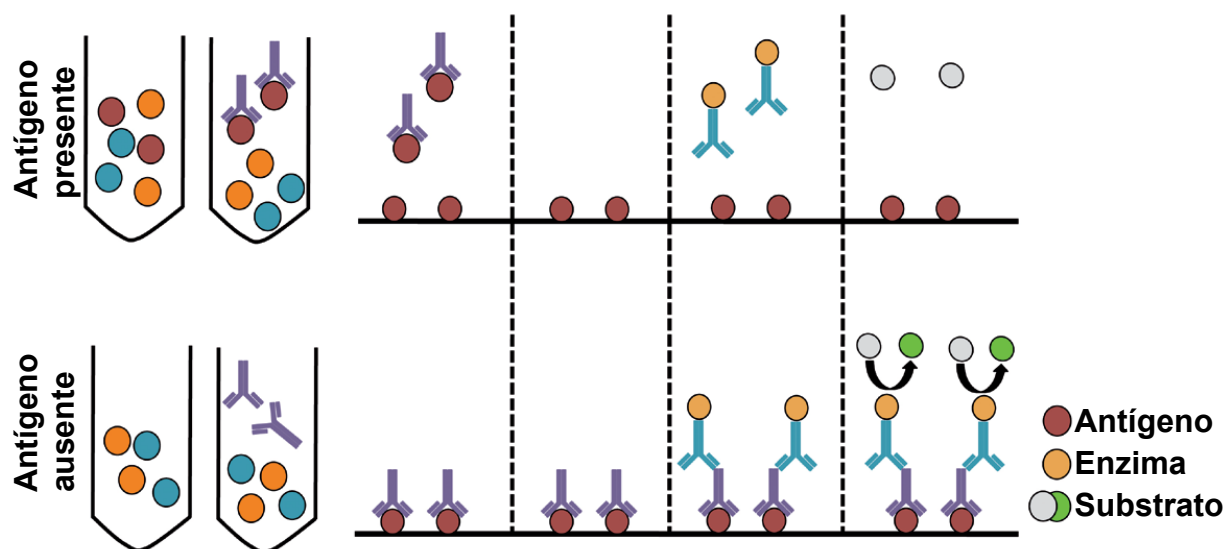
Fonte: Adaptado e traduzido de Shah; Maghsoudlou, 2016.

O ELISA duplo sanduíche é utilizado para detectar antígenos. Envolve primeiramente o revestimento de placas de poliestireno com anticorpos de captura. Acrescenta-se então a solução de antígenos, de forma que o antígeno se conjuge com o anticorpo de captura. Isso é seguido, após uma lavagem, pela adição de um

anticorpo específico, uma antiglobulina marcada com enzima e um substrato. Neste teste, a intensidade da reação de cor se relaciona diretamente com a quantidade de antígeno conjugado (DANTAS, 2004; TIZARD, 1998).

ELISA competitivo

Figura 7: ELISA competitivo



Fonte: Adaptado e traduzido de Shah; Maghsoudlou, 2016.

A técnica foi desenvolvida em 1976 por Yorde e colaboradores. Neste método, a superfície dos poços é revestida com o anticorpo específico do antígeno ou antígeno específico do anticorpo. A amostra a ser medida e o antígeno ou anticorpo marcado com enzima são colocados no poço simultaneamente. O antígeno marcado e não marcado (antígeno do paciente) ou moléculas de anticorpo competem uns com os outros para se ligar ao anticorpo ou antígeno nos poços. Após a lavagem dos poços e adição do substrato enzimático, a coloração resultante permite quantificar a concentração. Existe uma proporção inversa entre a concentração do analito e a intensidade da coloração resultante. Em outras palavras, quando a quantidade do antígeno ou do anticorpo analisado no soro é baixa, obtém-se alta absorbância, enquanto quantidades maiores produzem baixa absorbância (YORDE et al., 1976).

Entre as principais vantagens do ELISA estão a estabilidade e o pequeno volume de reagentes, resultados de natureza quantitativa, possibilidade de rápida execução diagnóstica, apresenta baixo nível de risco biológico, e pode ser também usada para estudos epidemiológicos, dentre outras vantagens (DANTAS, 2004; TIZARD, 1998).

Imunoensaios *in house*

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, de acordo com a RDC nº 302 de 13 de outubro de 2005, define a metodologia *in house* como reagentes ou sistemas analíticos produzidos e validados pelo próprio laboratório clínico, exclusivamente para uso próprio, em pesquisa ou em apoio diagnóstico, devendo ser documentado, no mínimo, todas as etapas descritas do procedimento, as especificações dos insumos, reagentes e equipamentos, além da validação desse método (BRASIL, 2005).

Os ensaios denominados *in house* são aqueles desenvolvidos em laboratórios de pesquisa, sendo que cada grupo de pesquisadores utiliza técnicas e protocolos diferentes para sua execução. Devido ao tempo e custo relativamente baixos e a facilidade de execução, os ensaios *in house* têm se destacados nesses aspectos em relação aos *kits* disponíveis no mercado para aplicação aos inúmeros tipos de doenças (FONSECA-COSTA et al., 2003).

2.4 PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM TESTE

Para a padronização e validação de um teste, torna-se necessário a realização de um estudo amplo onde o mesmo é comparado a um teste de referência em conjunto a um número expressivo populacional significativo para determinar a prevalência da doença utilizando esse teste, além de parâmetros estatísticos descritivos como a sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade, reação cruzada, acurácia, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e razão de verossimilhança (*likelihood ratio*) (FLETCHER; FLETCHER, 2006; SOARES et al., 2007).

A sensibilidade indica a capacidade de um teste detectar corretamente as

peessoas com a doença/condição, enquanto que a especificidade indica a capacidade de um teste excluir corretamente as pessoas sem a doença/condição (GREENBERG, 2005; SOARES et al., 2007).

A acurácia (A) avalia a proporção de todos os testes corretos (verdadeiros positivos e verdadeiros negativos), sobre todos os resultados obtidos. O Valor preditivo positivo (VPP) indica qual a probabilidade de uma pessoa com teste positivo realmente tenha a condição. Já o valor preditivo negativo (VPN) indica qual a probabilidade de uma pessoa com teste negativo realmente não tenha a condição (FLETCHER; FLETCHER, 2006).

Por fim, a razão de verossimilhança para teste positivo (*likelihood ratio*), indica qual é a probabilidade de encontrarmos um teste positivo em uma pessoa com a doença, comparado a uma pessoa sem a doença. Neste caso, o resultado pode variar de 1 ao infinito e quanto mais próximo de zero, maior é a probabilidade do teste ser positivo para pessoas doentes e não doentes ser a mesma, mostrando sua inutilidade. Se superior a 1, indica uma alta probabilidade que o teste seja positivo apenas para pessoas doentes. Se a probabilidade for infinita, indica que o teste só é positivo para essas pessoas (FLETCHER; FLETCHER, 2006; SOARES et al., 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar e validar um ensaio imunoenzimático quantitativo indireto para diagnóstico e acompanhamento da COVID-19.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração adequada do antígeno (proteína N) para a sensibilização das microplacas, a diluição do anticorpo primário e concentração do anticorpo secundário do ensaio imunoenzimático;
- Estabelecer o limiar de reatividade (*Cut off*) e curva padrão a ser utilizada no ensaio;
- Validar o ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos IgG anti-SARS-COV-2.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Locais de estudo, aspectos éticos e obtenção das amostras

Este estudo faz parte do Projeto em andamento “Evolução da Prevalência de Infecção por COVID-19 em Sergipe – EpiSERGIPE” aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Sergipe sob parecer de número **4.645.771** (Anexo A), atendendo aos dispositivos legais estabelecidos pelo Conselho Nacional de Saúde (Resolução CNS 466/12), e foi realizado no Laboratório de Hematologia e Toxicologia (Hematox) do Departamento de Farmácia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Sergipe Campus São Cristóvão (DFA/CCBS/UFS).

As amostras de soro foram obtidas através da soroteca do projeto EpiSERGIPE. Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice A) foram coletadas cerca de 5 mL de amostras de sangue periférico obtidas por punção venosa de cada participante da pesquisa com teste imunocromatográfico positivo (teste rápido) para realização das análises sorológicas.

Para o ensaio imunoenzimático, as amostras em que foram detectados os anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2, pela técnica de imunofluorescência (FIA), foram utilizadas como controle positivo. Para o controle negativo, foram utilizadas amostras de soro da soroteca de outro projeto de pesquisa associado ao laboratório Hematox, denominado “EFEITOS DO TREINAMENTO FUNCIONAL SOBRE PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E INFLAMATÓRIOS, COMPOSIÇÃO CORPORAL E FUNCIONALIDADE EM IDOSAS COM SOBREPESO”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Sergipe sob parecer de número **3.225.938** (Anexo B).

Para obtenção dos soros, as amostras de sangue periférico coletadas em tubo a vácuo sem anticoagulante foram submetidas à centrifugação de 3.500 rpm por 15 minutos para separação do soro, em seguida, distribuídos em alíquotas e armazenados a temperatura de -80°C até utilização.

A seleção dos controles positivo e negativo foi realizada por meio de Imunoensaio Fluorescente (FIA), para a determinação qualitativa de anticorpos IgG contra SARS-CoV-2 em equipamento *Ichroma*TM (Bodytech, Gangwon-do, Coreia do Sul) (Valores de referência: < 1,0 não reagente; 1,0 – 1,1 indeterminado; > 1,1 reagente. Especificidade: 92,8%. Sensibilidade: 88,8%).

4.2 Obtenção da proteína recombinante “N”

A proteína recombinante “N” do SARS-CoV-2, especificamente a porção C-terminal (Nc) produzida em *E. coli*, purificada com *his-tag* (poli-histidina) e desenhada com base na cepa de Wuhan, China, foi cedida através da empresa DELTALYS BIOTECHNOLOGY LTDA, uma *Spin-off* do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP), criada recentemente diante da necessidade de comercialização de produtos imunobiológicos proteicos aplicáveis ao desenvolvimento de diagnósticos e estudos vacinais, especializada na produção e comercialização de proteínas recombinantes produzidas em sistema procarioto e eucarioto. Todas as etapas da produção da proteína recombinante foram realizadas pela empresa.

4.3 Padronização do ensaio imunoenzimático quantitativo indireto para detecção de anti-IgG do SARS-CoV-2

No presente estudo, foi desenvolvido e padronizado um teste imunoenzimático quantitativo indireto *in house* para detecção de anticorpos IgG específicos contra a proteína N recombinante do SARS-CoV-2. Bula do teste (apêndice C).

Sensibilização das microplacas: microplacas de poliestireno de fundo chato (Global Plast®, Brasil) de 96 poços foram sensibilizadas e incubadas com 200 µL da proteína N, a partir de uma solução contendo 300 µg/mL diluída em tampão sob temperatura de 4°C por 18h ou *overnight*.

Bloqueio das ligações inespecíficas: para a etapa de bloqueio foi utilizada uma solução PBS (*Phosphate Buffered Saline*) pH 7,4 + BSA (*Bovine Serum Albumin*) (Inlab, Brasil) (avaliou-se BSA 0,5% e 2% e BSA + leite desnatado). Após o período de incubação por 2h, foi desprezado o volume contido nas microplacas e adicionado 200 µL da solução de bloqueio em cada poço. Incubou-se em estufa de secagem a 37 °C por 2 horas, armazenadas em câmaras úmidas para evitar a evaporação da solução nas microplacas. Em seguida, apenas nessa etapa, realizou-se 5 lavagens

com 200 µL de PBS. Para as demais lavagens, foi utilizado PBS/BSA + *Tween*TM 20 a 0,05% diluição 1:25.

Determinação do volume da diluição das amostras (anticorpos primários): Após o bloqueio, foram pipetados 100 µL de amostra diluída (1:25, 1:100 e 1:500) nos respectivos poços. Para o poço determinado como branco, foi adicionado apenas PBS/BSA 2%. Incubou-se a 37 °C por 90 minutos. Realizou-se o cálculo do volume necessário das amostras de acordo com a quantidade de poços e diluições.

Determinação da concentração do anticorpo secundário: Anticorpos anti-IgG humana conjugados à peroxidase (Sigma-Aldrich®, Missouri, EUA) foram utilizados em diferentes títulos de diluições em PBS+BSA. Após a incubação, desprezou-se todo o volume e lavou-se 5 vezes com solução de lavagem. Pipetou-se 100 µL da solução de diluição em seus respectivos poços. A microplaca foi incubada a 37 °C por 90 minutos e depois lavada novamente por 5 vezes.

Preparo do reagente colorimétrico para revelação: A solução reveladora foi preparada da seguinte forma (apêndice B): ácido cítrico ($C_6H_8O_7$), OPD (*ortho phenylenediamine*), fosfato de sódio (Na_2HPO_4), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), água destilada, e pipetou-se 100 µL da solução em cada poço e depois foi incubada a temperatura ambiente, ao abrigo de luz por 20 minutos. Em seguida, adicionou-se 50 µL de ácido sulfúrico (H_2SO_4 1M) em cada poço, para interromper a reação enzimática.

Leitura das absorbâncias: realizou-se a leitura das absorbâncias em comprimento de onda de 450 nm em espectrofotômetro de microplacas *Multiskan*TM (Thermo Fisher ScientificTM, Massachusetts, EUA).

4.4 Determinação do *cut off* e da curva padrão do ensaio

Limiar de reatividade (Cut off): Para definição do limiar de reatividade, foram escolhidos 10 soros de amostras obtidas em março de 2019, antes da circulação do coronavírus no Brasil, nomeados como soros controle negativos. O limiar de

reatividade (*cut off*) da reação foi calculado pela média das concentrações de 10 soros controles negativos adicionado de dois desvios padrões.

$$\text{Cut off} = m + (2 \times dp)$$

m = média das concentrações dos soros controles negativos.

dp = desvio padrão.

Elaboração da curva padrão e cálculo das concentrações de anticorpos: Após a otimização das condições de trabalho do ensaio imunoenzimático, as concentrações da proteína N foram utilizadas como referência para a construção de uma curva padrão utilizando parâmetros de regressão linear. A construção da curva padrão foi realizada pelo cálculo da média dos valores das absorbâncias das diferentes diluições da proteína (1:2.000, 1:3.000, 1:5.000, 1:8.000, 1:10.000, 1:13.000, 1:16.000, 1:20.000; 1:5.000, 1:8.000, 1:12.000, 1:16.000, 1:20.000, 1:24.000, 1:28.000, 1:30.000; e 1/10.000, 1/20.000, 1/40.000, 1/60.000, 1/80.000, 1/100.000, 1/140.000, 1/200.000). A análise de regressão linear proporciona um índice de correlação entre os dados (R), o qual deve ser o mais próximo possível de 1,0, o que indica uma boa correlação entre os dois dados analisados.

4.5 Validação do ensaio imunoenzimático quantitativo indireto para detecção de anti-IgG do SARS-CoV-2

Sensibilidade e Especificidade

O cálculo da sensibilidade e especificidade do ensaio imunoenzimático quantitativo indireto para detecção de anti-IgG do SARS-CoV-2 foi realizado da seguinte forma:

Sensibilidade: Define-se como a fração dos resultados positivos no teste entre aqueles que possuem a doença, é calculada através da expressão: $S = VP / VP + FN$, onde S é a sensibilidade, VP (Valor positivo) corresponde ao número de soros de pacientes infectados com COVID-19 que apresentaram valor de absorbância acima do *cut off* determinado para a proteína recombinante, e FN (Falso Negativo)

corresponde ao número de soros de pacientes infectados com COVID-19 que apresentaram reatividade abaixo do *cut off* determinado para o antígeno.

Especificidade: Define-se como a fração dos soros não infectados com COVID-19 que obtiveram resposta negativa no teste, é calculada através da expressão: $E = VN / (VN + FP)$, onde E é a especificidade, VN (Valor Negativo) corresponde ao número de soros de indivíduos não infectados com COVID-19 que não possuem reatividade acima do *cut off* e FP (Falso Positivo) corresponde ao número de soros de indivíduos não infectados com COVID-19 que se encontraram acima do valor de *cut off*.

Além da sensibilidade e especificidade, foram calculados a acurácia, o valor preditivo positivo (VPP), o valor preditivo negativo (VPN) e a razão de verossimilhança para teste positivo (*likelihood ratio*) utilizando a ferramenta de abordagem diagnóstica disponibilizada pela Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) do Ministério da Saúde (<https://aps.bvs.br/apps/calculadoras/?page=1>).

Determinação das reações cruzadas

A fim de verificar a reatividade cruzada do vírus SARS-CoV-2 com as arboviroses mais comuns no Brasil, foram realizados testes com amostras de soro reagentes para os vírus da dengue (dengue vírus – DENV), zika (zika vírus – ZIKV) e chikungunya (vírus Chikungunya – CHIKV), obtidas da soroteca do Laboratório Central de Saúde Pública de Sergipe (LACEN/SE). Todas as amostras foram testadas por testes sorológicos anti-IgG realizados no próprio LACEN/SE.

4.6 Análises estatísticas

Os programas *GraphPad Prism* 8.0.1 e *Microsoft Excel* 2010 foram utilizados para a realização das análises dos dados. Para cada duplicata de cada amostra de soro utilizada em todos os experimentos dos ensaios imunoenzimáticos, foram calculados os valores das médias e desvios-padrão. Foram aplicados o teste F e o teste t de Welch para comparar as variantes não paramétricas e ANOVA para comparação entre as médias dos grupos estudados. Resultados com valor de *p* menor ou igual a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

Para a padronização da técnica, foi necessário realizar experimentos pilotos para determinar o protocolo, nos quais foram testadas variações nas etapas de execução do teste:

- Variações na concentração do antígeno adsorvido as microplacas (proteína N recombinante);
- Variações na etapa de bloqueio, após a sensibilização das microplacas com o antígeno;
- Variações na diluição dos anticorpos primário e secundário;
- Variações nas concentrações da curva-padrão.

5.1 Características das amostras obtidas

Foi utilizado um total de 144 amostras de soro obtidas de coleta de sangue periférico, 43 para a primeira etapa de padronização do ensaio imunoenzimático e 101 para a etapa de validação do teste (90 amostras positivas para SARS-CoV-2 e 54 negativas para SARS-CoV-2). A faixa etária média foi de 64 anos de idade, com 71% das amostras pertencentes a pacientes do sexo feminino e 29% do sexo masculino. As características dos pacientes e os resultados prévios obtidos pelo ensaio qualitativo imunofluorescente (FIA) estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Características epidemiológicas dos pacientes testados no estudo.

	Anti-SARS-CoV-2 (IgG) POSITIVAS	Anti-SARS-CoV-2 (IgG) NEGATIVAS	TOTAL
Idade (em anos)	62	66	
Sexo masculino	24	17	41
Sexo feminino	66	37	103

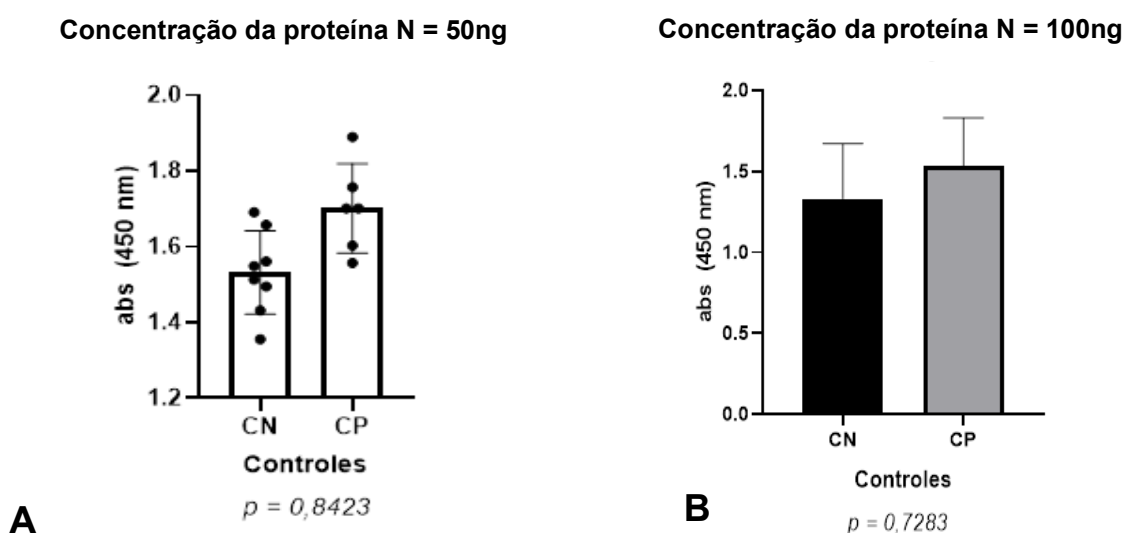
5.2 Determinação da concentração do antígeno e bloqueio da sensibilização

A concentração definida inicialmente para padronizar a sensibilização das microplacas no primeiro teste foi de **50 ng/poço** do **antígeno** proteína recombinante “N”, com bloqueio da sensibilização da placa por 2 horas com **BSA 0,1%** em PBS.

As análises demonstradas na Figura 8, comparando os resultados obtidos pelo método de FIA com o ensaio imunoenzimático quantitativo, em amostras reagentes (controle positivo) e não reagentes (controle negativo) na concentração de **50 ng** da proteína N por poço, não demonstrou diferença estatística significativa $p = 0,8423$. Além disso, esses resultados demonstraram uma provável ocorrência de ligações inespecíficas observadas em virtude das elevadas absorbâncias médias obtidas dos controles negativo e positivo: **1,532 e 1,826**, respectivamente.

Alterando-se a concentração do antígeno proteína N recombinante para **100 ng/poço**, também não demonstrou diferença estatística significativa sendo o valor de $p = 0,7283$. As absorbâncias dos controles negativo e positivo também permaneceram elevadas. Estes resultados corroboraram para uma provável ocorrência de ligações inespecíficas na etapa do bloqueio, o qual foi ajustado no terceiro e quarto testes.

Figura 8: Padronização da concentração da proteína N

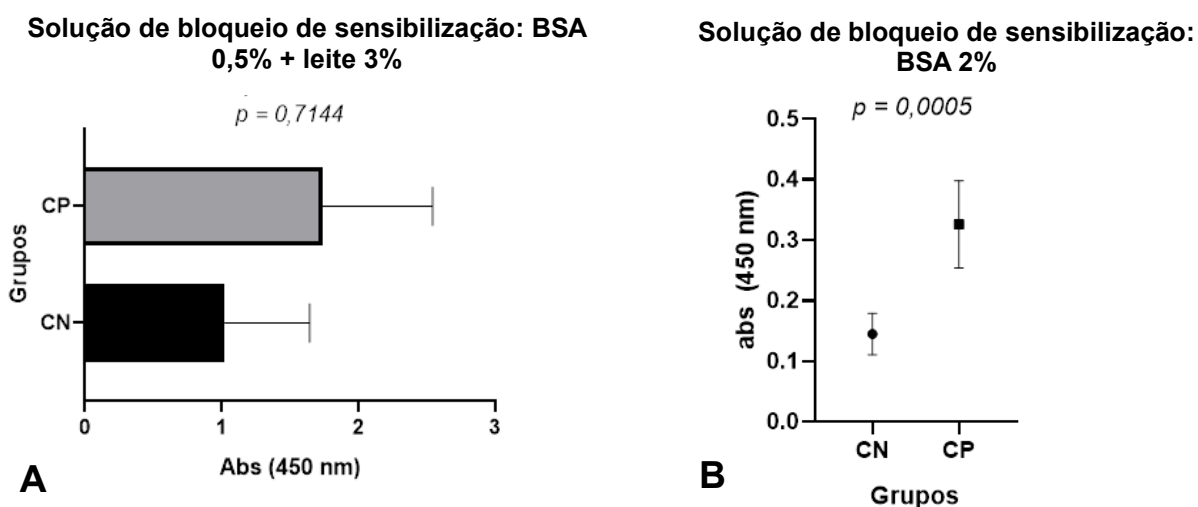


Comparação entre os resultados obtidos pelo método de FIA com o ensaio imunoenzimático quantitativo, em amostras reagentes (controle positivo) e não reagentes (controle negativo) nas concentrações de 50ng e 100ng da proteína N por poço, filtro de 450 nm. Realizado *teste F* e o *teste t de Welch*. **A**: concentração da proteína N: 50ng/poço; probabilidade de significância de $p = 0,8423$; **B**: concentração da proteína N: 100ng/poço; probabilidade de significância de $p = 0,7283$; absorbância (abs): 450 nm; controle negativo (CN); controle positivo (CP). Autoria própria.

A partir disso, em um terceiro teste, foram aplicadas algumas modificações no bloqueio para tentar reduzir as ligações inespecíficas: aumento da concentração da solução de bloqueio para BSA 0,5% + leite desnatado Molico® 3% (Nestlé, Brasil) em PBS e manutenção da concentração da proteína recombinante “N” para 100 ng/poço, em duplicatas, resultando em absorbâncias semelhantes de médias de **1,022 e 1,739**, entre os grupos controle negativo e controle positivo, respectivamente, e sem diferença significativa $p = 0,7144$ (Figura 9A).

Em seguida, foi testada outra forma de bloqueio modificada por GAO e colaboradores (2020): bloqueio da sensibilização de 2 horas com **BSA 2%** em PBS e manutenção da concentração da proteína recombinante “N” para **100 ng/poço**, resultando em absorbâncias médias de **0,145 e 0,326** dos grupos controle negativo e positivo, respectivamente (Figura 9B).

Figura 9: Efeitos de diferentes bloqueios na redução de ligações inespecíficas



Comparação entre os resultados obtidos pelo método de FIA com o ensaio imunoenzimático quantitativo, em amostras reagentes (controle positivo) e não reagentes (controle negativo) na concentração da proteína N de 100 ng/poço e bloqueio com BSA 0,5% e leite 3%, e BSA 2% em PBS; filtro de 450 nm. Realizado o teste *t*. **A**: solução de bloqueio de sensibilização BSA 0,5% + leite 3% probabilidade de significância $p = 0,7144$; **B**: solução de bloqueio de sensibilização BSA 2% probabilidade de significância de $p = 0,0005$; concentração da proteína N: 100ng/poço; absorbância (abs): 450 nm; controle negativo (CN); controle positivo (CP); Autoria própria.

5.3 Determinação da diluição da amostra

Na tabela 2 podem-se observar diferenças entre os valores da leitura de absorbâncias obtidas entre as diluições avaliadas: **1:25**, **1:100** e **1:500**, do anticorpo primário (amostras reagentes no FIA para anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2) na concentração de 100ng/poço no ensaio imunoenzimático quantitativo anti-SARS-CoV-2.

Na diluição de **1:100**, observou-se que a leitura das absorbâncias se apresentou mais elevada do que as esperadas comparando-a aos controles negativos (CN). Depois, avaliando-se a diluição de **1:25**, foram observados resultados relativamente adequados na leitura das absorbâncias, porém ainda não estava padronizada a diluição do anticorpo secundário conjugado à peroxidase em que foi utilizada a diluição de 1:10.000. Por fim, após ajustes na sensibilização, bloqueio e também na diluição do anticorpo conjugado para **1:20.000**, avaliou-se a diluição do anticorpo primário em **1:500** e logo, obteve-se uma otimização dos resultados de absorbância comparados aos resultados das amostras controle negativo entre as diluições avaliadas por ANOVA ($p = 0,0022$) (Figura 10).

Tabela 2: Leituras das absorbâncias do ensaio imunoenzimático quantitativo para anti-SARS-CoV-2, de amostras controles positivo e negativo, utilizando 100 ng de proteína N com diferentes títulos do anticorpo primário e anticorpo secundário na diluição 1:10.000, filtro de 450 nm.

DILUIÇÕES	1/25	1/100	1/500
ABSORBÂNCIAS	1,399	1,654	0,784
	1,080	3,198	1,493
	1,579	3,888	2,610
	2,011	3,261	1,623
	1,411	1,428	0,699
	1,657	3,954	2,794
	1,826	2,813	1,135
	1,325	2,366	0,890
Médias	1,536	2,820	1,503
CN	-	1,024	0,567

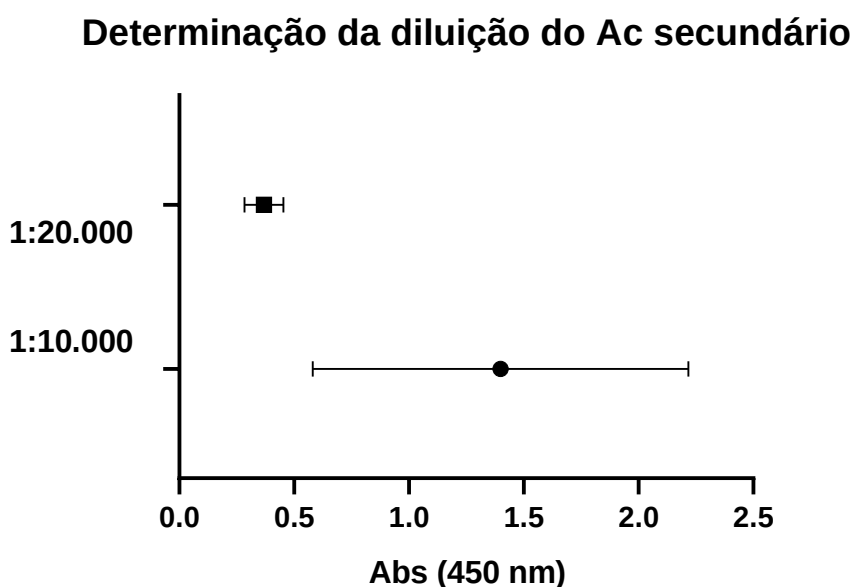
Concentração da proteína N: 100ng/poço; absorbância: 450 nm; controle negativo (CN).

5.4 Determinação da diluição anticorpo secundário e curva padrão

A concentração do anticorpo secundário anti-IgG ligado à peroxidase (anti-IgG-Perox) de fábrica é de 1 mg/mL e foi diluído para melhor rendimento. De acordo com as orientações do fabricante, a diluição inicial do anticorpo conjugado foi de **1:10.000**, porém com os ajustes da concentração de adsorção, bloqueio e do anticorpo primário descritos anteriormente, foi testada a diluição **1/20.000** o que resultou em uma otimização dos resultados quando comparados ao resultados obtidos entre as duas diluições aplicando-se o teste t ($p = 0,0046$).

CONCENTRAÇÃO: 5×10^{-5} mg/mL

Figura 11: Determinação da diluição do anticorpo secundário



Comparação entre os resultados obtidos no ensaio imunoenzimático quantitativo para anti-SARS-CoV-2, de amostras controle positivo, utilizando 100 ng de proteína N com diferentes diluições do anticorpo secundário conjugado (1:10.000 e 1:20.000), filtro de 450 nm. Realizado teste t . Autoria própria.

A **primeira curva padrão** para cálculo da concentração das amostras foi realizada a partir de um *pool* de amostras (diluição 1/25) obtidas por meio de teste FIA reagente para IgG anti-SARS-CoV-2, em uma diluição seriada de anticorpo secundário anti-IgG ligado à peroxidase (anti-IgG-Perox), iniciando em **1/2.000** e finalizando em **1/20.000** (Tabela 3), resultando em absorbâncias muito próximas e

elevadas, uma delas acima da linearidade do equipamento, e com distribuição inadequada para os pontos de elaboração da curva.

Tabela 3: Leituras das absorvâncias obtidos na primeira curva padrão do ensaio imunoenzimático com a concentração da proteína recombinante “N” de 100 ng/poço.

Absorvância (450 nm)	
Curva	100 ng/poço
1:2.000	3,323
1:3.000	2,688
1:5.000	4,040*
1:8.000	1,984
1:10.000	2,268
1:13.000	1,326
1:16.000	1,335
1:20.000	0,979

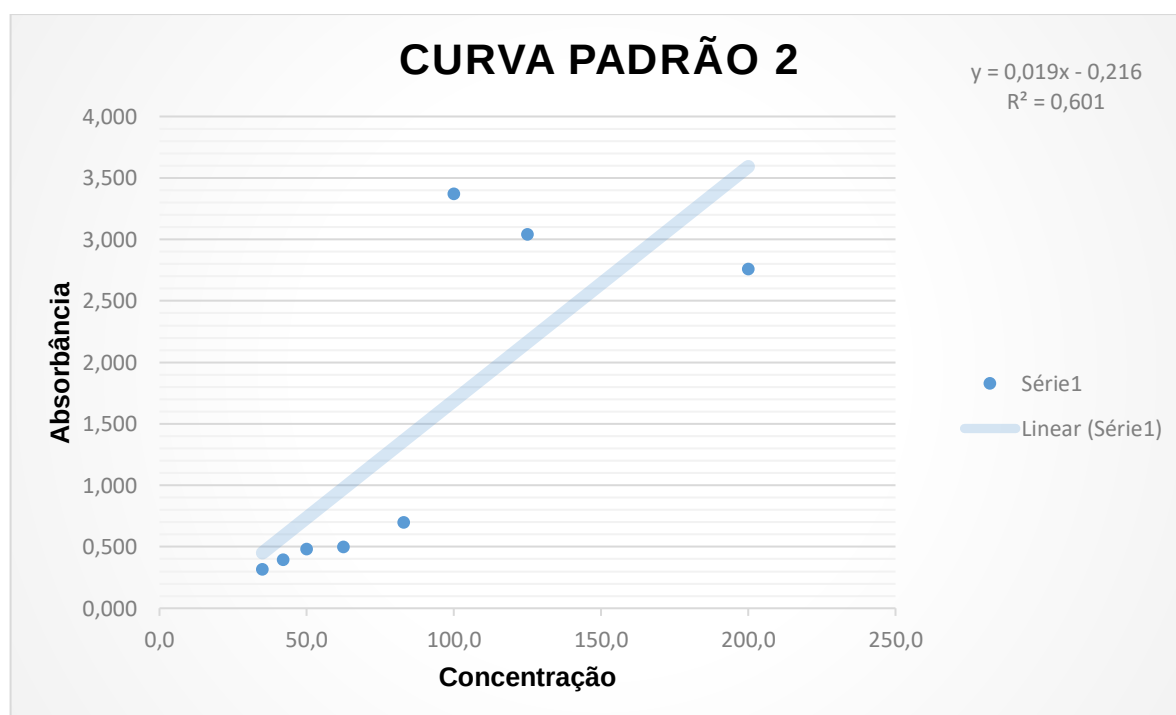
*leitura maior que a linearidade do equipamento

Posteriormente, foram realizadas outras variações da diluição do anticorpo primário (*pool* de amostras obtidas por meio de teste FIA reagente para IgG anti-SARS-CoV-2): **1/100**, **1/200** e **1/500** em uma diluição seriada de anticorpo secundário anti-IgG ligado à peroxidase (anti-IgG-Perox), iniciando em 1/5.000 e finalizando em 1/28.000 (tabela 4), resultando em absorvâncias com distribuição inadequada para os pontos de elaboração da **segunda curva padrão**, sem apresentar boa correlação ($R^2=0,601$), observadas na Figura 12.

Tabela 4: Valores das absorvâncias em duplicata obtidos na terceira curva padrão do ensaio imunoenzimático na concentração de 100 ng/poço da proteína recombinante “N”, e diluições de 1/100, 1/200 e 1/500 de anticorpo primário (*pool* de amostras).

CURVA	1/100		1/200		1/500	
1:5.000	3,296	3,381	3,205	3,185	2,727	2,786
1:8.000	3,628	3,487	3,364	3,558	2,951	3,129
1:12.000	3,716	3,883	3,799	3,729	3,329	3,409
1:16.000	0,913	0,865	0,854	0,841	0,685	0,713
1:20.000	0,665	0,674	0,638	0,616	0,493	0,506
1:24.000	0,585	0,607	0,522	0,538	0,456	0,503
1:28.000	0,492	0,468	0,429	0,444	0,409	0,379
1:30.000	0,409	0,393	0,357	0,308	0,310	0,322

Figura 12: Curva padrão número 2 do anticorpo secundário anti-IgG ligado à peroxidase utilizando diluição de 1/500 de anticorpo primário (*pool* de amostras).

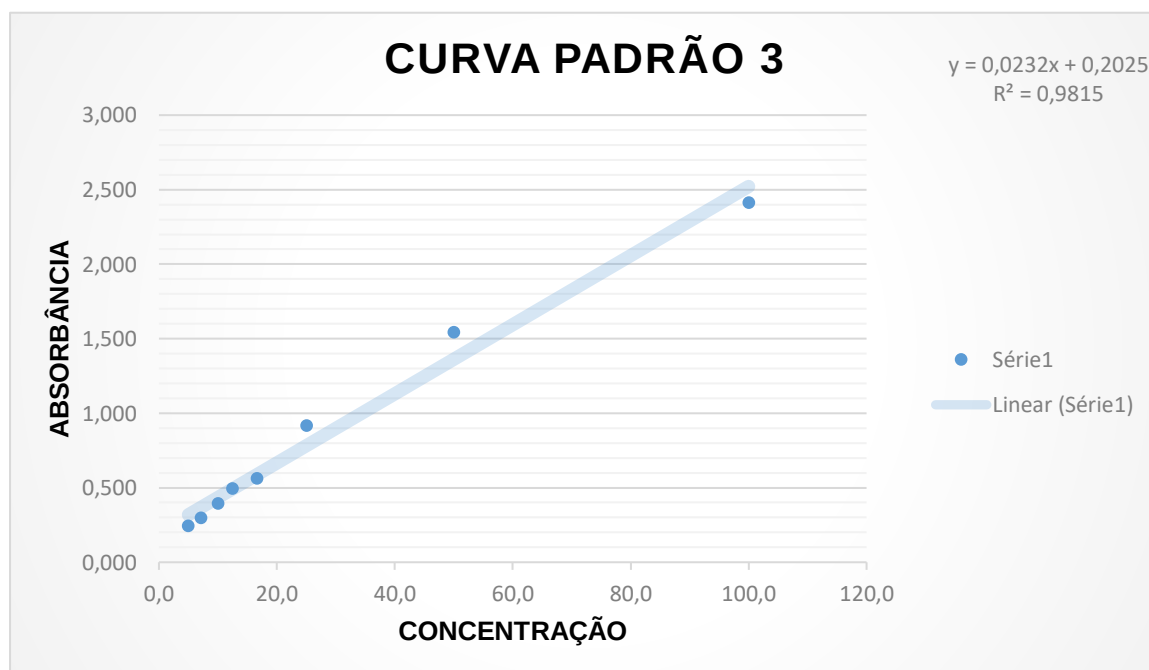


Por fim, utilizando a diluição do anticorpo primário (*pool* de amostras obtidas por meio de teste FIA reagente para IgG anti-SARS-CoV-2) **1/500**, foram realizadas variações na diluição seriada do anticorpo secundário anti-IgG ligado à peroxidase (anti-IgG-Perox), iniciando em 1/10.000 e finalizando em 1/200.000, resultando em valores de absorbâncias ideais apresentados na tabela 5, e a terceira curva padrão indicando a boa correlação obtida ($R^2=0,9815$) (Figura 13).

Tabela 5: Valores das absorbâncias obtidos na terceira curva padrão do ensaio imunoenzimático quantitativo para SARS-CoV-2 na concentração de 100 ng/poço da proteína recombinante “N”, e diluição de 1/500 de anticorpo primário (*pool* de amostras positivas para IgG anti-SARS-CoV-2).

CURVA	Absorbâncias (450 nm)				Xm
1/10.000	2,495	2,192	2,450	2,520	2,414
1/20.000	1,595	1,542	1,533	1,500	1,543
1/40.000	0,944	0,939	0,883	0,897	0,916
1/60.000	0,583	0,556	0,574	0,532	0,561
1/80.000	0,485	0,509	0,487	0,495	0,494
1/100.000	0,411	0,402	0,384	0,386	0,396
1/140.000	0,302	0,307	0,286	0,292	0,297
1/200.000	0,243	0,272	0,230	0,235	0,245

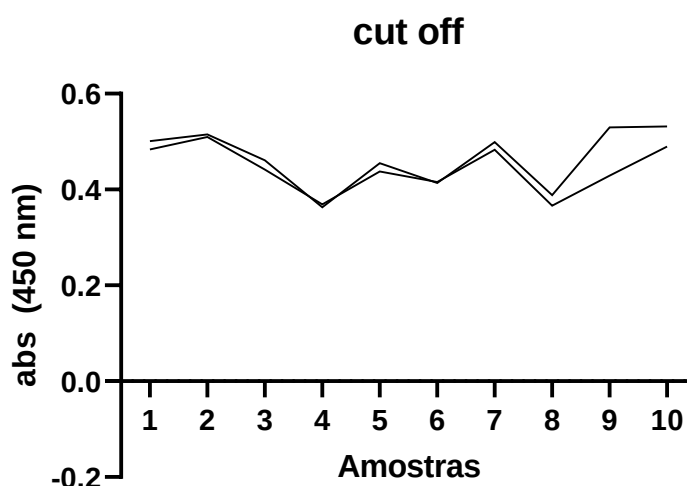
Figura 13: Curva padrão número 3 do anticorpo secundário anti-IgG ligado à peroxidase utilizando diluição de 1/500 de anticorpo primário (*pool*).



5.5 Determinação do *cut off*

Para definição do limiar de reatividade (*cut off*), foram utilizadas 10 amostras de indivíduos participantes de outro projeto do grupo de pesquisa, coletadas em março de 2019, antes da existência do novo coronavírus. Estas amostras foram testadas pela técnica de FIA, apresentando resultados não reagentes para IgG anti-SARS-CoV-2. As concentrações das amostras controle negativo para SARS-CoV-2 obtidas no ensaio imunoenzimático quantitativo (Tabela 6) apresentaram uma concentração média de **3,59 ng/mL**, que foi utilizada para o cálculo do *cut off*, conforme descrito abaixo:

Figura 14: Distribuição gráfica dos resultados de absorbância em duplicata obtidos no ensaio imunoenzimático quantitativo de amostras obtidas antes da pandemia com teste FIA não reagente (controle negativo).



Cálculo do *cut off*: média (m) das concentrações do anticorpo primário em duplicata utilizando amostras controle negativo para SARS-CoV-2, adicionados dois desvios-padrão (dp) e menos o valor do branco utilizado no teste de ELISA.

$$\text{Cut off} = m + (2 \times dp)$$

$$\text{Cut off} = 3,69 + (2 \times 3,90)$$

$$\text{Cut off} = 11,49 \text{ ng/mL}$$

Tabela 6: Valores das concentrações de amostras obtidas antes da pandemia com teste FIA não reagente (controle negativo) obtidas através do ensaio imunoenzimático quantitativo para IgG anti-SARS-CoV-2.

IDENTIFICAÇÃO	ABSORBÂNCIAS (450 nm)	CONCENTRAÇÃO (ng/mL)
A1	0,437	5,68
A2	0,281	-0,79
A3	0,368	2,14
A4	0,457	6,41
A5	0,396	4,20
A6	0,310	1,10
A7	0,391	4,01
A8	0,359	2,87
A9	0,435	5,63
A10	0,321	1,50
A11	0,424	5,21
A12	0,455	6,35
Média	0,386	3,69

5.6 Validação do ensaio imunoenzimático quantitativo indireto para detecção de anti-IgG do SARS-CoV-2

5.6.1 Análise da Sensibilidade e Especificidade

Utilizou-se como referência a análise de 124 amostras de soro humano para calcular a sensibilidade e especificidade do ensaio imunoenzimático anti-SARS-CoV-2 considerando a reatividade de todas as amostras. A Tabela 7 mostra os resultados de sensibilidade e especificidade do ensaio.

Tabela 7. Sensibilidade e especificidade para IgG do ensaio imunoenzimático anti-SARS-CoV-2 x FIA.

ELISA	IgG	
	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
	53	94

Avaliando-se que o Imunoensaio de Fluorescência (FIA) utilizado é um teste qualitativo, avaliamos a precisão desse ensaio sorológico por sua sensibilidade por apresentar um número elevado de falsos negativos entre as amostras estudadas e considerou-se a comparação com outro teste. Para isso, foi realizada outra análise com 101 amostras de soro humano para calcular a sensibilidade e especificidade do ensaio imunoenzimático anti-SARS-CoV-2 considerando a reatividade de todas as amostras com o teste de anticorpos neutralizantes anti-RBD-S1. A Tabela 8 mostra os resultados de sensibilidade e especificidade do ensaio.

Tabela 8. Sensibilidade e especificidade para IgG do ensaio imunoenzimático anti-SARS-CoV-2 x anti-RBD-S1.

ELISA	IgG	
	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
	94	91

No total, foram 78 amostras positivas e 23 negativas para IgG pelo FIA, enquanto 60 amostras foram positivas e 41 negativas para IgG pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) anti-SARS-CoV-2 e comparadas ao ensaio anti-RBD-S1, 66 amostras foram positivas e 35 negativas (Tabela 9).

Tabela 9. Total de amostras positivas e negativas para os testes de FIA, do ensaio imunoenzimático anti-SARS-CoV-2 e anti-RBD-S1

	IgG (+)	IgG (-)	Total
FIA	78	23	101
ELISA	60	41	
RBD-S1	66	35	

FIA: imunoensaio de fluorescência; ELISA: ensaio imunoenzimático quantitativo

5.6.2 Acurácia, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e razão de verossimilhança

Tabela 10. Acurácia, VPP, VPN e razão de verossimilhança para teste positivo (RV) do ensaio imunoenzimático anti-SARS-CoV-2 x anti-RBD-S1.

Ensaio imunoenzimático anti-SARS-CoV-2 x anti-RBD-S1				
Teste	Acurácia	VPP	VPN	RV
ELISA	93%	95%	89%	11

VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo.

O presente trabalho apresentou 11,0 de *likelihood ratio* indicando maior probabilidade dos resultados positivos obtidos pelo ensaio imunoenzimático quantitativo anti-SARS-CoV-2 serem verdadeiro em pessoas com a COVID-19.

5.6.3 Reação cruzada SARS-CoV-2, dengue, zika e chikungunya

Para a investigação de reação cruzada foram utilizadas 100 amostras de soro. Dentre elas, 40 foram excluídas na triagem após serem submetidas ao teste FIA anti-SARS-CoV-2 e apresentarem reatividade para anticorpos anti-IgG do SARS-CoV-2. As 60 amostras remanescentes foram testadas para os vírus da dengue, zika e chikungunya no ensaio imunoenzimático anti-SARS-CoV-2. Nenhuma amostra positiva para dengue ou chikungunya (6 e 4, no total, respectivamente) foi positiva no ensaio imunoenzimático quantitativo anti-SARS-CoV-2, entretanto 2 amostras positivas para o zika vírus foram positivas no ensaio imunoenzimático quantitativo anti-SARS-CoV-2.

Dentre as amostras negativas, apenas uma amostra negativa para dengue e três para zika foram positivas no ensaio imunoenzimático quantitativo anti-SARS-CoV-2.

6 DISCUSSÃO

Desde o início da pandemia da COVID-19 inúmeros testes diagnósticos foram desenvolvidos rapidamente, e muitos ainda aguardam validação clínica e aprovação final, nos quais se avaliam de forma rigorosa o projeto de elaboração, desenvolvimento, validação e a implementação desses testes por um grande número de fabricantes (VANDENBERG et al., 2020).

O diagnóstico da COVID-19 pode ser realizado de forma direta e indireta. Nos métodos de detecção direta, são analisadas partes do vírus, como os ácidos nucleicos via amplificação pela técnica de RT-PCR, ou pela detecção de uma ou mais de uma de suas proteínas, denominado de “teste do antígeno”, ou ainda por meio de culturas virais, sendo esta última técnica mais amplamente empregada na pesquisa. Os métodos indiretos são testes imunológicos que se baseiam na detecção de anticorpos específicos para o vírus, demonstrando as consequências da infecção pelo vírus no hospedeiro (OH et al., 2020; ZHU et al., 2020).

O teste designado como “padrão ouro” ou *gold standard* para o diagnóstico da COVID-19 se baseia na detecção do material genético do vírus por reação em cadeia da polimerase (PCR). Porém, o custo desse teste é ainda muito alto e exige equipamentos mais complexos e treinamento da equipe executora. Vandenberg e colaboradores em um estudo realizado em 2020 enfatizaram a dificuldade que o alto custo do diagnóstico da COVID-19 causou um problema significativo na primeira onda da pandemia, e sugeriu uma otimização das ferramentas de diagnóstico e a necessidade da rápida implementação de novos testes.

Diante disso, a OMS solicitou pesquisas sobre testes diagnósticos para locais com recursos limitados como a saúde pública brasileira, por exemplo, pois a implementação dessas tecnologias é um desafio em relação a falta de infraestrutura, insumos, reagentes, equipe técnica especializada treinada e equipamentos de última geração (WHO, 2020).

Atualmente, a maioria dos ensaios sorológicos para IgG disponíveis para o SARS-CoV-2 são qualitativos ou semiquantitativos. A disponibilidade de ensaios sorológicos quantitativos é necessária por ser uma ferramenta de melhor desempenho comparada aos disponíveis na atualidade do diagnóstico da COVID-19, sendo úteis no ponto de vista acadêmico e de gestão e saúde pública.

Estudos que detectaram as proteínas do SARS-CoV-2 permitiram o

desenvolvimento de outros métodos diagnósticos que fossem mais viáveis economicamente e de mais fácil execução, não necessitando equipamentos específicos e que possam ser desenvolvidos pelos profissionais habilitados a realizar técnicas semelhantes. Um estudo realizado por Liang et al. (2013), demonstrou que algumas regiões da proteína de nucleocapsídeo “N” apresentaram maior reatividade em amostras de soro de coelho, sendo um bom resultado quanto ao estímulo da resposta imune, mostrando a necessidade de mais estudos com amostras de soro humano utilizando esta proteína, que é encontrada abundantemente na estrutura viral.

Como a estrutura do novo coronavírus é semelhante aos outros vírus da mesma família, um estudo coordenado por Leung et al. em 2004, direcionado à resposta de anticorpos ao nucleocapsídeo dos coronavírus, enfatizou a alta resposta do sistema imune na produção de anticorpos IgG, revelando um bom desempenho quanto à antigenicidade apresentada pela proteína N, sendo um estímulo a novas pesquisas com sua utilização.

Quanto ao estímulo do sistema imune a produção de imunoglobulinas, um estudo chinês coordenado por Hsueh et al. (2004) fez a avaliação das respostas de anticorpos IgM e IgA em pacientes infectados com o SARS-CoV e mostrou que essas duas classes de anticorpos não forneceram evidências relevantes de infecção, não sendo recomendadas a utilização pelas sociedades científicas, diferentemente em comparação com anticorpos IgG.

Dados preliminares de um estudo de Long et al. (2020) sugere que as imunoglobulinas do tipo IgG produzidas contra diferentes antígenos do SARS-CoV-2 tornam-se detectáveis após pelo menos 8 dias em pacientes imunocompetentes, embora algumas pessoas possam demorar mais para soroconverter ou podem nunca converter, dependendo de seu sistema imunológico.

Um ensaio imunoenzimático para detectar IgG anti-SARS-CoV-2 desenvolvido por Amanat et al. (2020) utilizando a proteína N recombinante obteve resultados com especificidade bastante alta (>95%) e taxa de falsos positivos de 2,5%, embora com limitações em relação ao número de amostras e ainda não revisado, assim como nosso trabalho. A amplitude de um estudo com um número maior populacional de pessoas com a doença/condição e pessoas saudáveis torna-se essencial para as etapas no processo de validação de um novo teste.

Os resultados do nosso estudo mostraram uma alta sensibilidade e

especificidade (>90%) e está em conformidade a alguns dos demais ensaios com os mesmos princípios e objetivos. Por exemplo, o ensaio desenvolvido por Zhao et al. (2020) também utilizando a proteína N recombinante, a especificidade foi de 99% em 173 amostras de plasma humano. Um detalhe importante para atingir níveis significativos nesses testes de abordagens diagnósticas e que foi atribuída a esse trabalho é a distribuição dos condicionantes de uma população como a idade e sexo, principalmente.

Outro trabalho semelhante ao nosso estudo, realizado na Universidade Federal do Paraná por Conzentino e colaboradores (2021), desenvolveu um ensaio imunoenzimático indireto com a proteína de nucleocapsídeo purificada do SARS-CoV-2 para a identificação da soroconversão de anticorpos em humanos ao vírus da COVID-19. O ensaio resultou em 90% de sensibilidade, 98% de especificidade e precisão semelhante a um kit comercial e também ao nosso trabalho. Essas características são fundamentais para avaliar o desempenho de um ensaio sorológico. Assim como a realização da comparação do nosso imunoensaio *in house* com o ensaio comercialmente disponível (anti-RBD-S1) que mostrou uma melhor sensibilidade quando comparada a sensibilidade obtida ao teste de imunofluorescência (FIA).

Geralmente os ensaios imunoenzimáticos ELISA apresentam alto desempenho analítico comparado às outras metodologias e em outras doenças, porém os testes disponíveis atualmente apresentam alguns indicadores de validação com menor desempenho, como, por exemplo, o valor preditivo negativo inferior a 50% na fase inicial da COVID-19, semelhante à comparação que realizamos com amostras por FIA (24%) e diferentemente da segunda comparação utilizando o anti-RBD-S1 (89%) (SBPCML, 2020).

Além disso, o estudo de den Hartog (2020) mostrou que a proteína do nucleocapsídeo do SARS-CoV-2 pode ser usada como antígeno para detectar casos de COVID-19 sem reatividade cruzada significativa com outros coronavírus, sendo esses o foco principal da maioria dos estudos para avaliar a interação com outros anticorpos. Contudo, não há estudos que analisam diretamente a reação cruzada do SARS-CoV-2 com os arbovírus assim como analisados no nosso trabalho. Apenas um estudo em Singapura de Yan et al. de 2020, relatou a possibilidade de reação cruzada entre os vírus SARS-CoV-2 e DENV logo após um paciente apresentar testes rápidos IgM/IgG para dengue e RT-PCR para o SARS-CoV-2 positivos e

posteriormente não detectado por testes moleculares para dengue na urina e sangue.

Vale ressaltar que estudos com proteínas virais permitem que as mesmas sejam candidatas para o desenvolvimento ou aprimoramento de testes diagnósticos ou mesmo de vacinas. A proteína N recombinante foi selecionada neste trabalho devido à sua elevada antigenicidade e imunogenicidade, multipotencialidade funcional, relação com a patogênese viral, e que a maioria dos testes imunoenzimáticos atualmente comercializados baseiam-se em estudos com a proteína *spike* (S). Os testes *in house* utilizam metodologia própria com reagentes ou sistemas analíticos produzidos e validados pelo próprio laboratório clínico, exclusivamente para uso próprio, em pesquisa ou em apoio diagnóstico.

O ensaio imunoenzimático indireto quantitativo anti-IgG para o SARS-CoV-2 realizado *in house* é um teste tecnicamente simples e rápido, possui melhor rendimento e seus resultados são de fácil leitura e interpretação. Em contrapartida à maioria dos testes sorológicos comerciais atualmente utilizados que empregam metodologias qualitativas, este teste tem a grande vantagem de ser um teste quantitativo, fornecendo resultados mais robustos e com maior especificidade. A aplicação deste ensaio fornece informações importantes para o diagnóstico, manejo terapêutico e acompanhamento da recuperação dos pacientes com a COVID-19 e consequentemente, para o planejamento do controle epidemiológico da doença.

7 CONCLUSÕES

O ensaio imunoenzimático quantitativo indireto *in house* para a detecção de anticorpos anti-IgG do SARS-CoV-2 foi padronizado e validado, determinando-se assim, as etapas para execução do teste como a concentração adequada do antígeno (proteína N), as diluições ideais do anticorpo primário e secundário, além de seu limiar de reatividade (*cut off*) e curva padrão gerando assim, um novo teste de boa qualidade, alta sensibilidade, alta especificidade e de baixo custo para o diagnóstico ou acompanhamento da COVID-19.

REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA, A. M. R.; LIMA, J. A. A. **Princípios e técnicas de diagnose em fitovirologia**. Publicação SBF, Brasília/Fortaleza: 2001.
2. AMANAT, F., STADLBAUER, D., STROHMEIER, S., NGUYEN, T., CHROMIKOVA, V., MCMAHON, M., JIANG, K., ARUNKUMAR, G. A., JURCZYSZAK, D., POLANCO, J., BERMUDEZ-GONZALEZ, M., KLEINER, G., AYDILLO, T., MIORIN, L., FIERER, D. S., LUGO, L. A., KOJIC, E. M., STOEVEER, J., LIU, S., CUNNINGHAM-RUNDLES, C., KRAMMER, F. **A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans**. *Nature medicine*, 26(7), 1033–1036, 2020.
3. AYDIN S. **A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA**. *Peptides*.72:4-15. 2015.
4. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 302, DE 13 DE OUTUBRO DE 2005**. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5919009/RDC_302_2005_COMP.pdf/>. Acesso em: 09 set 2021.
5. BRASIL. Ministério da Saúde. Governo do Estado de Sergipe. Secretaria de Estado da Saúde. Todos contra o corona. **Boletim COVID-19 – 01.10.2021**. 01 de out. 2021. Disponível em: <<https://todoscontraocorona.net.br/boletim-covid-19-01-10-2021/>>. Acesso em: 01 out 2021.
6. BRIAN D. A., BARIC R. S. **Coronavirus genome structure and replication**. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 287, 1–30, 2005.
7. CONZENTINO, M. S., FORCHHAMMER, K., SOUZA, E. M., PEDROSA, F. O., NOGUEIRA, M. B., RABONI, S. M., REGO, F., ZANETTE, D. L., AOKI, M. N., NARDIN, J. M., FORNAZARI, B., MORALES, H., CELEDON, P., LIMA, C., MATTAR, S. B., LIN, V. H., MORELLO, L. G., MARCHINI, F. K., REIS, R. A., & HUERGO, L. F. **Antigen production and development of an indirect ELISA based on the nucleocapsid protein to detect human SARS-CoV-2 seroconversion**. *Brazilian journal of microbiology*, 1–5. 2021.
8. CUI J, LI F, SHI ZL. **Origin and evolution of pathogenic coronaviruses**. *Nat Rev Microbiol.* 17(3):181-192, 2019.

9. DANTAS, T. V. M. **Desenvolvimento e padronização de elisa indireto para diagnóstico de maedi-visna vírus de ovinos**. Dissertação Universidade Estadual do Ceará, 2004.
10. DEN HARTOG G, SCHEPP RM, KUIJER M, GEURTSVANKESSEL C, VAN BEEK J, ROTS N, KOOPMANS MPG, VAN DER KLIS FRM, VAN BINNENDIJK RS. **SARS-CoV-2-Specific Antibody Detection for Seroepidemiology: A Multiplex Analysis Approach Accounting for Accurate Seroprevalence**. J Infect Dis. 222(9):1452-1461, 2020.
11. ENGVALL E, PERLMANN P. **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quanti-tative assay of immunoglobulin G**. Immunochemistry, 8:871–4, 1971.
12. FLETCHER, Robert H e FLETCHER, Suzanne W. **Epidemiologia Clínica – Elementos essenciais**. Porto Alegre: Artmed, 2006.
13. GAO Q, BAO L, MAO H, et al. **Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2**. Science, 369(6499):77-81, 2020.
14. GREENBERG, Raymond S. **Epidemiologia Clínica**. Porto Alegre: Artmed, 2005.
15. HSUEH PR, HUANG LM, CHEN PJ, KAO CL, YANG PC. **Chronological evolution of IgM, IgA, IgG and neutralisation antibodies after infection with SARS-associated coronavirus**. Clin Microbiol Infect. 12:1062-6, 2004.
16. JALAVA, K. **First respiratory transmitted food borne outbreak?**. Int J Hyg Environ Health. 1-2. 2020.
17. KANG S, YANG M, HONG Z, ZHANG L, HUANG Z, CHEN X, et al. **Crystal structure of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites**. Acta Pharm Sin B, 10:1228-38, 2020.
18. KADAM SB, SUKHRAMANI GS, BISHNOI P, PABLE AA, BARVKAR VT. **SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights**. J Basic Microbiol. 61(3):180-202, 2021.
19. KATO K, HAMAGUCHI Y, OKAWA S, ISHIKAWA E, KOBAYASHI K. **Use of rabbit antibodyIgG bound onto plain and aminoalkylsilyl glass surface for the enzyme-linked sandwich immunoassay**. J Biochem, 82:261–6, 1977.
20. KOPECKY-BROMBERG SA, MARTÍNEZ-SOBRIDO L, FRIEMAN M, BARIC RA, PALESE P. **Severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading**

frame (ORF) 3b, ORF 6, and nucleocapsid proteins function as interferon antagonists. *J Virol.* 81(2):548-57, 2007.

21. KUMAR, A.; PARVEEN, A.; KUMAR, N.; BAIRY, S.; KAUSHIK, V.; CHANDOLA, C.; SHARMA, J.; SHARMA, P.; AGARWAL, A.; PANDEY, A.; GOYAL, P.; NEERATHILINGAM, M. **Characterization of Nucleocapsid (N) Protein from Novel Coronavirus SARS-CoV-2.** Preprints 2020.

22. LAI C. C., SHIH T. P., KO W. C., TANG H. J., HSUEH P. R. **Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges.** *Int. J. Antimicrobial Agents* 55, 105924, 2020.

23. LAN J, GE J, YU J, SHAN S, ZHOU H, FAN S, et al. **Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor.** *Nature.* 581:215-20, 2020.

24. LEUNG D.T., TAM F.C., MA C.H., CHAN P.K., CHEUNG J.L., NIU H., TAM J.S., LIM P.L. **Antibody response of patients with severe acute respiratory syndrome (SARS) targets the viral nucleocapsid.** *J. Infect. Dis.,* 190:379–386, 2004.

25. LI F. **Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins.** *Annu. Rev. Virol.* 3, 237–261. 2016.

26. LIANG F.Y., LIN L.C., YING T.H., YAO C.W., TANG T.K., CHEN Y.W., HOU M.H. **Immunoreactivity characterisation of the three structural regions of the human coronavirus OC43 nucleocapsid protein by Western blot: Implications for the diagnosis of coronavirus infection.** *J. Virol. Methods.* 187:413–420, 2013.

27. LIN, Alice V. **Indirect ELISA.** *Methods Mol Biol.* 1318:51-9, 2015.

28. LIU K, CHEN Y, LIN R, HAN K. **Clinical features of COVID-19 in elderly patients: A comparison with young and middle-aged patients.** *J Infect.* 80(6):14-18, 2020.

29. LONG QX, LIU BZ, DENG HJ, WU GC, DENG K, CHEN YK, LIAO P, QIU JF, LIN Y, CAI XF, WANG DQ, HU Y, REN JH, TANG N, XU YY, YU LH, MO Z, GONG F, ZHANG XL, TIAN WG, HU L, ZHANG XX, XIANG JL, DU HX, LIU HW, LANG CH, LUO XH, WU SB, CUI XP, ZHOU Z, ZHU MM, WANG J, XUE CJ, LI XF, WANG L, LI ZJ, WANG K, NIU CC, YANG QJ, TANG XJ, ZHANG Y, LIU XM, LI JJ, ZHANG DC, ZHANG F, LIU P, YUAN J, LI Q, HU JL, CHEN J, HUANG AL. **Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19.** *Nat Med.* 6:845-848, 2020.

30. LU R., ZHAO X., LI J., NIU P., YANG B., WU H., et al. **Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding.** Lancet (London England) 395, 565–574, 2020.
31. LU X, PAN J, TAO J, GUO D. **SARS-CoV nucleocapsid protein antagonizes IFN- β response by targeting initial step of IFN- β induction pathway, and its C-terminal region is critical for the antagonism.** Virus Genes, 42(1):37-45 2011.
32. MADRUGA, C.R., ARAÚJO, F.R., SOARES, C.O. **Princípios, padronização e validação de provas sorológicas.** In: **Imunodiagnóstico em medicina Veterinária.** EMBRAPA, Campo Grande/MS-Brasil, 145-175, 2001.
33. MCBRIDE R, van ZYL M, FIELDING BC. **The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein.** Viruses. 6:2991-3018, 2014.
34. MORLEY, J. E; VELLAS, B. **COVID-19 And Older Adults.** J Nutr Health Aging. 24(4):364-365. 2020.
35. OH J, LEE JK, SCHWARZ D, RATCLIFFE HL, MARKUNS JF, HIRSCHHORN LR. **National Response to COVID-19 in the Republic of Korea and Lessons Learned for Other Countries.** Health Syst Reform., 2020.
36. SBPC/ML – Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial. **Métodos Laboratoriais para Diagnóstico da Infecção pelo SARS-CoV-2.** Disponível em: <<http://www.sbpcc.org.br/wp-content/uploads/2020/04/MetodosLaboratoriaisDiagnosticoSARS-CoV-2.pdf>>. Acesso em 14 out 2021.
37. SHAH K, MAGHSOUDLOU P. **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics.** Br J Hosp Med (Lond). Jul;77(7):C98-101, 2016.
38. SOARES, José Luiz Möller Flores et al. **Métodos diagnósticos: consulta rápida.** Porto Alegre: Artmed, 2007.
39. SPIEGEL M, PICHLMAIR A, MARTÍNEZ-SOBRIDO L, CROS J, GARCÍA-SASTRE A, HALLER O, WEBER F. **Inhibition of Beta interferon induction by severe acute respiratory syndrome coronavirus suggests a two-step model for activation of interferon regulatory factor 3.** J Virol. 79(4):2079-86, 2005.
40. TIZARD, I. **Introdução á Imunologia veterinária.** São Paulo Roca, 2ed. 545, 1998.
41. VANDENBERG O, MARTINY D, ROCHAS O, VAN BELKUM A, KOZLAKIDIS Z. **Considerations for diagnostic COVID-19 tests.** Nat Rev Microbiol., 3:171-183, 2021.

42. VAN WEEMEN BK, SCHUURS AH. **Immunoassay using antigen-enzyme conjugates**. FEBS Lett, 15:232–6, 1971.
43. VAZ, Adelaide José; MARTINS, Joilson de Oliveira; TAKEI, Kioko; BUENO, Ednéia Casagrande. **Imunoensaios: Fundamentos e aplicações**, 2018.
44. WANG MY, ZHAO R, GAO LJ, GAO XF, WANG DP, CAO JM. **SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development**. Front Cell Infect Microbiol. 10:587269, 2020.
45. WILSON N, KVALSVIG A, BARNARD LT, BAKER MG. **Case-fatality risk estimates for COVID-19 calculated by using a lag time for fatality**. Emerg Infect Dis;26(6), 2020.
46. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard**. Disponível em: < <https://covid19.who.int/> > acesso em 01 out. 2021.
47. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **COVID-19 Public Health Emergency of International Concern (PHEIC) global research and innovation forum**. [https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-public-health-emergency-of-international-concern-\(pheic\)-global-research-and-innovation-forum](https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-public-health-emergency-of-international-concern-(pheic)-global-research-and-innovation-forum) (2020).
48. YAN G, LEE CK, LAM LTM, YAN B, CHUA YX, LIM AYN, PHANG KF, KEW GS, TENG H, NGAI CH, LIN L, FOO RM, PADA S, NG LC, TAMBYAH PA. **Covert COVID-19 and false-positive dengue serology in Singapore**. Lancet Infect Dis. 5:536, 2020.
49. YESUDHAS D, SRIVASTAVA A, GROMIHA MM. **COVID-19 outbreak: history, mechanism, transmission, structural studies and therapeutics**. Infection. 49(2):199-213, 2020.
50. YORDE DE, SASSE EA, WANG TY, HUSSA RO, GARANCIS JC. **Competitive enzyme-linked immunoassay with use of soluble enzyme/antibody immune complexes for labeling. I. Measurement of human choriogonadotropin**. Clin Chem., 22:1372–7, 1976.
51. YÜCE M, FILIZTEKIN E, ÖZKAYA KG. **COVID-19 diagnosis -A review of current methods**. Biosens Bioelectron. 172:112752, 2021.
52. ZHAO J, YUAN Q, WANG H, LIU W, LIAO X, SU Y, WANG X, YUAN J, LI T, LI J, QIAN S, HONG C, WANG F, LIU Y, WANG Z, HE Q, LI Z, HE B, ZHANG T, FU Y, GE S, LIU L, ZHANG J, XIA N, ZHANG Z. **Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019**. Clin Infect Dis. 16:2027-2034. 2020.

53. ZHANG C., ZHENG W., HUANG X., BELL E. W., ZHOU X., ZHANG Y. **Protein Structure and Sequence Reanalysis of 2019-nCoV Genome Refutes Snakes as Its Intermediate Host and the Unique Similarity between Its Spike Protein Insertions and HIV-1.** J. Proteome Res. 19, 1351–1360, 2020.
54. ZHENG J. **SARS-CoV-2: an Emerging Coronavirus that Causes a Global Threat.** Int J Biol Sci. 1678-1685, 2020.
55. ZHU N, ZHANG D, WANG W, LI X, YANG B, SONG J, ZHAO X, HUANG B, SHI W, LU R, NIU P, ZHAN F, MA X, WANG D, XU W, WU G, GAO GF, TAN W; **China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019.** N Engl J Med. 382(8):727-733, 2020.

APÊNDICES

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO – TCLE**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE),
RESOLUÇÃO CNS Nº 466/2012, MS**

Prezado (a), o senhor (a) está sendo convidado a participar do projeto **EVOLUÇÃO DA PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO POR COVID-19 EM SERGIPE (EpiSERGIPE)**. Este estudo tem como objetivo principal, realizar testes rápidos para SARS-Cov-2 IgG e IgM na população, com a finalidade de contribuir para a avaliação da evolução dos casos de COVID-19 na população de Sergipe. É um estudo da Universidade Federal de Sergipe (UFS) em parceria com a Secretaria de Estado da Saúde (SES), que está sendo realizado em 15 municípios de Sergipe, são eles: Aracaju, Barra dos Coqueiros, Nossa Senhora do Socorro, São Cristóvão, Capela, Estância, Itabaianinha, Propriá, Tobias Barreto, Simão Dias, Lagarto, Itabaiana, Nossa Senhora da Glória, Canindé e Porto da Folha. A participação do senhor (a) é **VOLUNTÁRIA E GRATUITA**, para a realização do teste rápido para COVID-19 e para o preenchimento de um questionário de avaliação, que será feito pelo profissional que também irá realizar o seu teste. Nas perguntas que serão feitas, o senhor (a) poderá responder somente aquelas que não lhe causem desconforto, nem constrangimento. Caso o senhor (a) não consiga ler e assinar esse termo, outra pessoa responsável e autorizada por você poderá assiná-lo. Nesse caso, a pessoa responsável pela sua assinatura, terá que ler o termo para que você possa ouvi-lo e esperara sua aprovação para assiná-lo. Se depois de aceitar fazer o teste e responder as perguntas, ou em qualquer momento da coleta, o senhor (a) desistir de continuar participando, você tem o direito e a liberdade de avisar a equipe que não deseja mais participar, sem nenhuma penalidade ou despesa para o senhor (a). Nesse caso os seus dados não utilizados para a pesquisa. A equipe estará à disposição a todo momento para tirar qualquer dúvida que você tenha a respeito desse estudo ou caso prefira, também poderá fazer questionamentos sobre esse estudo ao CEP (Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos), esse órgão tem a função de aprovar e acompanhar de forma legal os estudos com seres humanos. Além disso, nenhum dado ou informação pessoal do senhor (a) será fornecido a nenhum outro setor ou pessoa, que não esteja responsável por esse estudo. Todas as informações aqui coletadas são mantidas em segredo, e serão utilizadas para os números do estudo, sem revelação da sua identidade pessoal. Para garantir isso, cada participante desse estudo receberá um código de identificação, de modo a garantir que a identidade do mesmo será preservada. É importante destacar que essa pesquisa envolve riscos mínimos e por se tratar de um estudo que está sendo feito nos domicílios, pode ocorrer algum imprevisto durante a realização da coleta para o exame. No entanto, todos os profissionais que estão presentes no estudo são devidamente capacitados para evitar qualquer imprevisto nesse momento. Mas caso aconteça algo nesse momento, o senhor (a) terá toda assistência médica gratuita necessária. Além disso, todas as medidas de prevenção necessárias serão adotadas para a sua proteção e para a proteção dos profissionais envolvidos. O principal benefício desse projeto é a ampliação do número de testes aplicados na população visando contribuir para as medidas de prevenção e controle do COVID-19 no estado de Sergipe. Devido a isso, caso o resultado do seu teste seja positivo, outros testes serão realizados de forma gratuita para confirmação dos resultados por meio da UFS, e depois estes

resultados serão enviados aos municípios, que farão o acompanhamento dos participantes durante o tempo necessário. Diante disto, gostaríamos de convidar o senhor(a) a participar dessa pesquisa. O senhor(a) tem todo o tempo que achar necessário para decidir, consultar seus familiares e/ou outras pessoas que possam te ajudar a tomar essa decisão e então nos dar a resposta. Caso aceite participar, por favor assine este documento nos campos indicados e caso tenha alguma dúvida ou necessidade, pode nos avisar antes de assinar. Gostaríamos de deixar claro que uma via deste documento assinada ficará com o senhor (a) e outra via com o pesquisador responsável pelo contato no seu domicílio. Além disso, o pesquisador e o senhor deverão rubricar todas as páginas desse termo.

Local e data: _____

Assinatura do voluntário ou responsável _____

Assinatura do Pesquisador (a): _____

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS

Prof. Dr. Adriano Antunes de S. Araújo
(email: adriasa2001@yahoo.com.br)

Profa. Dra. Renata Grespan
(email: grespanrenata@gmail.com)

Profa. Dra. Tatiana R. de Moura
(email: tmoura.ufs@gmail.com)

Profa. Dra. Cristiane Bani Correa
(email: crisbani@gmail.com)

Profa. Dra. Dulce Marta Schimieguel Mascarenhas Lima
(email: dulcemarta@hotmail.com)

Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Sergipe
(Contato: 3194-6319)

Contato CEP:

**Endereço: Rua Cláudio Batista, s/n - Cidade Nova, Aracaju – SE,
HospitalUniversitário da Universidade Federal de Sergipe,**

Telefones: (79) 3194 -7208

APÊNDICE B – PREPARO DO REAGENTE COLORIMÉTRICO PARA REVELAÇÃO (ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO)

Reagentes

10g de ácido cítrico ($C_6H_8O_7$)

0,5g de OPD (*ortho phenylenediamine*)

14,5g de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4)

Misturar bem e aliquotar 0,5g em microtubo

Manter a 4 °C até o momento de uso

Reagente colorimétrico (solução de uso para 2 microplacas de 96 poços):

Para cada alíquota de 0,5g do preparo:

Misturar 20 mL de água destilada

+ 10 μ L de peróxido de hidrogênio 30%

APÊNDICE C – Bula ensaio imunoenzimático (QUANTCOV IgG)

QUANTCOV IgG	8. Água destilada ou deionizada. 9. Ferramentas de Controle de Qualidade. 10. Incubadora de 37°C ± 2°C. 11. Selador de microplacas.
INSTRUÇÕES DE USO	CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO
FINALIDADE	A temperatura de armazenamento deverá ser de 2 a 8°C. Manter ao abrigo da luz e evitar umidade.
Teste para determinação quantitativa de anticorpos IgG anti- SARS-CoV-2 em soro por ensaio imunoenzimático (ELISA). Uso exclusivo para diagnóstico <i>in vitro</i>.	AMOSTRAS
PRINCÍPIO DE AÇÃO	Soro.
Metodologia: ensaio imunoenzimático indireto.	Amostras hemolisadas ou altamente lipêmicas não devem ser utilizadas. As amostras podem ser conservadas sob refrigeração, entre 2 e 8°C, pelo período máximo de 5 dias. Se as amostras não puderem ser analisadas dentro de 5 dias, podem ser estocadas por até 30 dias a temperatura de -20°C.
O teste baseia-se na detecção e quantificação <i>in house</i> e indireta de anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2, por meio do antígeno (proteína N). A proteína N recombinante foi selecionada pois apresenta elevada antigenicidade e imunogenicidade, multipotencialidade funcional e relação com a patogênese viral. Durante a incubação inicial, os anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2, presentes na amostra, ligam-se aos antígenos aderidos nos respectivos poços da microplaca formando o complexo antígeno-anticorpo. Após essa etapa a microplaca é lavada para remoção das partículas não ligadas. Posteriormente, são adicionados anticorpos anti-IgG humano conjugados à peroxidase, e a microplaca é novamente incubada, nessa etapa esses anticorpos conjugados ligam-se aos anticorpos IgG presentes na amostra e ligados aos antígenos aderidos aos poços. A microplaca é lavada, e com adição do substrato e mais uma incubação há a revelação da reação. A adição de solução de parada interrompe a reação e podem ser observadas alterações na coloração do meio, sendo diretamente proporcionais à quantidade de anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2 presentes nas amostras, determinada pela medida da absorbância em um espectrofotômetro de microplacas.	DESCRIÇÃO DO PROCESSO
METODOLOGIA	PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO
Reagentes	<i>Preparo da solução de lavagem:</i>
1. Microplaca de poliestireno de fundo chato com 96 poços. 2. Solução para sensibilização: proteína N na concentração de 100ng/poço diluída em PBS 1X. 3. Solução para bloqueio das ligações inespecíficas: PBS (Phosphate Buffered Saline) + BSA 2% (Bovine Serum Albumin) 4. Solução de lavagem concentrada (10X) 5. Diluente de amostra: PBS/BSA 2% 6. Anticorpos anti-IgG-humano conjugados à peroxidase 7. Solução reveladora: ácido cítrico (C₆H₈O₇), OPD (<i>ortho phenylenediamine</i>), fosfato de sódio (Na₂HPO₄), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), água destilada. 8. Controle positivo 7. Controle negativo 8. Solução de parada: ácido sulfúrico (H₂SO₄ 1M)	Diluir o conteúdo (100mL) do reagente concentrado (solução de lavagem concentrada) em 900 mL de água destilada ou deionizada. Após o preparo a solução pode ser estocada entre 2 a 30°C até a data de validade impressa no frasco original. Em caso de cristalização, a solução poderá ser aquecida a 37°C até dissolução.
EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS	<i>Preparo da solução para bloqueio das ligações inespecíficas:</i>
Materiais necessários: 1. Micropipetas para volumes de 5 a 300 µL. 2. Lavadora de microplaca (opcional). 4. Espectrofotômetro com capacidade de leitura de absorbâncias em comprimento de onda de 450 nm. 5. Papel absorvente para secar os poços. 6. Cronômetro ou relógio. 7. Frasco para estocar a Solução de Lavagem após diluída.	PBS (Phosphate Buffered Saline) + BSA 2% (Bovine Serum Albumin)
	<i>Preparo do reagente colorimétrico para revelação:</i>
	Misturar 10g de ácido cítrico, 0,5g de OPD e 14,5g de fosfato de sódio dibásico, armazenar alíquotas de 0,5g em microtubos. Manter a 4 °C até o momento de uso.
	Para cada alíquota de 0,5g dessa mistura deve-se dissolver, no momento do uso, em 20 mL de água destilada e adicionar 10 µL de peróxido de hidrogênio 30%.
	TÉCNICA
	Antes do início das reações, todos os reagentes devem ser colocados em temperatura ambiente.
	1. Separar e identificar os poços a serem utilizados. Inclusive os poços para os controles e para o Branco.
	2. Sensibilizar as placas pipetando 200 µL da solução de sensibilização em cada poço.
	3. Incubar a 4 °C <i>overnight</i>.
	4. Descartar o conteúdo dos poços por aspiração (Lavadora) ou por inversão da microplaca (Manual).
	5. Pipetar em cada poço 200 µL da solução de bloqueio.
	6. Cobrir os poços com selador de microplacas.
	7. Incubar a 37 °C por 2 (duas) horas.
	8. Retirar o selador.

9. Descartar o conteúdo dos poços por aspiração (Lavadora) ou por inversão da microplaca (Manual).

10. Lavar a microplaca com 200 µL aproximadamente de solução de lavagem, previamente preparada, totalizando 5 (cinco) ciclos de lavagem. Para secagem da placa, ao finalizar a lavagem, bater a placa por alguns segundos em papel absorvente.

11. Pipetar 100 µL das amostras e controles previamente diluídos na proporção de 1:500, nos respectivos poços. Nos poços Brancos pipetar apenas 100 µL de PBS/BSA 2%.

12. Cobrir os poços com selador de microplacas.

13. Incubar a 37 °C por 90 minutos.

14. Retirar o selador.

15. Descartar o conteúdo dos poços por aspiração (Lavadora) ou por inversão da microplaca (Manual).

16. Repetir o item 10.

17. Pipetar 100 µL da solução contendo anticorpos anti-IgG humana conjugados a peroxidase diluídos na proporção de 1:20.000 (concentração 1mg/mL) em todos os poços, inclusive no poço do Branco e homogeneizar.

18. Cobrir os poços com selador de microplacas.

19. Incubar a 37 °C por 90 minutos.

20. Retirar o selador.

21. Descartar o conteúdo dos poços por aspiração (Lavadora) ou por inversão da microplaca (Manual).

22. Repetir o item 10.

23. Pipetar 100 µL da solução reveladora em todos os poços, inclusive no poço do Branco e homogeneizar.

24. Cobrir os poços com selador de microplacas.

25. Incubar à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 20 minutos.

26. Retirar o selador.

27. Adicionar 50 µL da solução de parada em cada poço, para interromper a reação enzimática, inclusive no poço do Branco.

28. Realizar a leitura das absorbâncias, utilizando um espectrofotômetro de microplacas, em comprimento de onda de 450 nm.

VERIFICAÇÃO DA TÉCNICA

Verifique se os resultados obtidos para leitura dos Controles estão compatíveis com os valores apresentados abaixo:

	Absorbância
Controle Negativo	< 0,777
Controle Positivo	> 0,823

Caso os valores se encontrem fora dos valores esperados, deve-se repetir a técnica.

CÁLCULOS

Curva padrão

Preparo da Curva de Calibração

Registrar as absorbâncias obtidas na leitora de microplaca, como apresentado no exemplo 1. Calcular as médias das quadruplicatas (caso sejam realizadas quadruplicatas). Desenhar a curva de calibração, colocando as diluições dos anticorpos primários (padrão) no eixo das x e a absorbância obtida para cada calibrador no eixo y. As concentrações (ng/ml) correspondentes a cada amostra são obtidas por interpolação às absorbâncias de cada diluição do padrão.

Exemplo 1:

CURVA	Absorbâncias (450 nm)				Xm
1/10.000	2,495	2,192	2,450	2,520	2,414
1/20.000	1,595	1,542	1,533	1,500	1,543
1/40.000	0,944	0,939	0,883	0,897	0,916
1/60.000	0,583	0,556	0,574	0,532	0,561
1/80.000	0,485	0,509	0,487	0,495	0,494
1/100.000	0,411	0,402	0,384	0,386	0,396
1/140.000	0,302	0,307	0,286	0,292	0,297
1/200.000	0,243	0,272	0,230	0,235	0,245



INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

As amostras com valores de IgG embaixo de 11,49 ng/mL devem ser consideradas não reativas para anticorpos IgG anti- SARS-CoV-2.

As amostras com valores de IgG acima de 11,49 ng/mL devem ser consideradas reativas para anticorpos IgG anti- SARS-CoV-2.

SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE CLÍNICA

Em um estudo realizado com 101 amostras testadas previamente em que 66 apresentaram resultado positivo, indicando a presença de anticorpos IgG anti- SARS-CoV-2, e 35 apresentaram resultados negativos. A partir desses dados foi obtida uma sensibilidade de 94% e especificidade de 91%.

Avaliou-se a possibilidade de reatividade cruzada por meio da análise de 60 amostras, para os vírus da dengue, zika e chikungunya no ensaio imunoenzimático anti-SARS-CoV-2. Nenhuma amostra positiva para dengue ou Chikungunya foi positiva nesse teste, entretanto 2 (duas) amostras positivas para o zika vírus foram positivas no ensaio imunoenzimático quantitativo anti-SARS-CoV-2. Dentre as amostras negativas, apenas uma amostra negativa para dengue e 3 (três) para zika foram positivas nesse teste.

MATERIAL SUPLEMENTAR: TABELAS

Tabela 11: Comparação entre os resultados das absorbâncias do ensaio imunoenzimático quantitativo de amostras com teste FIA reagente (controle positivo) e não reagente (controle negativo), utilizando 50ng de antígeno e filtro de 450 nm.

	50ng	
	CN	CP
	1,561	1,557
	1,432	1,701
	1,356	2,095
	1,658	2,306
	1,513	1,603
	1,691	1,701
	1,495	1,890
	1,549	1,757
MÉDIA	1,532	1,826
DP	0,110	0,257

Tabela 12: Comparação entre os resultados das absorbâncias do ensaio imunoenzimático quantitativo de amostras com teste FIA reagente (controle positivo) e não reagente (controle negativo), utilizando 50ng e 100ng de antígeno filtro de 450 nm.

	50ng		100ng	
	CN	CP	CN	CP
	1,561	1,557	0,869	1,399
	1,432	1,701	0,984	1,080
	1,356	2,095	1,008	1,579
	1,658	2,306	1,382	2,011
	1,513	1,603	1,393	1,411
	1,691	1,701	1,717	1,657
	1,495	1,890	1,644	1,826
	1,549	1,757	1,668	1,325
MÉDIA	1,532	1,826	1,333	1,536

Tabela 13: absorvâncias do anticorpo primário (duplicata) utilizando amostras controle negativo para SARS-CoV-2, adicionados dois desvios-padrão e menos o valor do branco utilizado no ensaio imunoenzimático quantitativo.

Absorvância 450 nm		
CN01	0,501	0,484
CN02	0,515	0,510
CN03	0,461	0,442
CN04	0,363	0,369
CN05	0,455	0,438
CN06	0,414	0,416
CN07	0,499	0,483
CN08	0,388	0,366
CN09	0,530	0,429
CN10	0,532	0,490
MÉDIA+DP	0,398	

Tabela 14. Dados das amostras da análise de reação cruzada.

Nº	CÓDIGO	INICIAIS	INFECÇÃO	FIA	ELISA ng/mL
				IgG	(IgG)
				(+)>1,1 e (-) <0,9	(+) >3,75
1	RC 1	KDO	ZIKA NEGATIVO	0,0	6,53
2	RC 5	MCM	ZIKA NEGATIVO	0,0	-1,33
3	RC 6	LFSN	ZIKA NEGATIVO	0,0	-3,13
4	RC 7	AMSM	ZIKA NEGATIVO	0,0	-1,19
5	RC 8	AO	ZIKA NEGATIVO	0,0	-2,94
6	RC 9	GOG	ZIKA NEGATIVO	0,0	5,08
7	RC 10	JAA	ZIKA NEGATIVO	0,0	5,00
8	RC 13	ES	ZIKA POSITIVO	0,0	10,40
9	RC 17	LS	ZIKA POSITIVO	0,0	6,71
10	RC 18	ABMC	ZIKA POSITIVO	0,0	-2,68
11	RC 22	LKMC	CHIKUNGUNYA NEG	0,0	2,45
12	RC 23	DJP	CHIKUNGUNYA NEG	0,0	3,34
13	RC 24	MSR	CHIKUNGUNYA NEG	0,0	-4,55
14	RC 27	MLG	CHIKUNGUNYA NEG	0,0	-2,82
15	RC 29	JAC	CHIKUNGUNYA NEG	0,0	0,51
16	RC 30	AMSC	CHIKUNGUNYA NEG	0,0	2,00
17	RC 32	GO	CHIKUNGUNYA POSIT	0,0	-8,94
18	RC 34	RAS	CHIKUNGUNYA POSIT	0,0	-4,96
19	RC 36	RCS	CHIKUNGUNYA POSIT	0,0	3,55
20	RC 38	JEJ	CHIKUNGUNYA POSIT	0,0	2,91
21	RC 41	JVM	DENGUE NEGATIVO	0,0	-5,37
22	RC 42	ELMA	DENGUE NEGATIVO	0,0	-1,17
23	RC 43	AVR	DENGUE NEGATIVO	0,0	0,40
24	RC 44	AJS	DENGUE NEGATIVO	0,1	-0,96
25	RC 45	LAS	DENGUE NEGATIVO	0,2	-2,64
26	RC 48	MS	DENGUE NEGATIVO	0,0	7,04
27	RC 49	VVC	DENGUE NEGATIVO	0,0	-1,92
28	RC 50	GCF	DENGUE NEGATIVO	1,0	0,93
29	RC 52	GTO	DENGUE POSITIVO	0,0	-4,11
30	RC 53	CAM	DENGUE POSITIVO	0,4	-6,68
31	RC 57	BEM	DENGUE POSITIVO	0,0	-8,45
32	RC 58	IJC	DENGUE POSITIVO	0,2	-1,90
33	RC 59	JPS	DENGUE POSITIVO	0,0	-6,90
34	RC 60	JBND	DENGUE POSITIVO	0,0	-6,13

ANEXOS

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (EPISERGIPE)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EVOLUÇÃO DA PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO POR COVID-19 EM SERGIPE - EpiSERGIPE

Pesquisador: LUCINDO JOSE QUINTANS JUNIOR

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 33095120.4.0000.5546

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.645.771

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_1559862.pdf), postados em 20/01/2021.

INTRODUÇÃO:

A COVID-19, do Inglês "Coronavirus disease 2019", é uma doença causada por um novo coronavírus, cujos primeiros casos foram identificados na província de Hubei, cidade de Whuan na China, tendo oficialmente sido comunicada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 31 de dezembro de 2019. O vírus causador foi chamado inicialmente de 2019-nCov e posteriormente renomeado como SARS-CoV-2. A experiência prévia dos países asiáticos com a SARS, causada por um coronavírus similar nos anos de 2002 e 2003 auxiliou na descoberta e no enfrentamento da doença declarada como pandemia pela mesma OMS. Após mortes iniciais, a doença se espalhou pelo mundo, provocando no momento atual mais de 16.000 mortes no Brasil e mais de 60 mortes no Estado de Sergipe, no que ainda consideramos "fase de aceleração" da curva. A estratégia de testagem não previu, inicialmente, a busca ativa de indivíduos portadores assintomáticos ou que ainda não apresentaram manifestações da Covid-19. No entanto, já é de conhecimento o importante papel de assintomáticos como transmissores da doença, em processo de passagem silenciosa do vírus e que pode chegar a grupos de risco sem a percepção dos agentes de vigilância

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	

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.645.771

Ausência	TALE.pdf	13/07/2020 16:16:01	LUCINDO JOSE QUINTANS JUNIOR	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	13/07/2020 16:15:23	LUCINDO JOSE QUINTANS JUNIOR	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.docx	13/07/2020 16:14:28	LUCINDO JOSE QUINTANS JUNIOR	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

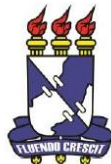
ARACAJU, 13 de Abril de 2021

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 B – TCLE E PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA (EFEITOS DO TREINAMENTO FUNCIONAL EM IDOSAS COM SOBREPESO)

1



Universidade Federal de Sergipe

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Pesquisador Responsável: José Carlos Aragão Santos (CREF:003467-G/SE)

Endereço: Avenida Perimetral I, Bairro Taíçoca, Nº 2016

CEP: 49.160-000 – Nossa Senhora do Socorro – SE

Fone: (79) 99900-4690

E-mail: carlosaragao.18@gmail.com

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A Sra. está sendo convidada como voluntária a participar da pesquisa EFEITOS DO TREINAMENTO FUNCIONAL SOBRE PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E INFLAMATÓRIOS, COMPOSIÇÃO CORPORAL E FUNCIONALIDADE EM IDOSAS COM SOBREPESO. Neste estudo pretendemos avaliar a influência do treinamento funcional sobre parâmetros relacionados a imunossenescência (envelhecimento do sistema imune) e *inflamm-aging* (inflamação crônica de baixo grau e não específica), composição corporal (massa magra, massa gorda, massa livre de gordura) e funcionalidade (testes que se assemelham as atividades cotidianas) em mulheres idosas com sobrepeso.

A razão que nos motiva a estudar tal temática é baseada nos benefícios que o exercício físico regular promove para a terceira idade. No entanto, o treinamento funcional ainda possui muitos pontos não esclarecidos com relação ao seu potencial efeito sobre parâmetros bioquímicos e aumento da massa muscular. Neste sentido, ao tratar do treinamento funcional, que é um método relativamente novo, mas que vem sendo bastante estudado, a literatura científica ainda não oferece muitas informações em relação aos benefícios imunológicos, inflamatórios, relacionados a hipertrofia e composição corporal associados a funcionalidade em mulheres idosas com sobrepeso.

Para este estudo adotaremos os seguintes procedimentos: Realizaremos um protocolo de exercícios físicos com a duração de vinte e três semanas em indivíduos da terceira idade (≥ 60 anos), visando analisar o efeito do treinamento funcional sobre pontos específicos em idosas com sobrepeso, controlando a ação de fatores externos e descrevendo o comportamento das variáveis observadas a partir da intervenção que terá duração de aproximadamente seis meses. Além disso, vale ressaltar que um dos grupos do estudo não realizará exercícios físicos e será aconselhado a manter suas atividades cotidianas e para diminuir a evasão realizará atividades em grupo de caráter lúdico nas dependências da instituição.

Para participar deste estudo você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido (a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. O pesquisador irá tratar a sua identidade de forma sigilosa, ou seja,

você não será exposta. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão.

A Sra. não será identificada em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas e a outra será fornecida a você.

Caso haja danos decorrentes dos riscos previstos, o pesquisador assumirá a responsabilidade pelos mesmos. Por exemplo, durante os testes antropométricos é possível que haja um desconforto em se expor perante o sexo oposto. Para evitar essa situação, os testes antropométricos serão realizados por uma profissional do sexo feminino objetivando um maior conforto e tranquilidade para você participante. Além disso, a avaliação nutricional será conduzida por um nutricionista habilitado para evitar qualquer inconveniente,

Nesta mesma linha de raciocínio, durante os testes físicos é possível que haja desconforto devido ao esforço físico realizado, caso isso aconteça haverá uma fisioterapeuta de plantão para o primeiro acompanhamento e médico capacitado. Em caso de necessidade, você será conduzida ao centro médico mais próximo, a saber Hospital de Urgência de Sergipe. No que diz respeito aos testes bioquímicos, você pode sentir um leve desconforto devido a coleta sanguínea e o período de jejum necessário, nesse sentido, haverá um enfermeiro capacitado fazendo a coleta e será disponibilizado um lanche para o desjejum após a coleta.

As avaliações referentes a composição corporal serão realizadas por dois aplicadores, um do sexo feminino e outro do sexo masculino para garantir a integridade da avaliação e oferecer mais conforto a você participante durante esse momento no qual pode sentir desconforto por utilizar roupas leves.

No que abrange o treinamento físico, o mesmo pode ocasionar desconforto devido ao esforço e possivelmente alguma lesão física. Para evitar isso, profissionais de educação física capacitados acompanharão você durante todo o treinamento para orientar e garantir sua segurança. Caso ocorra algo inesperado, os primeiros cuidados serão realizados por uma fisioterapeuta com capacitação para realizar os primeiros socorros e você será conduzida ao Hospital de Urgência de Sergipe.

Já no grupo que não realizará treinamento, as atividades lúdicas podem gerar algum tipo de desconforto por estar em contato com outras idosas realizando atividades que visam a interação. Nesse sentido, haverá uma psicóloga e fisioterapeuta acompanhando todas as interações realizadas para garantir a execução segura e saudável das atividades. Desse modo, oportunizando um momento de lazer e mantendo você em contato com o projeto.

Como benefícios diretos do projeto, vale destacar o aumento da força, potência e massa muscular. Além disso, melhora da autonomia e independência na realização das atividades cotidianas. Como benefícios indiretos, haverá aumento da socialização (novas amizades), melhora da autoestima, melhora do humor, mudança no estilo de vida. Além disso, melhora da composição corporal, aumento da força muscular, maior autonomia e independência. Portanto, esse projeto objetiva a promoção da saúde e qualidade de vida para a população da 3ª idade.

Eu, _____, portador do documento de Identidade _____ fui informado (a) dos objetivos do estudo EFEITOS DO TREINAMENTO FUNCIONAL SOBRE PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E INFLAMATÓRIOS, COMPOSIÇÃO CORPORAL E FUNCIONALIDADE EM IDOSAS COM SOBREPESO, de maneira clara, detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

São Cristóvão _____ de _____ de 2019.

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador

São Cristóvão SE, 2019



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITOS DO TREINAMENTO FUNCIONAL SOBRE PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E INFLAMATÓRIOS, COMPOSIÇÃO CORPORAL E FUNCIONALIDADE EM IDOSAS COM SOBREPESO

Pesquisador: Marzo Edir da Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 06970919.0.0000.5546

Instituição Proponente: Departamento de Educação Física

Patrocinador Principal: FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.225.938

Apresentação do Projeto:

O envelhecimento é acompanhado por uma série de alterações a nível físico e fisiológico que podem afetar a autonomia e independência de idosos, como o aumento da adiposidade e redução da força. Dentre as possíveis formas de atenuar tais mudanças, o treinamento funcional se destaca por englobar diversas capacidades físicas numa única sessão e ser específico para as necessidades do praticante. Entretanto, não está claro se o mesmo é capaz de promover alterações na imunidade, perfil inflamatório e composição corporal de idosos com sobrepeso e se essas respostas podem ser acompanhadas por alterações na funcionalidade.

Hipótese: O treinamento funcional promoverá uma redução do número de células T senescentes, aumento de citocinas anti-inflamatórias, redução das citocinas inflamatórias, redução do tecido adiposo, aumento da massa muscular e aumento no desempenho em testes funcionais de idosos com sobrepeso.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Verificar a influência do treinamento funcional sobre os parâmetros imunológicos e inflamatórios, composição corporal e funcionalidade de idosos com sobrepeso.

Objetivos Secundários:

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº

Bairro: Sanatório

CEP: 49.060-110

UF: SE

Município: ARACAJU

Telefone: (79)3194-7208

E-mail: cephu@ufs.br



UFS - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SERGIPE



Continuação do Parecer: 3.225.938

- Identificar o perfil de células T CD4 e CD8 senescentes, bem como moléculas expressas em sua superfície (KLRG1+, CD57+, CD28-) em resposta ao treinamento aplicado;
- Investigar as respostas de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, CRP, TNF-) e anti inflamatórias (IL-4, IL-10) ao treinamento proposto;
- Analisar o efeito do treinamento sobre a área de secção transversa do vasto lateral;
- Verificar as modificações na composição corporal;
- Avaliar as adaptações na funcionalidade;
- Mensurar as alterações na qualidade de vida percebida.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

- Possibilidade de mal-estar e desconforto durante a realização do exercício, visto que o treinamento físico consiste na aplicação de um esforço controlado;
- Algum tipo de constrangimento em decorrência das atividades em grupo;

Benefícios:

- Melhora da aptidão física e do estado geral de saúde;
- Aumento das relações interpessoais;
- Aumento da autonomia, independência e autoestima

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um ensaio clínico controlado, randomizado por blocos, composto por três braços experimentais, com duração de 23 semanas das quais duas serão destinadas à familiarização, 16 à aplicação do protocolo de exercícios e as demais para avaliações. Um grupo realizará treinamento funcional (grupo experimental), outro treinamento concorrente (controle positivo) e um grupo não realizará nenhuma atividade física regular (controle negativo) e será aconselhado a manter suas atividades habituais. As variáveis dependentes

(parâmetros imunológicos e inflamatórios, composição corporal e funcionalidade serão mensuradas através de testes padronizados e confiáveis para detectar as variações em resposta à intervenção e minimizando os efeitos de fatores intervenientes como aspectos nutricionais (recordatório alimentar). A amostra será composta por 90 idosos

sedentárias em estado de sobrepeso que serão aleatoriamente distribuídas por 3 grupos:

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº

Bairro: Sanatório

UF: SE

Município: ARACAJU

Telefone: (79)3194-7208

CEP: 49.060-110

E-mail: cephu@ufs.br



UFS - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SERGIPE



Continuação do Parecer: 3.225.938

treinamento funcional (TF-30); treinamento concorrente (TC-30); ou grupo controle (CG-30). Para alcançar o número de participantes necessário, a amostra será recrutada por meio de panfletagem nos arredores da universidade e divulgação em mídias digitais.

O peso corporal e a estatura serão obtidos por meio de uma balança digital com estadiômetro acoplado (Lider®, P150C, São Paulo, Brasil. A relação cintura-quadril será obtida através da mensuração com fita métrica.

O Acompanhamento nutricional Será por meio de recordatório alimentar de três dias não consecutivos (dois dias da semana e um dia do final de semana) acompanhando os momentos de avaliação. A quantificação do consumo de macronutrientes (proteínas, carboidratos e lipídios) e consumo energético serão avaliados através do software (Avanutri Processor Software, Rio de Janeiro, Brasil; Versão 3.1.4). As participantes serão orientadas a manter os seus hábitos alimentares durante toda a intervenção. No treinamento de Hipertrofia muscular será utilizada a área de secção transversa do vasto lateral da coxa direita mensurada através de ultrassonografia (US) com base no método utilizado por Lixandrão et al. (2016). A Composição corporal será aferida por meio do sistema para obtenção de dados de bioimpedância elétrica (TANITA BC-108, TÓQUIO, JAPÃO). A Funcionalidade será aferida por meio de testes que se assemelham as atividades cotidianas, sendo estes: Gallon-Jug Shelf-Transfer (SIGNORILE et al., 2007); Sentar e Levantar do Solo (BRITO et al., 2014); Sentar e Levantar em 5 Repetições (GURALNIK et al., 1994); levantar e Caminhar (BISCHOFF et al., 2003); Tirar e Colocar a Camisa (DANTAS e VALE, 2004); Velocidade de 10 metros (NOVAES et al., 2011); Counter Movement Jump (MARKOVIC et al., 2004). Será aplicado o Questionário de Qualidade de Vida (FLECK et al., 2000). A Coleta sanguínea realizada para obtenção de hemograma completo e perfil lipídico, células T senescentes e as moléculas expressas serão analisadas através de citometria de fluxo, e os níveis de citocinas serão analisadas por ensaio imune enzimático. O Protocolo de Treinamento envolverá três sessões de treinamento por semana com duração de aproximadamente 45 minutos, contabilizando um total de 48 encontros separados entre si por um intervalo mínimo de 48 horas. Além disso, os exercícios serão realizados a máxima velocidade concêntrica visando estimular a melhora da potência muscular. Nesse sentido, cada sessão de treinamento será constituída por quatro blocos separados entre si por um intervalo de 2 minutos, supervisionados por profissionais experientes, buscando integrar diversas capacidades físicas e diminuir a concorrência entre as mesmas pela sistematização da sessão e controle da intensidade a partir

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº

Bairro: Sanatório

UF: SE

Município: ARACAJU

Telefone: (79)3194-7208

CEP: 49.060-110

E-mail: cephu@ufs.br



UFS - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SERGIPE



Continuação do Parecer: 3.225.938

da escala OMNI-GSE (DA SILVAGRIGOLETTO et al., 2013).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Pendência referente à descrição dos riscos e benefícios no TCLE atendida.
- Cronograma atualizado, indicando a coleta de dados para posterior a provação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram observados óbices éticos.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1283405.pdf	18/02/2019 22:12:58		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	18/02/2019 22:12:25	JOSE CARLOS ARAGAO SANTOS	Aceito
Orçamento	orcamento.jpg	18/02/2019 22:11:44	JOSE CARLOS ARAGAO SANTOS	Aceito
Cronograma	cronograma.png	18/02/2019 22:04:42	JOSE CARLOS ARAGAO SANTOS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	18/02/2019 22:04:18	JOSE CARLOS ARAGAO SANTOS	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRostoAssinada.pdf	25/01/2019 14:46:05	JOSE CARLOS ARAGAO SANTOS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARACAJU, 27 de Março de 2019

Assinado por:
Anita Hermínia Oliveira Souza
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº

Bairro: Sanatório

UF: SE

Município: ARACAJU

Telefone: (79)3194-7208

CEP: 49.060-110

E-mail: cephu@ufs.br