

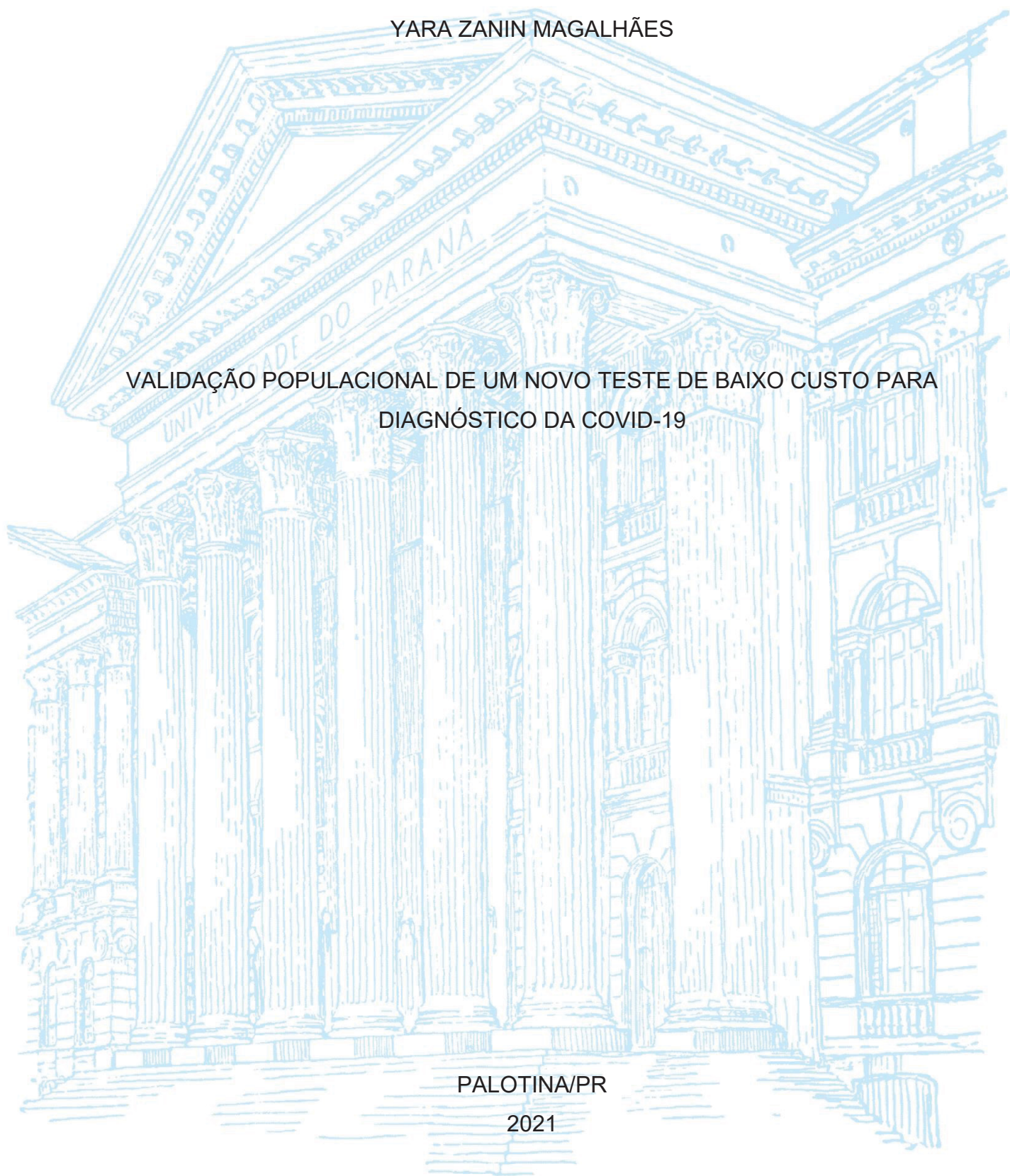
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

YARA ZANIN MAGALHÃES

VALIDAÇÃO POPULACIONAL DE UM NOVO TESTE DE BAIXO CUSTO PARA
DIAGNÓSTICO DA COVID-19

PALOTINA/PR

2021



YARA ZANIN MAGALHÃES

VALIDAÇÃO POPULACIONAL DE UM NOVO TESTE DE BAIXO CUSTO PARA
DIAGNÓSTICO DA COVID-19

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Carneiro Brandalize

Coorientadora: Profa. Dra. Kádima Nayara Teixeira

PALOTINA/PR

2021

Ficha catalográfica

Universidade Federal do Paraná. Sistemas de Bibliotecas.

Biblioteca UFPR Palotina.

M189 Magalhães, Yara Zanin
Validação populacional de um novo teste de
baixo custo para diagnóstico da Covid -19 [recurso
eletrônico] / Yara Zanin Magalhães. -- Palotina, PR,
2021.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do
Paraná, Setor Palotina, PR , Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, 2021.

Orientadora: Ana Paula Carneiro Brandalize
Coorientadora: Kádima Nayara Teixeira

1. COVID-19. 2. SARS-CoV-2. 3.
Imunoabsorção enzimática (ELISA). I. Brandalize, Ana Paula
Carneiro. II.
Teixeira, Kádima Nayara. III. Universidade Federal
do Paraná. IV. Título.

CDU 606

Bibliotecária: Aparecida Pereira dos Santos – CRB 9/1653

TERMO DE APROVAÇÃO

YARA ZANIN MAGALHÃES

TÍTULO DO TRABALHO

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Profa. Dra. Ana Paula Carneiro Brandalize
Orientadora – Campus Toledo, UFPR

Profa. Dra. Juliana Bernardi Wenzel
Campus Toledo, UFPR

Prof. Dr. Fabrício Freire de Melo
Instituto Multidisciplinar em Saúde
Campus Anísio Teixeira, UFBA

Palotina, __ de _____ de 2021.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOTECNOLOGIA
40001016083P6

1 TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOTECNOLOGIA da

Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **YARA ZANIN**

MAGALHÃES intitulada: **VALIDAÇÃO POPULACIONAL DE UM NOVO TESTE SOROLÓGICO DE BAIXO CUSTO PARA COVID19**, sob orientação da Profa. Dra. ANA PAULA CARNEIRO BRANDALIZE, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 30 de Setembro de 2021.

Assinatura Eletrônica
04/10/2021 16:03:17.0
ANA PAULA CARNEIRO BRANDALIZE
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
13/10/2021 12:03:15.0
FABRÍCIO FREIRE DE MELO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA)

Assinatura Eletrônica
01/10/2021 15:23:02.0
JULIANA BERNARDI WENZEL
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico a Deus pelo dom da vida e a minha família, em especial a minha filha Rafaella Zanin Mendes. E em memória aos meus pais Diamiro da Silva Magalhaes e Claudete Maria Magalhães que lá de cima, devem estar orgulhosos dessa minha caminhada vitoriosa. Enfim obrigada a todos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço as professoras Ana Paula Brandalize e Kádima Nayara Teixeira, que me ajudaram e incentivaram a eu estar sempre melhorando, me ensinado e me guiando em meio das dificuldades e ao pelo Prof. Dr. Luciano Huergo pelo desenvolvimento deste novo teste e fornecimento dos materiais para realização dessa pesquisa. Ao grupo maravilhoso que estive nessa jornada da validação, alunos excepcionais, Alan S. Honorato, Anna L. Maffessoni, Diana L. Duessmann, Gabrielle Peiter, Isadora M. Pilati, Leonardo Azevedo, Nathan Facin, Tarlliza Nardelli, Vitor

Mota, que futuramente serão ótimos profissionais. Ao meu irmão Diego Zanin Magalhães que me deu suporte e incentivo para continuar nessa caminhada, aos meus amigos e demais familiares que me apoiaram em todos os momentos. E a instituição da UFPR por me proporcionar um conhecimento tão grande e rico não só para minha área profissional, mas também para minha vida pessoal.

Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a beleza libertadora do intelecto para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer. (ALBERT EINSTEIN)

RESUMO

Um novo vírus surgido em dezembro de 2019, deixa em alerta não apenas o Brasil como todos os demais países. Sendo assim testes laboratoriais acurados e baratos são essenciais para o manejo da pandemia global da COVID-19. Os testes moleculares baseados em RT-qPCR são o padrão ouro para o diagnóstico de SARS-CoV-2, no entanto algumas questões práticas podem limitar seu uso. Imunoensaios têm sido indicados como alternativa para identificação da presença de anticorpos IgM e IgG relacionados a esta infecção. O objetivo deste trabalho foi validar, populacionalmente, um novo teste sorológico de baixo custo baseado na técnica de imunoabsorção enzimática (ELISA) para detecção de IgG para imunodiagnóstico da COVID-19. Sendo conduzido um ensaio duplo cego de um novo teste sorológico (Teste UFPR) e um teste comercial similar recomendado pela ANVISA. Foram incluídos no estudo 348 indivíduos, sendo 158 voluntários com diagnóstico molecular positivo para SARS-CoV-2 e 190 voluntários com diagnóstico molecular negativo para a doença. O Teste UFPR apresentou maior sensibilidade do que o Teste comercial. Os resultados de especificidade e acurácia demonstraram que o teste comercial foi ligeiramente mais específico e acurado que o teste da UFPR. Os valores preditivos positivos e negativos foram similares para ambos os testes. No que diz respeito a falso positivo e falso negativo, o teste UFPR apresentou menor chance de ter resultados falso positivo enquanto o teste comercial apresentou mais chance de falso negativo. Os testes de Razão de verossimilhança positiva e negativa mostrou que o teste da UFPR é um teste mais confiável e de melhor diagnóstico que o comercial utilizado. De maneira geral, o teste apresenta desempenho similar ao Teste comercial já aprovado pela ANVISA e apresenta potencial para ser utilizado na fase de desaceleração da pandemia e controle da imunidade da população já vacinada.

Palavras-chave: IgM, IgG ; Imunoabsorção enzimática (ELISA).

ABSTRACT

Accurate and inexpensive laboratory tests are essential for managing the global COVID-19 pandemic. RT-qPCR-based molecular tests are the gold standard for the SARS-CoV-2 diagnosis, however some practical issues may limit their use. Immunoassays have been indicated as an alternative to identify the presence of IgM and IgG antibodies related to this infection. The objective of this study was to validate a new low-cost ELISA-based serological test for IgG detection for COVID-19 immunodiagnosics. We conducted a double-blind trial of a new serological test (UFPR Test) and a similar commercial test recommended by ANVISA. The study included 348 individuals, 158 volunteers with positive molecular diagnosis for SARS-CoV-2 and 190 volunteers with negative molecular diagnosis for the disease. The UFPR Test showed higher sensitivity than the commercial test. Specificity and accuracy results showed that the commercial test was slightly more specific and accurate than the UFRP test. Regarding the PPV (Positive Predictive Value) and NPV (Negative Predictive Value) they were similar for both tests. Regarding false positives and false negatives, the UFPR test was less likely to have false positive results while the commercial test was less likely to have false negatives. Positive and negative likelihood ratio tests showed that the UFPR test is a more reliable and better diagnostic test than the commercial one. In general, the test has a performance similar to the commercial test already approved by ANVISA and has the potential to be used in the deceleration phase of the pandemic and control of the immunity of the population already vaccinated.

Keywords: COVID-19; SARS-CoV-2; Serological test; Enzyme Immunoabsorption (ELISA).

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estrutura biológica e genômica de 2019-nCoV.....	23
FIGURA 2 - A enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2)	24
FIGURA 3 – Tipos de ELISA (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)	29

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Distribuição dos voluntários RT-qPCR positivos e negativos para a validação do teste UFPR de acordo com o sexo.....	39
GRÁFICO 2 - Distribuição dos voluntários RT-qPCR positivos e não reagentes por sorologia usando o teste UFPR, de acordo com a idade.....	41
GRÁFICO 3 - Distribuição dos voluntários RT-qPCR positivos e negativos analisados pelo teste comercial de acordo com o sexo.....	42

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Testes sorológicos tipo ELISA para COVID-19 em vigor no Brasil	30
TABELA 2 - Distribuição dos voluntários RT-qPCR positivos e negativos de acordo com a reatividade para SARS-CoV-2 por sorologia usando o teste UFPR.....	38
TABELA 3 - Distribuição dos voluntários RT-qPCR positivos e negativos de acordo com a faixa etária	39
TABELA 4 - Distribuição dos voluntários RT-qPCR positivos e não reagentes pelo teste UFPR de acordo com o tempo decorrido entre o aparecimento dos sintomas da COVID-19/positividade por RT-qPCR e a coleta da amostra para sorologia	40
TABELA 5 - Distribuição dos voluntários RT-qPCR positivos e negativos de acordo com a reatividade para COVID-19 por sorologia usando o <i>kit</i> comercial.....	41
TABELA 6 -- Distribuição dos voluntários RT-qPCR positivos e negativos de acordo com a faixa etária.....	42
TABELA 7 - Frequência relativa (%) dos voluntários RT-qPCR positivos para SARS-CoV-2, reagentes e não reagentes, para os testes sorológicos.....	43
TABELA 8 - Distribuição das frequências absolutas e relativas dos voluntários RT-qPCR positivos para SARs-CoV-2 que apresentaram reatividade nos testes sorológicos.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

+ssRNA - *Positive-sense single-stranded RNA*
ACE2 - Enzima Conversora de Angiotensina 2
AGN2 - Angiotensina 2
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BRA - Bloqueadores dos Receptores de Angiotensina
cDNA - Ácido Desoxirribonucleico complementar
COE-nCoV - Centro Operacional de Emergências em Saúde Pública
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
E - Envelope
E - Especificidade
ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
ESPII - Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional
ESPIN - Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional
iACE2 - Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina 2
IC – Intervalo de confiança
IFN - Interferon
IgG - imunoglobulina G
IgM - Imunoglobulina M
LTDA. - Limitada
M - Membrana
MERS-CoV - Síndrome respiratória do Oriente Médio do Coronavírus
mL - Mililitros
mm - Milímetros
N - Nucleocapsídeo
nm - Nanômetro
NPIs - Intervenção Não Farmacêutica
Nsp – Proteína do nucleocapsídeo
OMS - Organização Mundial da Saúde
PAMPs - Padrões Moleculares Associados a Patógenos
pH - Potencial hidrogeniônico
POC - *Point of care*
RDB - Domínio receptor-obrigatório

RdRp - RNA polimerase dependente de RNA

RNA - Ácido ribonucleico

rpm- Rotação por minuto

RT-qPCR - Reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase quantitativa

S - *Spike*

S1 - Subunidade 1

S2 - Subunidade 2

SARS-CoV-2 - Síndrome respiratória aguda grave do Coronavírus 2

S - Sensibilidade

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecimento

TLR 3 - *Toll-like receptors 3*

TLR 7 - *Toll-like receptors 7*

TMB - Tetra-metil-benzidina

TMPRSS2 - Protease transmembrana serina 2

UFPR - Universidade Federal do Paraná

USA - *United States of America*

VPN - Preditivo Negativo

VPP - Valor Preditivo Positivo

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – Graus Célsius

® - Marca registrada

% - Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	JUSTIFICATIVA.....	17
1.2	OBJETIVOS	18
1.2.1	Objetivo geral	18
1.2.2	Objetivos específicos.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	Histórico do coronavírus.....	19
2.1	Histórico do coronavírus no Brasil.....	20
2.3	O VÍRUS.....	21
2.3.1	Proteína de Nucleocapídeo (N).....	22
2.3.2	Proteína de Envelope (E).....	22
2.3.3	Proteína de Membrana (M).....	22
2.3.4	Proteína de Pico ou <i>Spike</i> (S).....	22
2.4	Infecção por SARS-CoV-2.....	24
2.5	Teste para diagnóstico da COVID-19.....	26
2.5.1	Teste molecular/Deteção pelo método RT-qPCR.....	27
2.5.2	Testes sorológicos.....	28
2.5.2.1	Deteção pelo método fluxo lateral.....	28
2.5.2.2	Deteção pelo método ELISA.....	29
2.5.3	Testes sorológicos tipo ELISA para diagnóstico da COVID-10 no Brasil.....	30
3	MATERIAL E MÉTOD.....	32
3.1	Cálculo amostral.....	32
3.2	Amostra.....	32
3.3	Coleta de sangue e aplicação de questionário.....	33
3.4	Teste sorológico de imunoensaio (ELISA).....	34
3.5	Análise de dados.....	35
3.6	Aspectos éticos.....	35
4	APRESENTAÇÃO DE RESULTADOS	35
5	DISCUSSÃO.....	41
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44
6.1	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	44
	REFERÊNCIAS	46

APÊNDECE 1 – TESTE SOROLÓGICO VALIDAÇÃO UFPR.....	51
ANEXO 2 –TESTE SOROLÓGICO COMERCIAL.....	57

2 INTRODUÇÃO

No fim do ano de 2019, foi relatada uma nova pneumonia de etiologia desconhecida em Wuhan, na província de Hubei, na China. A partir do rápido avanço e consequente disseminação do novo vírus para outros países, iniciou-se uma corrida para identificar o agente etiológico, o que ocorreu em janeiro de 2020 quando foi identificado como um novo coronavírus, classificado como SARS-CoV-2, causador da doença COVID-19 (*Coronavirus disease*) (ZHU et al., 2020).

Desde então, a OMS (Organização Mundial da Saúde) declarou esse cenário como uma emergência de saúde global. Para detecção laboratorial deste vírus, o principal teste de diagnóstico da COVID-19 é o teste molecular de RT-qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa por transcriptase reversa). Entretanto, este teste pode apresentar alta taxa de falsos negativos, já que a quantidade de RNA detectada por meio da coleta de amostras de nasofaringe varia muito em diferentes estágios de infecção (CASTRO et al., 2020). Outra limitação deste teste diz respeito a real identificação de infectados assintomáticos para que se possa isolar estes casos de forma efetiva e quebrar a cadeia de propagação do vírus. Fica evidente, portanto, que é urgente a necessidade de oferecer um método de diagnóstico que possa auxiliar na identificação de pacientes infectados pelo SARS-CoV-2. O desenvolvimento de testes de diagnóstico mais simples de serem executados e que apresentem alta sensibilidade e especificidade para a doença podem contribuir para o controle da pandemia.

Sendo assim, os testes para diagnóstico da COVID-19 são um ponto importante para a detecção de indivíduos infectados e conhecimento sobre a dinâmica de infecção de novos casos. Tais testes também auxiliam a desenvolver políticas de saúde pública, como as de isolamento social, na tentativa de conter o aumento da pandemia. Porém, o custo elevado do diagnóstico molecular inviabiliza a detecção em massa em nosso país. Logo, um teste sorológico com alta sensibilidade e especificidade, e de baixo custo, se torna necessário.

Neste contexto, este trabalho propôs a validação populacional de um novo teste sorológico nacional e de baixo custo para o diagnóstico da COVID-19. Tal teste foi desenvolvido e validado laboratorialmente pela equipe de pesquisa do Prof. Luciano Fernandes Huergo - Setor Litoral/UFPR. Devido à eficácia e ao baixo custo do teste (aproximadamente R\$ 10,00), espera-se que este novo teste sorológico possa ser

utilizado em diferentes populações para acompanhamento e controle nas fases de desaceleração da pandemia (como isolamento dos doentes, rastreamento de contatos, dimensionamento e regulação dos leitos disponíveis para atendimentos dos pacientes).

2.1 JUSTIFICATIVA

Os testes de diagnóstico para COVID-19 ganharam importante destaque na atual pandemia, como uma ferramenta essencial para rastrear a propagação da doença. Levando em consideração o atual cenário em relação aos diagnósticos da COVID-19, o interesse em realizar esse estudo surgiu mediante à evidente necessidade de disponibilizar um teste de baixo custo, eficiente e acessível.

Os problemas relacionados à diagnósticos da COVID-19 vão desde custos elevados em decorrência de falta de insumos ou utilização de matéria prima importada para confecção destes testes, até a dificuldade de redução nas restrições em decorrência da transmissão desenfreada do vírus. Dessa forma, o desenvolvimento de um novo teste sorológico para diagnóstico da COVID-19, bem como a validação populacional deste teste pode possibilitar que este seja utilizado na detecção da infecção por SARS-CoV-2. Como principal vantagem, estaria a origem nacional, que reduziria os custos da manufatura, propiciando sua utilização para o diagnóstico em larga escala.

De acordo com o Centro de Operações em Emergência em Saúde Pública, vinculado ao Ministério da Saúde, a decisão de testar os pacientes para a presença do vírus deve basear-se em critérios clínicos, fatores epidemiológicos e vinculados à uma avaliação da probabilidade de infecção (ZETTI et al., 2020). O aumento da oferta de testes sorológico para detecção de IgM e IgG impacta no enfrentamento da pandemia de diversas formas, entre elas (LIPPI et al., 2020):

- 1) A possibilidade de confirmação do diagnóstico etiológico da doença;
- 2) Contribuição com a vigilância epidemiológica, tanto de profissionais que atuam em diferentes setores produtivos quanto de pacientes infectados;
- 3) A possibilidade de monitoramento de pacientes infectados, porém assintomáticos para verificar a extensão da viremia e sua associação à severidade da doença.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo geral

Validar um teste sorológico nacional baseado em imunoabsorção enzimática (ELISA) para COVID-19, desenvolvido pela equipe de pesquisa do Dr. Luciano Fernandes Huergo, professor da UFPR – Setor Litoral.

2.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a acurácia (sensibilidade, especificidade e valores preditivos) do novo teste sorológico para o diagnóstico COVID-19;
- Comparar a sensibilidade e especificidade do novo teste sorológico tendo como base o teste padrão ouro para COVID-19 (RT-qPCR);
- Comparar a sensibilidade e especificidade do novo teste sorológico tendo como base um *kit* de teste sorológico comercial aprovado pela ANVISA;
- Determinar a sensibilidade, especificidade e acurácia do novo teste sorológico em detectar a presença de anticorpos IgG específicos de acordo com o tempo, após os primeiros sintomas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico da pandemia do novo coronavírus

No fim do mês de dezembro de 2019 houve o primeiro relato sobre grupos de pacientes com pneumonia de causa desconhecida, os quais estavam epidemiologicamente ligados ao mercado de frutos do mar em Wuhan, na China. O patógeno, um novo coronavírus (SARS-CoV-2), foi identificado como responsável pelo desenvolvimento da doença associada ao novo coronavírus, a COVID-19 (ZHU et al., 2020). Devido a rápida disseminação para o mundo, em 30 de janeiro de 2020, a OMS declarou a COVID-19 como uma “emergência de saúde pública de importância internacional” (LI et al., 2020).

O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA de cadeia simples e sentido único, de morfologia esférica (icosaédrico), com uma estrutura de superfície (envelope) que confere uma característica semelhante à uma coroa. Devido a estas características, pertence a família Coronaviridae, que é agrupada em quatro gêneros: *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gamacoronavirus* e *Deltacoronavirus*, sendo o SARS-CoV-2 pertencente ao gênero *Betacoronavirus* (ATZRODT et al., 2020).

A COVID-19 atinge pessoas de ambos os sexos e em qualquer idade. Sua transmissão ocorre por meio do contato direto pelas mucosas das vias aéreas; ou indireto por aerossóis, com aumento da transmissão em lugares relativamente fechados e com exposição por longos períodos tempo. O tempo de incubação assintomática pode ser de 2 a 14 dias, período no qual ocorre a formação de partículas virais que podem ser transmitidas para outro hospedeiro (CITAÇÃO).

A COVID-19 possui um amplo espectro de apresentações clínicas, variando desde casos assintomáticos, passando por casos com sintomatologia leve nos quais nenhuma intervenção se faz necessária, até casos muito graves de síndrome respiratória aguda severa. Apesar de a maioria dos casos ter uma boa evolução clínica, a mortalidade em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva pode chegar a 70% (TSAI et al., 2021).

Os principais sintomas relatados são: febre, cefaleia, perda de olfato e paladar, dores musculares, cansaço, além de sintomas gastrointestinais como náusea, vômito e diarreia (WANG et al., 2020). A taxa de letalidade pela infecção por SARS-CoV-2 no mês de julho de 2020, antes da vacina, era de 1,2 a 1,6%, sendo

agravada nas idades acima de 60 anos e em algumas comorbidades (CANDIDO et al., 2020).

À medida que o vírus se espalhava ao redor do mundo, iniciaram-se medidas protetivas, pois a doença era desconhecida e ainda não se sabia como poderia ser contida. De acordo com os conhecimentos da época, por se tratar de uma doença respiratória e de contágio interpessoal, vários países pelo mundo abordaram algumas medidas para desacelerar a contaminação, como bloqueios sanitários exemplos: bloqueios uso de máscara, distanciamento social, álcool 70%, fazendo também restrições de viagens e reuniões, fechamento do comércio e escolas (ATZRODT et al., 2020).

2.2 Histórico do coronavírus no Brasil

Com um novo vírus circulante no mundo, e após a OMS declarar Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII), o Brasil em 3 de fevereiro de 2020 declarou Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN), e por meio da portaria nº 188, foi estabelecido o Centro Operacional de Emergências em Saúde Pública (COE-nCoV), de responsabilidade da secretaria de vigilância em saúde (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020a) na tentativa de minimizar os danos que estariam por vir em virtude da pandemia mundial que se espalhava em um ritmo muito acelerado.

O primeiro caso da COVID-19 no Brasil foi confirmado em 26 de fevereiro de 2020, na cidade de São Paulo e em menos de um mês, após a identificação do primeiro paciente, a transmissão comunitária do vírus foi declarada em várias cidades do país (TANG, et al., 2020). Com o fechamento dos aeroportos, observou-se que o vírus começou a invadir as fronteiras estaduais e a se dissipar pelo interior do Brasil em meados de abril de 2020. No entanto, a implantação da Intervenção Não Farmacêutica (NPIs) ocasionou uma diminuição dos casos. As NPIs adotadas foram medidas de restrições e distanciamento social em tempos de crise na saúde pública (CANDIDO et al., 2020).

Um mês após a confirmação do primeiro caso positivo para COVID-19 no Brasil, o quadro de infectados pela doença já se mostrava alarmante. No dia 8 de abril de 2020 foram registrados 19.927 casos positivos, com um aumento de 16% em apenas 24 horas. A maior taxa de letalidade ainda se concentrava na região Sudoeste, por se tratar do primeiro polo atingido e pelo número de pessoas em uma mesma área.

Com o passar do tempo, esse número foi crescendo ao mesmo tempo que a pandemia se instalava (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020b).

Em dezembro de 2020, após um ano do primeiro caso registrado em Wuhan, o quadro da pandemia da COVID-19 no Brasil e no mundo, se encontrava da seguinte forma: 80.351.598 casos em todo o mundo, com os Estados Unidos liderando o número de casos, e o Brasil em terceiro lugar no *ranking* com um total de 7.465.806 casos confirmados para SARS-CoV-2. A região mais atingida continuou sendo o Sudoeste (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020c).

Em 19 de janeiro de 2021 teve início o processo de vacinação no Brasil, iniciando nas idades superiores a 60 anos. Mesmo com a vacinação e todas as formas de isolamento social, o Brasil ainda permanecia em terceiro lugar em número de infectados e de óbitos por COVID-19. Na data de 31 de julho de 2021 foram confirmados 197.874.812 novos casos em todo o mundo. Destes, 19.917.855 ocorreram no Brasil, totalizando 556.370 óbitos. Tais números fizeram com que o Brasil ficasse em segundo lugar no número de óbitos no mundo, ficando atrás somente dos Estados Unidos (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021a).

2.3 O vírus SARS-CoV-2

O vírus SARS-CoV teve seu primeiro relato nos anos de 2002-2003, também na China. Este vírus surgiu inicialmente por meio de transmissão dos morcegos e civetas para os humanos, e, posteriormente de humano para humano, infectando em torno de 8.000 pessoas, com uma taxa de letalidade de 9,6%. Outro vírus dessa linhagem foi o MERS-CoV, identificado em pacientes que apresentaram um quadro de pneumonia grave na Arábia Saudita. Sua transmissão inicial se deu a partir do dromedário para os humanos, no ano de 2012. Em 2019 foram relatados 2.500 casos deste vírus, com letalidade de 30% (LUDWIG; ZARBOCK, 2020).

No final de 2019 surgiu então o novo coronavírus (2019-nCoV). O 2019-nCoV, desde seus primeiros relatos em Wuhan, na China, foi alvo de pesquisas que por meio de análise genômica comparativa, mostraram que o seu genoma apresenta 79,5% de similaridade com o SARS-CoV. Desta maneira, o novo coronavírus foi denominado SARS-CoV-2, mais um *Betacoronavirus* que pode infectar mamíferos, e por sua vez, humanos (ZHOU et al., 2020).

Os SARS-CoV-2 são vírus de RNA de fita simples e sentido positivo (+ssRNA). Possuem cerca de 27 – 32kb, sendo considerado o vírus com o maior

genoma entre os vírus de RNA. Ele é um vírus que possui uma RNA polimerase RNA-dependente (RdRp). Trata-se de um vírus envelopado apresentando uma membrana lipídica, com quatro proteínas estruturais essenciais:

- **Proteína do Nucleocapsídeo (N)**

Esta proteína está relacionada ao empacotamento do RNA. Ela possui em sua estrutura um domínio compartilhado com a região N-terminal (ou N1b) de ligação ao RNA e C-terminal (ou N2b) responsável pela sua dimerização (YE et al., 2020).

- **Proteína do Envelope (E)**

A proteína E é relativamente pequena e tem papel na morfogênese da estrutura viral. Ela atua como viroporinas, que ficam agrupadas na membrana do hospedeiro, gerando poros de proteína-lipídeos envolvidos no transporte de íons (NAQVI et al., 2020).

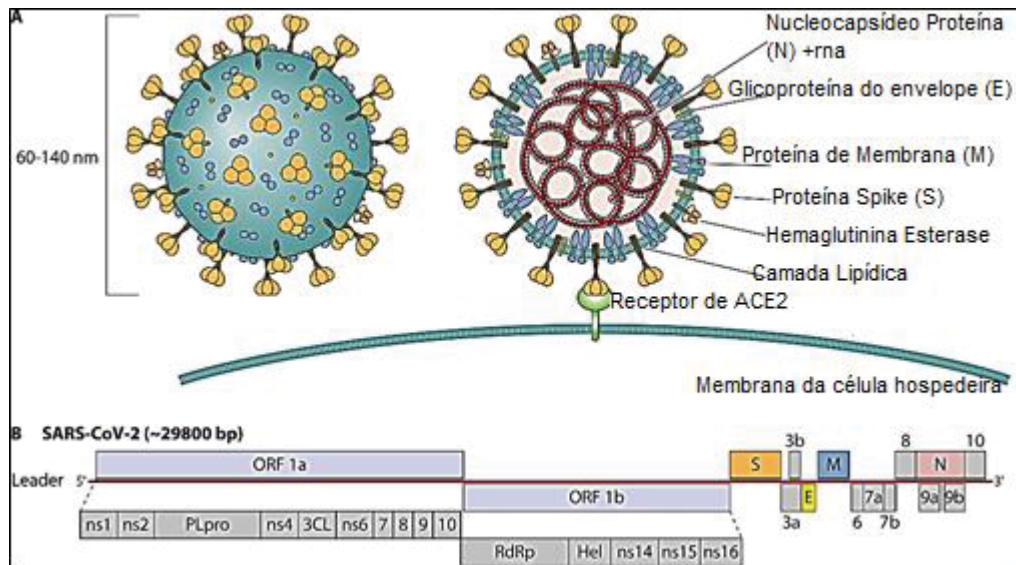
- **Proteína de Membrana (M)**

A proteína M desempenha papel importante no empacotamento do RNA. Ela possui uma estrutura conservada de 222 aminoácidos, sendo a proteína mais abundante no vírus (NAQVI et al., 2020).

- **Proteína de Pico ou *Spike* (S)**

A proteína de pico ou *Spike* (S), é uma glicoproteína que permite a interação entre vírus e hospedeiro. Ela é responsável por se ligar ao receptor da superfície da célula hospedeira por meio do domínio de ligação RBD na subunidade S1, e a fusão da subunidade S2 à membrana celular (NAQVI et al., 2020).

Além destas, há ainda outras 16 proteínas não estruturais (Nsp1-16) que desempenham várias funções nos processos de replicação e montagem do vírus (LUDWIG; ZARBOCK, 2020). As proteínas ORF1a e ORF1ab são traduzidas do RNA genômico e são clivadas originando as 16 proteínas não estruturais (FINKEL, 2021). A estrutura biológica e genômica do vírus está apresentada na Figura 1.

FIGURA 1: ESTRUTURA DO SARS-CoV-2.

FONTE: Modificado de Safiabadi Tali (2021). Estrutura física e genômica de SARS-CoV-2. (A) Diagrama do víron SARS-CoV-2. (B) Organização do genoma e proteínas expressas.

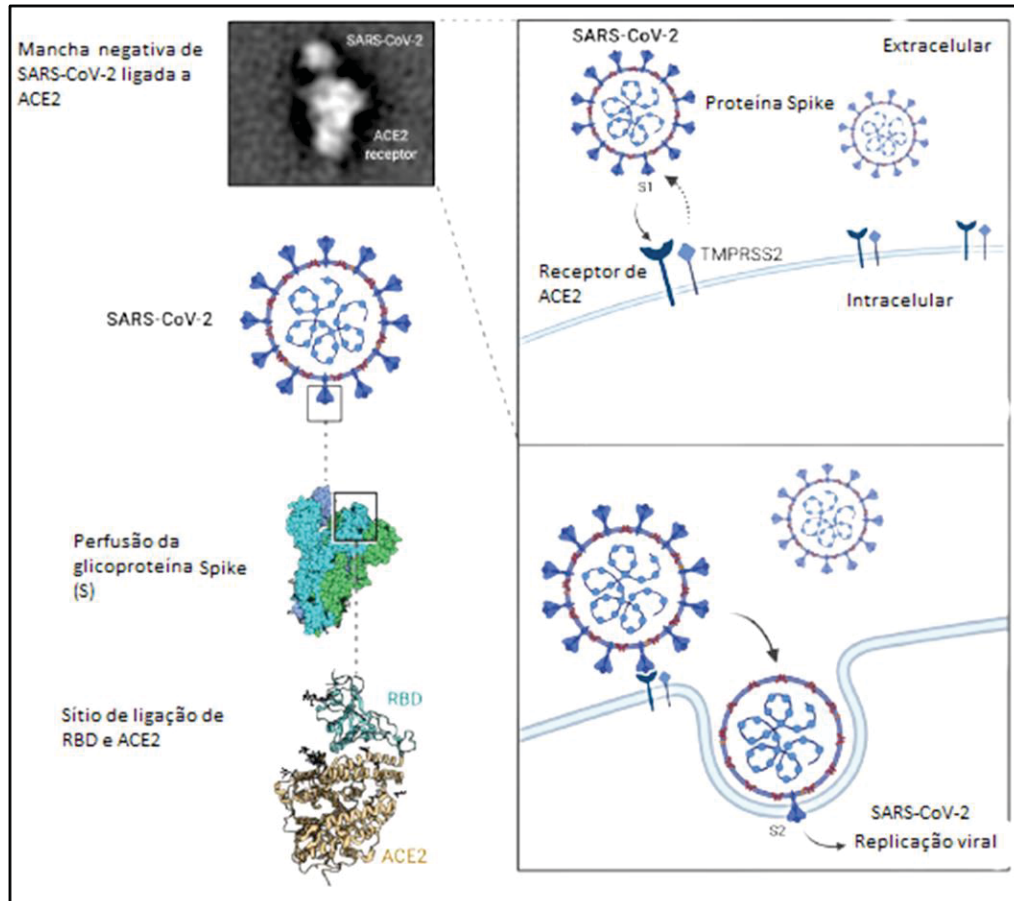
As proteínas não estruturais desempenham as seguintes funções: Nsp1 medeia o processamento e a replicação do RNA; Nsp2 realiza a modulação das vias de sinalização de sobrevivência da célula hospedeira; Nsp3 atua na tradução de proteínas; a Nsp4 ancora o complexo de replicação e transcrição viral; a Nsp5 participa do processo de replicação viral; a Nsp6 atua na formação de autofagossomos no retículo endoplasmático do hospedeiro. A presença de Nsp7 e Nsp8 aumenta significativamente a combinação da Nsp12 e do RNA. Nsp9 funciona como uma proteína de ligação a RNA de fita simples (ssRNA). A proteína Nsp10 é crítica para a metilação dos RNAs mensageiros virais. A Nsp12 é a enzima RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) que atua na replicação/transcrição do vírus. A Nsp13 é uma helicase, possui um domínio de ligação do zinco e está envolvida no processo de replicação e transcrição. A Nsp14 possui um domínio de exoribonuclease de revisão (corrige possíveis falhas na direção 3' - 5'). Nsp15 tem atividade de endoribonuclease dependente de Mn^{2+} , e por fim, a Nsp16 é uma metiltransferase que medeia processos de metilação (NAQVI et al., 2020).

2.4 Infecção por SARS-CoV-2

A infecção viral ocorre quando o vírus SARS-CoV-2 se liga às células hospedeiras que apresentam receptores para as proteínas *spikes*. Neste momento,

o RBD (Domínio de ligação ao receptor) da proteína S do vírus, se liga ao receptor ACE2 (Enzima Conversora de Angiotensina 2) do hospedeiro (Figura 2) (VERDECCHIA et al., 2020).

FIGURA 2: INFEÇÃO DE CÉLULAS EPITELIAIS POR SARS-CoV-2



Fonte: Modificado de Ryan (2020). Esquema do direcionamento SARS-CoV-2 do receptor ACE2 e entrada na célula infectada. Observe a interação cooperativa entre ambas as subunidades virais S1 e S2 e ACE2 ligado à superfície celular e serina protease 2 transmembrana.

O processo de entrada do vírus na célula do hospedeiro requer a ação da Serinoprotease transmembrana 2 (TMPRSS2), que tem a propriedade de regular a clivagem da proteína S, sendo essencial para a disseminação e patogenicidade viral (RAHMAN, et al., 2020).

Os receptores ACE2 são amplamente expressos em algumas células localizadas principalmente no coração, vasos sanguíneos, intestino, testículos, rins, cérebro e nos pulmões (VERDECCHIA et al., 2020). A proteína ACE2 está presente nas células epiteliais, as quais atuam como barreira protetora. Nos pulmões, essa

barreira é promovida pelos pneumócitos tipo 2, que são células abundantes nos alvéolos pulmonares, responsáveis pela absorção de oxigênio e liberação do dióxido de carbono residual nos vasos sanguíneos (PILLAY, 2020).

A ACE2 é um elemento vital em vias bioquímicas que são críticas para regular processos como pressão sanguínea, cicatrização de feridas e inflamação. Ela é responsável por converter uma proteína chamada Angiotensina 2, que tem por característica aumentar a pressão arterial, inflamação e outros danos presentes nos vasos sanguíneos. A ACE 2 é significativamente expressa em pacientes com doenças crônicas como hipertensão, diabetes mellitus e doenças cardiovasculares. Desta maneira, o uso de medicamentos inibidores da ACE2 (iACE2) e de bloqueadores dos receptores de angiotensina (BRA) contribuem para o aumento da expressão de ACE2. Como a proteína *Spike* (S) se liga a esse receptor, isso torna as pessoas que utilizam este tipo de medicamento mais suscetíveis a desenvolver a forma grave da COVID-19 (KHAILANY et al., 2020).

Após a entrada do vírus no hospedeiro, ocorre uma diminuição na expressão de ACE2, resultando em um estresse oxidativo, aumento da permeabilidade celular e acúmulo de líquido intersticial alveolar. Quando ocorre a diminuição da expressão de ACE2, ela não atua como deveria sobre as proteínas angiotensina 2 (AGN2), deixando mais AGN2 circulante e gerando mais danos aos tecidos (YAN; XIAO; LIN, 2020).

Em uma infecção normal, após as células do sistema imunológico inato do hospedeiro reconhecerem os padrões moleculares associadas a patógenos (PAMPs) pelos receptores tipo Toll (TLR3 e TLR7), ocorre uma cascata imunológica que culmina na expressão de Interferon (IFN) tipo 1, sendo este, um antiviral (SALLARD et al., 2020).

O mesmo não ocorre na infecção por SARS-CoV-2. A expressão de IFN tipo 1 é suprimida e desregulada. Além disso, ocorre uma migração de células do sistema imune, como neutrófilos e monócitos/macrófagos, juntamente com uma grande liberação de citocinas que desencadeia um quadro mais severo da doença (PROMPETCHARA et al., 2020).

2.5 Testes para diagnóstico da COVID-19

Desde o início da pandemia pelo SARS-CoV-2, houve uma mobilização de vários laboratórios e grupos de pesquisa para o desenvolvimento de novos testes para auxiliar no diagnóstico de SARS-CoV-2. De maneira geral, existem três categorias de

testes laboratoriais para detectar essa infecção viral, sendo eles: moleculares, sorológicos e de detecção de antígeno (SMITHGALL et al., 2020).

2.5.1 Teste molecular: detecção pelo método de RT-qPCR

O RT-qPCR, é considerado atualmente o padrão ouro para identificação do SARS-CoV-2, devido à sua capacidade de detectar diretamente o genoma viral, ao invés de biomarcadores secundários, como antígenos e anticorpos. O teste é realizado a partir de uma coleta de secreção nasofaríngea e/ou orofaríngea com *swab*, esfregaço nasal, aspirados do trato respiratório inferior, lavagem broncoalveolar ou expectoração. O RT-qPCR é o principal teste molecular quantitativo usado para a detecção de patógenos virais. Para identificar o SARS-CoV-2, utiliza-se então o método da reação em cadeia da polimerase quantitativa de transcrição reversa (RT-qPCR), a qual é realizada por meio de duas reações consecutivas. A primeira está relacionada a conversão de RNA em DNA complementar (cDNA) por meio da enzima de transcriptase reversa. A segunda está relacionada à amplificação da amostra de cDNA por reação em cadeia da polimerase, usando iniciadores específicos e sondas de hidrólise marcadas com fluoróforos (WIKRAMARATNA et al., 2020).

Por meio da PCR ocorre o aumento do número de cópias do cDNA ao longo dos ciclos térmicos repetidos. Os iniciadores específicos para o gene de interesse guiam a reação para a amplificação de uma região selecionada do genoma viral. Assim que amplificadas as regiões de interesse, as sondas geram sinais de fluorescência que serão lidas através de um equipamento específico de PCR em tempo real (YÜCE et al., 2021).

Para a detecção do SARS-CoV-2 por RT-qPCR é necessário um conjunto de sondas e iniciadores específicos para genes virais, onde alguns dos principais genes detectados são aqueles que codificam as proteínas ORF1ab/RdRp, E, N e S do SARS-CoV-2. Existe a possibilidade de detecção de mais de um destes genes em uma mesma reação de PCR (NALLA et al., 2020).

Esse teste tem por característica a coleta da amostra em vias aéreas superiores, logo após os primeiros dias de sintomas da doença. Com o passar dos dias de infecção e diminuição dos sintomas, os pacientes têm sua carga viral diminuída. Desta maneira, é ideal que se realize a coleta logo na primeira semana de sintomas para que não se tenha um resultado falso negativo. O teste molecular apresenta alta especificidade, porém a sua sensibilidade acaba sendo prejudicada

pelo fato de o vírus adentrar cada vez mais na mucosa respiratória, dificultando sua detecção (YÜCE et al., 2021).

2.5.2 Testes sorológicos

São métodos de detecção de anticorpos específicos no soro. Quando o corpo é infectado por um patógeno/antígeno, o sistema imunológico produz como resposta uma glicoproteína chamada imunoglobulina ou anticorpo. Os anticorpos são produzidos e secretados pelas células B (linfócitos B) ativados (plasmócitos) nas mucosas e corrente sanguínea, para neutralizar e impedir que o patógeno/antígeno infecte as células alvo (JACOFISKY et al., 2020).

Encontram-se localizadas na extremidade N-terminal do anticorpo regiões responsáveis pela especificidade pelo antígeno, denominadas de Regiões Determinantes de Complementaridade (CDRs). Sendo assim, o anticorpo é específico para determinado antígeno, podendo então se ligar a ele e auxiliar em sua eliminação do corpo. Existem cinco classes de imunoglobulinas, sendo que os envolvidos na detecção do SARS-CoV-2 são IgM e IgG. O primeiro anticorpo gerado no início da infecção é a IgM, que participa na resposta precoce à invasão viral, seguido da IgG que atua na opsonização e neutralização do agente infeccioso e pode ser encontrado mesmo após dias de exposição ao vírus (JACOFISKY et al., 2020).

2.5.2.1 Detecção pelo método fluxo lateral

O ensaio de fluxo lateral, popularmente conhecido como teste rápido, detectam anticorpos específicos no sangue do paciente suspeito e são de fácil realização. No entanto só podem ser realizados de 3-6 dias após a infecção viral, apresentando altas taxas de resultados falso-negativos. Um estudo recente realizado no Brasil avaliou todos os testes disponíveis e aprovados pela ANVISA para confirmação da infecção por SARS-CoV-2. Neste estudo, todos os testes rápidos realizados a partir de sangue apresentaram menor sensibilidade e especificidade que outros tipos de testes, como os sorológicos ou os testes moleculares. Apesar de sua fácil aplicação, alguns testes rápidos podem detectar apenas 20% dos casos que seriam realmente positivos (CASTRO et al., 2020).

O teste rápido é simples e de resposta rápida. Seu dispositivo vem com um cassete onde há uma tira de membrana polimérica que contém linhas (regiões) de controle e teste. Basta depositar uma amostra de sangue para que está se mova por

capilaridade pela tira. Ao entrar em contato com a primeira linha da tira, os anticorpos que podem ser impregnados em nanopartículas de ouro se ligam na molécula alvo da amostra. Conforme ela segue seu percurso, os anticorpos marcados com ouro são ligados pelos anticorpos de captura presentes nas linhas (YÜCE et al., 2021).

O teste pode ser utilizado para detecção de IgG, IgM ou ambas. A janela de exibição do teste pode apresentar uma, duas ou três linhas. No caso de resultado negativo deve aparecer apenas uma linha. Para resultados positivos de IgG ou IgM deve aparecer duas linhas. Quando o teste é realizado tanto para IgG quanto para IgM no mesmo teste, o resultado positivo aparecerá como três linhas, sendo uma o controle e as outras duas que marcam a presença de IgG e IgM específicas. O tempo médio de leitura do teste é de aproximadamente 30 minutos (CASTRO et al., 2020).

2.5.2.2 Detecção pelo método ELISA

O teste de ELISA (do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) se baseia reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas. O teste de ensaio de imunoabsorção enzimática serve para detectar e quantificar biomoléculas, incluindo proteínas como hormônios, anticorpos e peptídeos (LUO et al., 2020).

Os testes sorológicos detectam a presença de IgG, IgM ou ambos. Estas imunoglobulinas podem ser detectadas no sangue, soro ou plasma do indivíduo infectado. A quantidade de anticorpos presentes no indivíduo aumenta com o desenvolvimento da infecção. A IgM pode ser detectada logo nos primeiros dias de infecção (por volta do terceiro dia). A detecção de IgG é mais tardia, perto do 14º dia após o aparecimento dos sintomas. Estes testes apresentam alta sensibilidade e especificidade, podendo ser aplicados em casos assintomáticos da COVID-19. Este teste é fácil de desenvolver, mais barato que os testes moleculares, além de apresentarem resultados rápidos (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020d).

Os testes laboratoriais que detectam tais imunoglobulinas são realizados por meio de *kits* aprovados pela ANVISA, na plataforma de ELISA (Tabela 1). Estes testes são realizados a partir de leituras espectrofotométricas que detectam a presença de anticorpos específicos por meio de absorvância colorimétrica. Para a realização dos testes, os poços das placas de material plástico são revestidos com antígeno viral recombinante como moléculas-alvo. Para detecção da infecção por SARS-CoV-2, são comumente usadas as proteínas *Spike* ou do nucleocapsídeo. A amostra de soro a ser testada é preparada e depositada nesses poços. Se, ao final da reação, ocorrer a

formação de cor, significa que existem anticorpos específicos na amostra (MARDIAN et al., 2021).

TABELA 1: Teste sorológico tipo ELISA para COVID-19 em vigor no Brasil

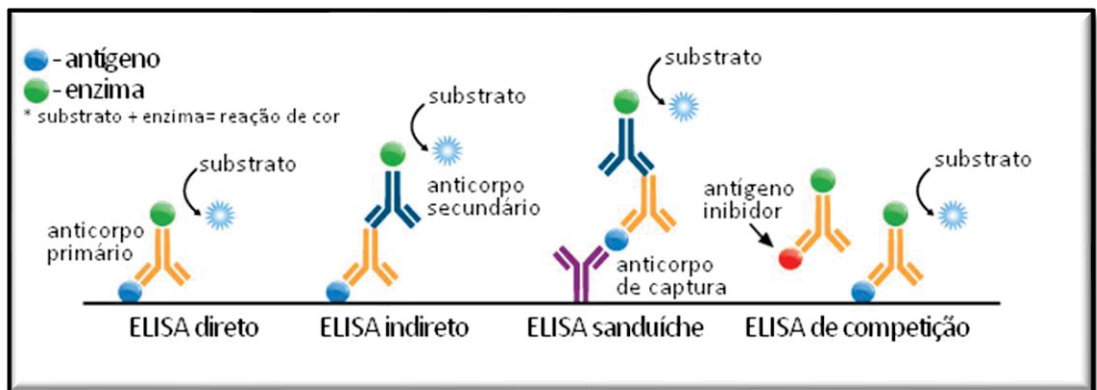
Empresa	Produto	Antígeno	Tipo	Especificidade Sensibilidade
ABBOTT DIAGNOSTICOS RAPIDOS S.A.	PANBIO™ SARS- CoV-2 IgG ELISA	N	ELISA indireto	Sensibilidade:95,5% Especificidade:98%
ADVAGEN BIOTECH LTDA	COVID-19 IgG MAX ELISA	N	ELISA indireto	Sensibilidade:91,67% Especificidade:100%
ADVAGEN BIOTECH LTDA	COVID-19 IgG pS MAX ELISA	S	ELISA indireto	Sensibilidade:91,4% Especificidade:95,5%
ARGOSLAB DISTRIBUIDORA DE PRODUTOS PARA LABORATÓRIOS LTDA	SARS-CoV-2 (COVID-19) IgG ELISA	Não encontrado	ELISA indireto	Sensibilidade:100% Especificidade:99,24%
BIO BRASIL BIOTECNOLOGIA LTDA	BIO DETECHTA ELISA IgG SARS- CoV-2	N	ELISA indireto	Sensibilidade: 93,3% Especificidade:94,5%
EUROIMMUN BRASIL MEDICINA DIAGNOSTICA LTDA	Anti-SARS-CoV-2 ELISA (IgG)	Domínio S1 recombinante	ELISA indireto	Sensibilidade: 94,4% Especificidade: 99,6%
EUROIMMUN BRASIL MEDICINA DIAGNOSTICA LTDA	Anti-SARS-CoV-2- NCP IgG ELISA	N modificada	ELISA indireto	Sensibilidade: 94,6% Especificidade: 99,8%
EUROIMMUN BRASIL MEDICINA DIAGNOSTICA LTDA	Anti-SARS-CoV-2 QuantiVac ELISA (IgG)	S	ELISA indireto	Sensibilidade: 90,3% Especificidade: 99,8%
GALILEO BIOTECNOLOGIA S.A.	Kit de ELISA para detecção de anticorpos IgM e IgG anti-SARS- CoV-2	S	ELISA indireto	Sensibilidade: 99% Especificidade: 94%
REM INDUSTRIA E COMÉRCIO LTDA.	GOLD ELISA COVID-19 IgG+IgM	não encontrado	Não encontrado	Não encontrado
THE BINDING SITE BRASIL COMERCIO DE PRODUTOS PARA LABORATÓRIO LTDA.	Human Anti- IgG/A/M SARS- CoV-2 ELISA	S	ELISA indireto	Sensibilidade: 96,3% Especificidade: 99,3%
VIDA BIOTECNOLOGIA LTDA – ME	SAFETEST COVID- 19™ IgG/IgM- Kit ELISA	não encontrado	ELISA indireto	Sensibilidade: 93,3% Especificidade: 98,7%

VIRION DIAGNÓSTICA LTDA.	COVID-19 ELISA IgG	não encontrado	ELISA indireto	Não encontrado
--------------------------------	-----------------------	-------------------	-------------------	----------------

Fonte: ANVISA - <https://consultas.anvisa.gov.br/#/saude/>

O teste de ELISA apresenta quatro modalidades: direto, indireto, competitivo e o ensaio sanduíche (Figura 3), com tempo médio de leitura de 2 a 4 horas (LUO et al., 2020).

FIGURA 2: TIPOS DE ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)



FONTE: Modificado de Câmara (2013, p.2). Tipos de IMUNOABSORÇÃO, se baseia reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas. ELISA direto: o antígeno está ligado na placa e o conjugado é colocado diretamente nele. ELISA indireto: possui um anticorpo secundário marcado. ELISA sanduíche: o anticorpo de captura específico para o alvo já adsorvido em uma placa. ELISA de competição: apresenta um antígeno marcado para competir com o alvo.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), até agosto de 2021, existiam 13 testes sorológicos do tipo ELISA sendo utilizados no Brasil (TABELA 1). A especificidade e a sensibilidade dos testes em vigor foram calculadas de 10 a 14 dias após o resultado RT-qPCR positivo para SARS-CoV-2. Para tal, foram utilizados os termos “COVID 19”, SARS e coronavírus no campo de consulta de registro de produtos para saúde no site da Agência (<https://consultas.anvisa.gov.br/#/saude/>).

2.6. Validação de testes diagnósticos

Para esta validação alguns parâmetros foram importantes, como sensibilidade e especificidade, intervalo de confiança, proporção de indivíduos precisão.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para a validação do teste sorológico desenvolvido pela UFPR, este projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos pela Plataforma Brasil e aprovado sob o número CAAE: 35872520.8.0000.0102.

3.1 Cálculo amostral

Para o cálculo do tamanho da amostra a ser utilizada para a avaliação da acurácia do teste sorológico, foram utilizadas as fórmulas propostas por Jones, Carley e Harrison (2003) com os seguintes parâmetros:

- Sensibilidade estimada (SE) de 90%;
- Especificidade estimada (EE) de 90%;
- Intervalo de 95% de confiança;
- P proporção de indivíduos com a doença na população (30%);
- Precisão (W) de +/- 5% (semi-amplitude do IC95%);

Tamanho da amostra para avaliar a Sensibilidade:

$$n_s = \frac{\frac{Z^2(SE(1 - SE))}{W^2}}{P} \qquad n_s = \frac{1,96^2(0,90(1 - 0,90))}{0,05^2 \cdot 0,3} = 116$$

Tamanho da amostra para avaliar a Especificidade:

$$n_E = \frac{\frac{Z^2(EE(1 - EE))}{W^2}}{(1 - P)} \qquad n_E = \frac{1,96^2(0,90(1 - 0,90))}{0,05^2 \cdot (1 - 0,3)} = 198$$

Após os cálculos realizados, estimou-se que para a sensibilidade seriam necessárias pelo menos 116 amostras positivas para a COVID-19 pelo padrão de referência e para estimar a especificidade seriam necessárias 198 amostras negativas pelo padrão de referência.

3.2 Amostra

Os voluntários participantes do estudo foram provenientes de três fontes:

1. Contato telefônico a partir de dados de indivíduos residentes em Toledo/PR, maiores de 18 anos, de ambos os sexos, que apresentaram resultado positivo ou negativo para COVID-19 por RT-qPCR, no período de abril de 2020 a janeiro de 2021. Esses dados foram gentilmente cedidos pela Secretaria Municipal de Saúde de Toledo/PR.

2. Indivíduos residentes em Toledo/PR, maiores de 18 anos, de ambos os sexos, que apresentaram resultado positivo ou negativo para COVID-19, por RT-qPCR, no período de abril de 2020 a janeiro de 2021, que entraram voluntariamente em contato com a equipe de pesquisa por meio de redes sociais, e-mail ou telefone. A pesquisa foi amplamente divulgada por meio da mídia (rádio, televisão e redes sociais), para captação de voluntários para a pesquisa.

3. Indivíduos residentes em Toledo, maiores de 18 anos, de ambos os sexos, assintomáticos, que realizaram o RT-qPCR com amostra de saliva oferecido pela Universidade Federal do Paraná.

Os critérios de inclusão para a pesquisa foram das amostras na pesquisa foram: indivíduos com idade maior ou igual a 18 anos, que foram diagnosticados como positivos para a doença por meio do teste padrão-ouro (RT-qPCR) e por indivíduos que foram descartados da infecção pelo mesmo teste (casos negativos). Foram excluídos do projeto os indivíduos com idade menor que 18 anos e/ou que não aceitaram participar do estudo.

3.3 Coleta de sangue e aplicação de questionário

As coletas foram todas agendadas previamente e realizadas, em sua maioria, em domicílio. Utilizou-se um Termo Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), para explicar sobre os objetivos da pesquisa. Após assentimento para participação e leitura do TCLE, cada voluntário assinou o documento em duas vias.

As coletas de sangue foram realizadas com seringa de 10 mL estéril e agulha de 0,80 x 25,0 mm. Foram coletados 10 mL de sangue por punção venosa, realizando a antissepsia do local com álcool 70% e algodão. O sangue foi depositado em tubos

plásticos estéreis sem anticoagulante, e armazenados em caixa térmica contendo gelo reciclável até chegada do material ao laboratório.

Todo material coletado passou por uma codificação na qual os voluntários receberam um número e um código, fazendo assim com que fosse garantida a rastreabilidade e anonimato da amostra.

Um questionário padronizado foi utilizado como instrumento de coleta de dados (APÊNDICE 1). Tal questionário continha dados como nome, sexo, idade, tipo sanguíneo, resultado do RT-qPCR, data de realização do RT-qPCR, bairro onde reside, sintomas apresentados e presença de comorbidades.

3.4 Testes sorológicos de imunoensaio (ELISA)

O sangue coletado foi centrifugado com rotação de 2000 rpm por 2 minutos. Posteriormente, o soro foi transferido para microtubos de 1,5 mL, devidamente identificados e armazenados em ultrafreezer a temperatura de -80°C até o dia da realização do teste ELISA.

Os soros dos voluntários RT-qPCR positivos e negativos para SARs-CoV-2 foram analisados por meio de teste duplo cego, utilizando dois imunoensaios:

1. Teste sorológico em validação, desenvolvido pelo Prof. Dr. Luciano Huergo - Setor Litoral – UFPR: este teste é composto por microplacas de poliestireno de 96 poços, sensibilizadas com a proteína N (nucleocapsídeo) de SARS-CoV-2 e anticorpo secundário anti-IgG, complexado a uma enzima peroxidase (*Horseradish peroxidase* - HRP);
2. Teste sorológico comercial regulamentado pela ANVISA (Allserum E I A, COVID-19 IgG): composto por microplacas de poliestireno de 96 poços, sensibilizadas com a proteína N (nucleocapsídeo) de SARS-CoV-2 e anticorpo secundário anti-IgG, complexado à uma enzima peroxidase.

Para a execução dos dois testes sorológicos foram feitas duplicatas das amostras de soro dos voluntários, do controle negativo (soro sem IgG específica para antígenos de SARS-CoV-2), do controle positivo (soro contendo IgG específica para antígenos de SARS-CoV-2) e do “branco” de reação. Foram utilizadas as soluções e tampões fornecidos pelos fabricantes de cada teste. Os procedimentos foram

seguidos conforme as recomendações dos protocolos de uso dos *kits* (ANEXOS 1 e 2).

Em ambos os testes sorológicos, o tetra-metil-benzidina (TMB) é o substrato cromogênico que ao ser oxidado confere cor azul à reação. Assim que a reação é interrompida pela diminuição do pH, esta adquire uma coloração amarela. As reações foram analisadas por colorimetria em comprimento de onda de 450 nm utilizando um espectrofotômetro UV-vis Multiskan Sky (Thermo® scientific).

Os resultados foram avaliados de modo qualitativo, para tanto foi estabelecido um valor limite de positividade (*cut off*) para ambos os testes. Para determinar se a amostra analisada pelo teste em validação foi reagente ou não reagente para a presença de anticorpos anti-SARS-CoV-2, foi multiplicado o valor da absorbância média do controle positivo por 0,13. Amostras com absorbância média maior que o valor do *cut off* foram considerados reagentes. Para o teste comercial foi seguida a recomendação do fabricante. Foi adicionado o valor de 0,250 ao valor médio da absorbância de controle negativo. Amostras com valor de absorbância média 10% acima do *cut off* foram consideradas reagentes e amostras com valor 10% abaixo do *cut off* foram considerados não reagentes.

3.5 Análise dos dados

Todos os dados obtidos por meio do questionário (idade, sexo e tempo decorrido entre a coleta de amostra de sangue e os sintomas ou diagnóstico positivo para COVID-19), e da análise sorológica por imunoensaio foram tabulados utilizando-se o programa Microsoft Excel®. Os dados foram analisados por estatística descritiva, sendo então calculados: Sensibilidade, Especificidade, Acurácia, Prevalência real, Prevalência estimada, Valor Preditivo Positivo (VPP), Valor Preditivo Negativo (VPN), Razão de verossimilhança positiva (RV+) e Razão de verossimilhança negativa (RV).

5 RESULTADOS

No total, 348 voluntários que realizaram o teste de RT-qPCR para diagnóstico da COVID-19 participaram do estudo. Destes, 158 apresentaram resultado positivo para SARs-CoV-2 e 190 apresentaram resultado negativo.

Dos 158 voluntários RT-qPCR positivos, 49,4% foram reagentes para IgG específica para SARS-CoV-2, e 50,6% não reagentes quando utilizado o teste em validação. Dos 190 voluntários RT-qPCR negativos, 94,2% foram não reagentes para IgG, e apenas 5,8% apresentaram reatividade com o Teste UFPR (Tabela 2).

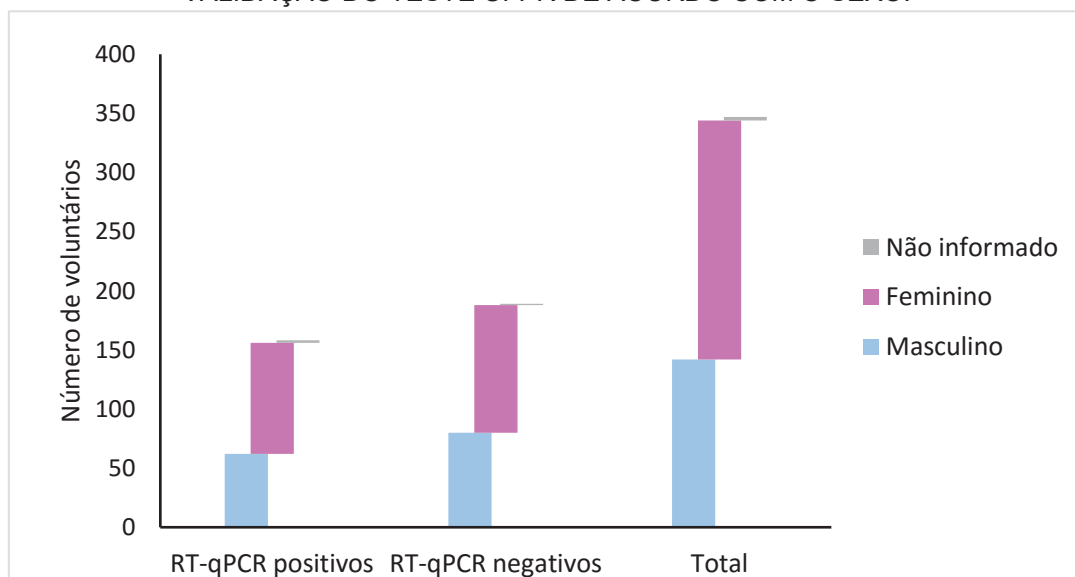
TABELA 2: DISTRIBUIÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS RT-qPCR POSITIVOS E NEGATIVOS DE ACORDO COM A REATIVIDADE PARA COVID-19 POR SOROLOGIA USANDO O TESTE UFPR.

	Voluntários RT-qPCR positivos		Voluntários RT-qPCR negativos	
	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Reagente	78	49,4	11	5,8
Não reagente	80	50,6	179	94,2
Total	158	100	190	100

FONTE: O autor (2021).

Dos dados levantados foi observado que na maioria dos voluntários, tanto RT-qPCR positivos, quanto negativos, o sexo de maior incidência foi o feminino (Positivos: 94 mulheres e 62 homens; Negativos: 108 mulheres e 80 homens). Três voluntários não responderam a esta questão (Figura 1).

FIGURA 4: DISTRIBUIÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS RT-qPCR POSITIVOS E NEGATIVOS PARA A VALIDAÇÃO DO TESTE UFPR DE ACORDO COM O SEXO.



FONTE: O autor (2021).

Em relação à faixa etária dos voluntários, a maioria destes eram adultos e adultos jovens (89,8%). Segundo o Ministério da Saúde, adultos jovens são aqueles indivíduos com idade entre 20 e 24 anos. Apenas 10,2% eram pertencentes à classe idosa, segundo a Lei nº 10.741 do Estatuto do idoso, ou seja, idade igual ou superior a 60 anos (Tabela 3).

TABELA 3: DISTRIBUIÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS RT-qPCR POSITIVOS E NEGATIVOS DE ACORDO COM A FAIXA ETÁRIA.

Faixa etária (anos)	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
18 - 29	92	26,8
30 - 39	110	32,1
40 - 49	64	18,7
50 - 59	42	12,2
60 - 69	28	8,2
70 - 79	6	1,7
80 - 89	1	0,3

FONTE: O autor (2021).

Em oitenta voluntários (50,5%) que apresentaram resultado positivo para RT-qPCR não foi detectada a presença de IgG específica para SARS-CoV-2 por sorologia usando o Teste UFPR. Para estes voluntários a coleta de sangue para testagem foi realizada entre o 1º e o 7º dia após o relato do início dos sintomas relacionados à COVID-19 ou à confirmação da doença pelo teste padrão ouro (Tabela 4).

TABELA 2: DISTRIBUIÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS RT-qPCR POSITIVOS E NÃO REAGENTES PELO TESTE UFPR DE ACORDO COM O TEMPO DECORRIDO ENTRE O APARECIMENTO DOS SINTOMAS DA COVID-19/POSITIVIDADE POR RT-qPCR E A COLETA DA AMOSTRA PARA SOROLOGIA.

Meses	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
1	25	31,25
2	12	15
3	18	22,5
4	12	15
5	6	7,5
6	2	2,5
7	2	2,5
Não informado	3	3,75

FONTE: O autor (2021).

A maioria dos voluntários não reagentes para IgG (83,75%) deixaram de produzir IgG em quantidade detectável pelo teste em validação até o 4º mês após o relato do início dos sintomas relacionados à COVID-19 ou a confirmação por RT-qPCR.

Desses 80 voluntários que apresentaram positivo para RT-qPCR e testaram negativos para o teste da UFPR, 25 voluntários (32,25%) realizaram o novo teste sorológico um mês após o início dos sintomas ou realização do teste padrão ouro, 12 voluntários (15%) após dois meses, 18 voluntários (22,5%) após três meses, 12 voluntários (15%) após quatro meses, 6 voluntários (7,5%) após cinco meses, após seis 2 voluntários (2,5%) e após sete meses 2 voluntários (2,5%). Apenas 3 destes voluntario não souberam informar a data de realização do teste ou início dos sintomas (3,75%).

Para comparação de nível de acurácia do teste sorológico UFPR, foram testados 270 indivíduos com um teste sorológico comercial tipo ELISA aprovado pela ANVISA. Destes, 135 que testaram positivo para SARS-CoV-2 por RT-qPCR, apenas 37 (27,4%) também testaram positivo para o *kit* sorológico comercial. Ainda na categoria dos voluntários positivos por RT-qPCR, 96 (71,1%) foram não reagentes para anticorpos IgG de SARs-CoV-2 com o *kit* comercial e 2 (1,5%) dos voluntários apresentaram resultado indeterminado. Dentre os 135 voluntários que testaram negativo para RT-qPCR, seis (4,4%) foram classificados como reagentes para IgG de SARS-CoV-2, 129 (95,6%) não reagentes para IgG de SARS-CoV-2 e 1 (0,7%) com resultado indeterminado (TABELA 5).

TABELA 3: DISTRIBUIÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS RT-qPCR POSITIVOS E NEGATIVOS DE ACORDO COM A REATIVIDADE PARA COVID-19 POR SOROLOGIA USANDO O *KIT* COMERCIAL.

Voluntários RT-qPCR positivos	Voluntários RT-qPCR negativos
----------------------------------	----------------------------------

	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Reagente	37	27,4	6	4,4
Não reagente	96	71,1	129	95,6
Indeterminado	2	1,5	1	0,7
Total	135	100	135	100

Fonte: A autora (2021).

Dos 158 voluntários positivos para RT-qPCR, 126 foram analisados quanto a produção de IgG específico com ambos os testes: UFPR e *Kit* comercial. Pode-se observar na TABELA 6, que o teste da UFPR detectou a presença de anticorpos IgG em 49,2% dos voluntários RT-qPCR positivos, enquanto que o *kit* comercial detectou apenas em 27% destes. O teste da UFPR detectou que 50,8 % dos voluntários positivos para RT-qPCR não manifestaram anticorpos IgG específicos, enquanto que o *kit* comercial detectou 71,4% não reagentes da mesma amostra. Os voluntários que obtiveram resultado indeterminado para o teste comercial (dois voluntários) apresentaram reatividade para IgG quando utilizado o teste UFPR. De maneira geral, o teste UFPR detectou 5 vezes mais voluntários reagentes para IgG anti-SARS-CoV-2 do que o teste comercial.

TABELA 6 – FREQUÊNCIA RELATIVA (%) DOS VOLUNTÁRIOS RT-qPCR POSITIVOS PARA a COVID-19, REAGENTE E NÃO REAGENTES, PARA OS TESTES SOROLÓGICOS.

Teste Sorológico	Reagente	Não reagente	Indeterminado
Teste UFPR	49,2	50,8	0,0
Teste comercial	27,0	71,4	1,6

FONTE: A autora (2021).

TABELA 7 – DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ABSOLUTAS E RELATIVAS DOS VOLUNTÁRIOS RT-qPCR POSITIVOS PARA COVID-19 QUE APRESENTARAM REATIVIDADE NOS TESTES SOROLÓGICOS.

Teste Sorológico	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Apenas Teste UFPR	35	27,8

Apenas Teste comercial	7	5,6
Teste UFPR/comercial	27	21,4

FONTE: A autora (2021).

A Tabela 8 faz um comparativo de eficiência e confiabilidade entre o Teste UFPR e o Teste comercial por meio de parâmetros estatísticos.

TABELA 8: PARÂMETROS ESTATÍSTICOS DE EFICIÊNCIA E CONFIABILIDADE DOS TESTES SOROLÓGICOS.

Parâmetros	Teste UFPR	Teste comercial
Sensibilidade	49,1%	27,8%
Especificidade	94,2%	95,5%
Acurácia	45,6%	49,8%
VPP (Valor Preditivo Positivo)	0,876	0,860
VPN (Valor Preditivo Negativo)	0,312	0,429
Probabilidade de Falso Positivo	0,124	0,140
Probabilidade de Falso Negativo	0,688	0,571
RV+	8,47	6,21
RV-	0,54	0,76

FONTE: A autora (2021).

O Teste UFPR apresentou maior sensibilidade (49,1%) do que o Teste comercial utilizado no estudo (27,8%). Em relação à especificidade e acurácia do teste, o Teste comercial foi ligeiramente mais específico (95,5%) e mais acurado (49,8%) do que o Teste UFPR (que apresentou valores de especificidade e acurácia de 94,2% e 46,6%, respectivamente).

O VPP (Valor Preditivo Positivo) e VPN (Valor Preditivo negativo), foram semelhantes para ambos os Testes UFPR (0,876) e comercial (0,860), enquanto o Teste comercial se mostrou ligeiramente melhor em detectar verdadeiros negativos para a COVID-19, dentre todos os voluntários negativos.

Em relação à detecção de falsos positivos e falsos negativos, o Teste UFPR apresentou uma menor chance de apresentar resultados falso positivos, enquanto o Teste comercial apresentou menor chance de apresentar resultados falso negativos.

A Razão de verossimilhança positiva (RV+) mostra que o Teste UFPR (RV+=8,47) é um teste diagnóstico mais confiável do que Teste comercial (RV+ = 6,21). Já a Razão de verossimilhança negativa (RV-) demonstrou que o Teste UFPR apresenta melhor diagnóstico (0,54) quando comparado com o Teste comercial (0,76).

5 DISCUSSÃO

Os testes sorológicos baseados em testes com antígenos podem complementar os testes moleculares por auxiliar a estimar a incidência da COVID-19 e por sua potencialidade em detectar indivíduos com imunidade a doença. O desenvolvimento de testes que sejam rápidos e apresentem alta acurácia são críticos para o controle da COVID-19. Muitos testes sorológicos foram desenvolvidos para diagnóstico da COVID-19 em um curto período de tempo, entre eles o Teste UFPR apresentado neste estudo de validação populacional.

Dos 158 voluntários com RT-qPCR positivos, quase metade destes obtiveram níveis de IgG não detectáveis pelo novo *kit* sorológico. Vários motivos podem estar envolvidos na baixa produção de IgG nos indivíduos com diagnóstico molecular positivo para SARS-CoV-2, dentre eles: a) o grau leve no desenvolvimento da doença, visto que muitos destes voluntários apresentaram sintomas leves. É sabido que quanto maior a gravidade dos sintomas da COVID-19, maior a titulação observada de IgG (LONG et al., 2020; YU et al., 2020); b) pouco mais da metade dos voluntários participaram da pesquisa três meses após o início dos sintomas da COVID-19.

Wolf e colaboradores reportaram que a soroconversão de IgG é observada em 50% dos pacientes uma semana após o início dos sintomas (WOLFL et al., 2020). A média de tempo para a detecção de IgG em pacientes com COVID-19 é de 14 dias (GUO et al., 2020). Yu e colaboradores (2020) detectaram uma taxa de soroconversão de IgG de 100% dos casos no 32º dia após o início dos sintomas. Estudos sobre a persistência dos anticorpos no sangue sugerem que níveis detectáveis de IgG podem ser observados até o 50º dia após o início dos sintomas (TANZHANG, 2020).

A resposta imune humoral é a primeira linha de defesa contra infecção e a persistência da resposta imune. Ainda há poucos estudos que caracterizam a dinâmica temporal da produção e duração de anticorpos específicos para SARS-CoV-2. A soroconversão de IgG em todos os pacientes avaliados após 14 dias do início dos sintomas. No entanto, a titulação diminuiu 2 vezes em 38 dos 42 pacientes avaliados logo após os 14 dias do início dos sintomas. O mesmo estudo observou que os anticorpos IgG para SARS-CoV-2 diminuíram significativamente em 30 dias após o início dos sintomas (LI et al., 2021). Tais resultados suportam os dados observados neste estudo, onde apenas 27% dos voluntários com diagnóstico de COVID-19 apresentaram anticorpos IgG três meses após o início dos sintomas ou positividade

pelo teste molecular. De maneira geral, os níveis de IgG começam a decair dentro do segundo e terceiro mês após a infecção (LONG; TANG; SHI et al., 2020).

Dos 190 voluntários com teste molecular negativo, 94% não obtiveram níveis de IgG detectáveis pelo teste UFPR. Os quase 6% de voluntários que apresentavam níveis detectáveis de IgG pelo teste UFPR foram casos de indivíduos infectados pelo SARS-Cov-2, mas que o teste molecular não detectou a presença do vírus naquele momento. Embora o teste molecular seja o padrão ouro para diagnóstico, ele possui algumas limitações importantes como a potencial taxa de falso negativo (WINICHAKOON et al., 2020), diferente acurácia do exame de acordo com o curso da doença (SETHURAMAN et al., 2020) e a dificuldade na disponibilidade dos materiais para o desenvolvimento dos testes (*American Society for Microbiology*, 2020).

As medidas básicas para avaliar um teste sorológico são sensibilidade e especificidade. A sensibilidade avalia a capacidade de o teste detectar a doença quando ela está de fato presente, ou seja, a proporção de verdadeiros positivos entre todos os doentes (MILLER et al., 2020). Ela expressa a probabilidade de um teste dar positivo na presença da doença, logo, o Teste UFPR é aproximadamente 1,77 vezes mais sensível que o Teste comercial. Em relação à especificidade, que expressa a probabilidade de um teste dar negativo na ausência da doença (MEDCALC; 2021), o Teste da UFPR se mostrou tão efetivo quanto o Teste Comercial. De maneira geral, a acurácia dos dois testes se mostrou similar. O teste UFPR detectou 5 vezes mais voluntários reagentes para IgG anti-SARS-CoV-2 quando comparado ao teste comercial.

O VPP e VPN, expressam a probabilidade de um voluntário com o teste positivo ter a doença e a probabilidade de um voluntário com teste negativo não ter a doença, respectivamente (MEDCALC; 2021). Os valores de VPP foram semelhantes nos dois testes, enquanto o Teste comercial se mostrou ligeiramente melhor em detectar verdadeiros voluntários negativos para a COVID-19, dentre todos os voluntários negativos. Em relação à detecção de falsos positivos e falsos negativos, o Teste UFPR apresentou uma menor chance de apresentar resultados falso positivos, enquanto o Teste comercial apresentou menor chance de apresentar resultados falso negativos.

A Razão de verossimilhança positiva (RV+) expressa quantas vezes é mais provável encontrar um resultado positivo em voluntários doentes quando comparado com não doentes. O valor de $RV+ = 1$ indica um teste sem valor para determinar os voluntários com e sem a doença de interesse. Quanto maior o valor de RV+, mais

forte é a associação entre ter um teste positivo e estar doente (MILLER et al., 2020). Neste quesito, o teste UFPR é um teste diagnóstico mais confiável do que Teste comercial ($RV+ = 6,21$). Um estudo de meta-análise de diferentes testes sorológicos realizados por ELISA em diferentes países mostrou que 18% dos indivíduos com COVID-19 que são testados para IgG por ELISA irão apresentar um resultado falso-negativo (LISBOA BASTOS et al., 2020).

Os resultados obtidos a partir desta validação demonstram que o teste sorológico desenvolvido pela UFPR obtém resultados satisfatórios quando comparados ao teste aprovado pela ANVISA. Este teste sorológico pode ser utilizado em nível populacional para avaliar a imunidade dos indivíduos. Um dos pontos críticos no entendimento da resposta imune a infecção por SARS-CoV-2 inclui a habilidade do sistema imune para prover imunidade de longa duração. Com a maior disponibilidade de vacinas para imunização em massa, os testes sorológicos podem ser úteis para determinar o tempo de imunidade a este patógeno.

No início de maio de 2020, foi estimado que aproximadamente 20% da população de Nova York tinha anticorpos IgG para SARS-CoV-2, comparado aos 2,1% de casos confirmados por testes moleculares no mesmo período (COHEN; KUPFERSCHMIDT, 2020). Estudos similares realizados na Alemanha, Coreia do Sul, Reino Unido e Singapura mostraram estimativas similares para a presença de anticorpos positivos para SARS-CoV-2 quando comparados a casos sintomáticos confirmados por RT-qPCR (POPOVICH; SANGER-KATZ, 2020).

Estudos de validação são desenvolvidos e conduzidos com a intenção de identificar e quantificar as limitações destes testes. Todos os testes têm limitações quando avaliam um grande número amostral e resultados discordantes também são esperados. O processo de validação populacional deste novo teste sorológico apresentou algumas limitações, sendo as principais: coleta de material biológico de voluntários com grande variação da data do início dos sintomas e/ou data do resultado positivo ou negativo para COVID-19; e, presença de muitos voluntários com sintomatologia leve ou moderada para COVID-19, que pode resultar na menor titulação de IgG no soro do indivíduo; impossibilidade de estratificação dos resultados positivos de acordo com a idade ou comorbidades apresentadas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De maneira geral, o teste sorológico desenvolvido pela UFPR apresenta maior sensibilidade e capacidade de discriminar verdadeiros positivos quando comparados a um teste comercial já disponível no mercado. A aplicação de tal teste em nível populacional pode ser utilizada neste momento como instrumento de controle na etapa de desaceleração da pandemia da COVID-19. Da mesma forma, este teste pode auxiliar no controle da imunidade adquirida pela vacinação em massa da população por ser um teste rápido, fácil de ser desenvolvido e de baixo custo.

Mais estudos são necessários para avaliar a real acurácia de testes sorológicos para COVID-19 disponíveis no mercado, incluindo os que são realizados pelo método ELISA. No entanto, nossos resultados demonstram que tais estudos devem estar atentos a algumas limitações, tais como: um bom delineamento da inclusão de casos e controles; controle do tempo de início dos primeiros sintomas para dosagem de IgG e/ou IgM; realização de testes cegos; utilização de teste referência o padrão ouro (RT-qPCR) e estratificação dos voluntários de acordo com a severidade da doença.

Até a data final para apresentação de defesa deste trabalho em questão, alguns valores, relacionados a teste de voluntários, ainda eram necessários serem colocados junto a esse trabalho, sendo assim o resultado é parcial por isso o teste até a presente data não foi validado. Mas é um teste em potencial para ser futuramente comercializado.

6.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como os testes sorológicos ainda têm alta demanda, em parte pelo aumento da soroprevalência e pela aplicação de vacinas em larga escala. Tendo este cenário em vista, é necessário que os governos nacionais e regionais continuem a avaliar e validar novos sorológicos. Ao mesmo tempo, é necessário que a indústria se associe a estes esforços para acelerar os processos de manufatura destes testes diagnósticos. Desta maneira, novas pesquisas são necessárias para preencher algumas lacunas, incluindo:

- Os novos testes sorológicos conseguem identificar os anticorpos específicos para SARS-CoV-2?
- Há possibilidade destes testes apresentarem reações cruzadas com outros patógenos?

- Qual é a correlação entre a produção de anticorpos específicos para SARS-CoV-2 e a ocorrência de uma imunidade protetiva de longa duração?
 - Quanto tempo está imunidade protetiva dura em pacientes diagnosticados com a COVID-19? Este tempo varia de acordo com a gravidade da doença?
 - Os novos testes sorológicos podem servir de base para orientar o tempo de duração da imunidade em indivíduos vacinados?

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Society for Microbiology. **ASM expresses concern about coronavirus test reagent shortages**. 2020. Disponível em:

<<https://asm.org/Articles/Policy/2020/March/ASM-Expresses-Concern-about-Test-Reagent-Shortages>>. Acesso em: 24 de Agosto de 2021.

ANDING, L.; YING L.; JING P.; YUANCHENG H.; DONG X. **Antibody responses against SARS-CoV-2 in COVID-19 patients**. 2021

ATZRODT, C. L.; MAKNOJIA, I.; MCCARTHY, R. D. P.; OLDFIELD, T. M. et al.; A guide to COVID-19: a global pandemic caused by the novel coronavirus SARS-CoV-2. **Febs j**, 287, n. 17, p. 3633-3650, Sep 2020.

CÂMARA, B. **[Sem título]**. 11 de outubro de 2013. Il. color. Disponível em: <<https://www.biomedicinapadrao.com.br/2010/05/elisa.html>>. Acessado em 24 de agosto de 2021.

CANDIDO, D. S.; CLARO, I. M.; DE JESUS, J. G.; SOUZA, W. M. et al. Evolution and epidemic spread of SARS-CoV-2 in Brazil. **Science**, 369, n. 6508, p. 1255-1260, Sep 4, 2020.

CASTRO, R.; LUZ, P.; WAKIMOTO, M. et al. COVID-19: a meta-analysis of diagnostic test accuracy of commercial assays registered in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 180-187, 18 Apr. 2020. DOI: 10.1016/j.bjid.2020.04.003.

COHEN, J.; KUPFERSCHMIDT, K. Countries test tactics in ‘war’ against COVID-19. **Science** 2020, 367, 1287–1288.

CUERVO N. Z., GRANDVAUX N. **Ace2**: Evidência do papel como receptor de entrada para sars-cov-2 e implicações em comorbidades. *Elife*. 2020; 9:1-25. DOI: 10.7554 / eLife.61390. Disponível em: <<https://elifesciences.org/articles/61390>>. **Acessado em 24 de agosto de 2021.**

FINKEL, Y.; MIZRAHI, O.; NACHSHON, A.; WEINGARTEN-GABBAY, S. et al. The coding capacity of SARS-CoV-2. **Nature**, 589, n. 7840, p. 125-130, Jan 2021.

GUO, L.; REN, L.; YANG, S.; XIAO, M.; CHANG, D.; YANG, F.; DELA CRUZ, C.S. et al. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). **Clin. Infect. Dis.**2020.

HU, B.; GUO, H.; ZHOU, P.; SHI, Z. L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nat Rev Microbiol**, 19, n. 3, p. 141-154, Mar 2021.

JACOFISKY, D.; JACOFISKY, E. M.; JACOFISKY, M. Understanding Antibody Testing for COVID-19. **J Arthroplasty**, 35, n. 7s, p. S74-s81, Jul 2020.

KHAILANY, R.A.; SAFDAR, M; OZASLAN, M. Genomic characterization of a novel SARSCoV-2. **Gene Rep.**, 2020. doi: 10.1016/j.genrep.2020.100682.

LI X.; WANG W.; ZHAO X.; et al. Transmission dynamics and evolutionary history of 2019-nCoV. **J Med Virol**. 2020.

LIPPI, G. et al. The critical role of laboratory medicine during coronavirus disease 2019 (COVID-19) and other viral outbreaks. **Clin Chem and Lab Med**. 2020; (Epub ahead of print).

LONG Q.X.; TANG X. J.; SHI Q. L.; et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. **Nat Med**. 2020.

LUDWIG, S.; ZARBOCK, A. Coronaviruses and SARS-CoV-2: A Brief Overview. **Anesth Analg**, 131, n. 1, p. 93-96, Jul 2020.

LUO, Z.; ANG, M. J. Y.; CHAN, S. Y.; YI, Z. et al. Combating the Coronavirus Pandemic: Early Detection, Medical Treatment, and a Concerted Effort by the Global Community. **Research (Wash D C)**, 2020, p. 6925296, 2020.

MARDIAN, Y.; KOSASIH, H.; KARYANA, M.; NEAL, A. et al. Review of Current COVID-19 Diagnostics and Opportunities for Further Development. **Front Med (Lausanne)**, 8, p. 615099, 2021.

MAYARA L. B.; GAMUCHIRAI T.; SYED K. A.; JONATHON R C.; LOUIS-P. H.; JAMES C. J.; ZHIYI L.; STEPHANIE L.; EMILY M.; et al., **Diagnostic accuracy of serological tests for covid-19: systematic review and meta-analysis**. BMJ 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1136/bmj.m2516>>. Acessado em 23 de setembro de 2021

MEDCALC SOFTWARE LTD. **Calculadora de avaliação de teste de diagnóstico de Schoonjans F. MedCalc**. 2021. Disponível em: <https://www.medcalc.org/calculador/diagnostico_test.php>. Acessado em 08 de agosto de 2021.

MILLER, T. E.; GARCIA BELTRAN, W. F.; BARD, A. Z.; GOGAKOS, T. *et al.* Clinical sensitivity and interpretation of PCR and serological COVID-19 diagnostics for patients presenting to the hospital. **Faseb j**, 34, n. 10, p. 13877-13884, Oct 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim COE COVID-10**. Semana Epidemiológica 02, 10 de fevereiro de 2020a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim COE COVID-10**. Semana Epidemiológica 15 (05-10/04). 09 de abril de 2020b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim COE COVID-10**. Semana Epidemiológica 52 (20-26/12) 2020c.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim COE COVID-10**. Semana Epidemiológica 17 (19-25/04). 19 de abril de 2020d.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim COE COVID-10**. Semana Epidemiológica 30 (25-31/07) 30 de julho de 2021a.

NALLA, A. K.; CASTO, A. M.; HUANG, M. W.; PERCHETTI, G. A.; et al. Comparative Performance of SARS-CoV-2 Detection Assays Using Seven Different Primer-Probe Sets and One Assay Kit*Kit*. **J Clin Microbiol**, 58, n. 6, May 26, 2020.

NAQVI, A. A. T.; FATIMA, K.; MOHAMMAD, T.; FATIMA, U.; et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: structural genomics approach. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**, 1866, n. 10, p. 165878, Oct 1 2020.

PILLAY, T. S. Gene of the month: the 2019-nCoV/SARS-CoV-2 novel coronavirus spike protein. **J Clin Pathol**, 73, n. 7, p. 366-369, Jul 2020.

POPOVICH, N.; SANGER-KATZ, M. **The world is still far from herd immunity for coronavirus**. Disponível em:

<<https://www.nytimes.com/interactive/2020/05/28/upshot/coronavirus-herd-immunity.html>>. Acessado em 22 de setembro de 2021.

PRADO, T.; FUMIAN, T. M.; MANNARINO, C. F.; RESENDE, P. C. et al. **Wastewater-based epidemiology as a useful tool to track SARS-CoV-2 and support public health policies at municipal level in Brazil**. *Water Res*, 191, p. 116810, Mar 1, 2021.

PROMPETCHARA, E.; KETLOY, C.; PALAGA, T. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. **Asian Pac. J. Allergy Immunol.**, v. 38, p. 1-9, 2020.

RAHMAN, N.; BASHARAT, Z.; YOUSUF, M.; CASTALDO, G.; et al. Virtual Screening of Natural Products against Type II Transmembrane Serine Protease (TMPRSS2), the Priming Agent of Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). **Molecules**, 25, n. 10, May 12 2020.

SAFIABADI T.; et al. Tools and Techniques for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 Detection. **Clin Microbiol**. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33980687/>>. Acessado em 20 de setembro de 2021

SALLARD, E.; LESCURE, F. X.; YAZDANPANA, Y.; MENTRE, F. et al. **Type 1 interferons as a potential treatment against COVID-19**. *Antiviral Res*, 178, p. 104791, Jun 2020.

SETHURAMAN N.; JEREMIAH S. S.; RYO A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. **JAMA**. 2020. doi:10.1001/jama.2020.8259

SMITHGALL, M. C.; DOWLATSHAHI, M.; SPITALNIK, S. L.; HOD, E. A.; et al. Types of Assays for SARS-CoV-2 Testing. **A Review. Lab Med**, 51, n. 5, p. e59-e65, Sep 1, 2020.

TAH, W.L.Y.; ZHANG, J. **Viral kinetics and antibody responses in patients with covid-19**. medRxiv (preprint) 2020. [CrossRef]

TANG, Y.; SERDAN, T. D. A.; MASI, L. N.; TANG, S. et al. Epidemiology of COVID-19 in Brazil: using a mathematical model to estimate the outbreak peak and temporal evolution. **In: Emerg Microbes Infect**, 2020. v. 9, p. 1453-1456.

TSAI, S. C.; LU, C. C.; BAU, D. T.; CHIU, Y. J. et al. Approaches towards fighting the COVID-19 pandemic (Review). **Int J Mol Med**, 47, n. 1, p. 3-22, Jan 2021.

WINICHAKOON P.; CHAIWARITH R.; LIWSRISAKUN C.; et al. Negative nasopharyngeal and oropharyngeal swabs do not rule out covid-19. **J Clin Microbiol**. 2020. 58: e00297-20. doi:10.1128/JCM.00297-20

WOLFEL, R.; CORMAN, V. M.; GUGGEMOS, W.; SEILMAIER, M.; ZANGE, S.; MULLER, M. A.; NIEMEYER, D.; JONES, T. C.; VOLLMAR, P.; ROTHE, C.; et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. **Nature** 2020.

YAN, T.; XIAO, R.; LIN, G. Angiotensin-converting enzyme 2 in severe acute respiratory syndrome coronaviruse and SARS-CoV-2: A double-edged sword?. **The FASEB Journal**, v. 34, p. 6017-6026, 2020. doi: 10.1096/ fj.202000782.

YE, Q.; WEST, A. M. V.; SILLETTI, S.; CORBETT, K. D. Architecture and self-assembly of the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. **Protein Sci**, 29, n. 9, p. 1890-1901, Sep 2020.

YU, H. Q.; SUN, B. Q.; FANG, Z. F.; ZHAO, J. C.; LIU, X. Y.; LI, Y. M.; SUN, X. Z.; LIANG, H.F.; ZHONG, B.; HUANG, Z. F.; et al. Distinct features of SARS-CoV-2-specific IgA response in COVID-19 patients. **Eur. Respir. J.** 2020.

YÜCE, M.; FILIZTEKIN, E.; ÖZKAYA, K. G. **COVID-19 diagnosis -A review of current methods**. Biosens Bioelectron, 172, p. 112752, Jan 15 2021..

ZETTI Z. R.; SITI N. O.; SAMAT, M. N. A; ALI, U. K.; WONG K. K. Diagnostic performance of COVID-19 serology assays. **Malaysian J Pathol**. 2020; 42(1) : 13 – 21.

ZHOU, P.; YANG, X. L.; WANG, X. G.; HU, B. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, 579, n. 7798, p. 270-273, Mar 2020.

ZHU N.; ZHANG D.; WANG W.; et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **N Engl J Med**. 2020; 382: 727-733.

APÊNDICE 1 – TÍTULO DO APÊNDICE

QUESTIONÁRIO POPULACIONAL – COVID-19

Data da entrevista: ____/____/____

Assinatura do responsável pela entrevista: _____

Identificação do paciente

1. UBS do cadastro: _____
2. Bairro da residência: _____
3. Sexo: masculino feminino
4. Etnia auto-declarada: branco pardo negro indígena outro
5. Idade: ____ anos
6. Classe socioeconômica familiar (em nº salários mínimos - R\$ 1.045,00): _____
7. Escolaridade:

<input type="checkbox"/> Primário	<input type="checkbox"/> completo	<input type="checkbox"/> incompleto
<input type="checkbox"/> Ensino fundamental	<input type="checkbox"/> completo	<input type="checkbox"/> incompleto
<input type="checkbox"/> Ensino médio	<input type="checkbox"/> completo	<input type="checkbox"/> incompleto
<input type="checkbox"/> Graduação	<input type="checkbox"/> completo	<input type="checkbox"/> incompleto
<input type="checkbox"/> Pós-graduação	<input type="checkbox"/> completo	<input type="checkbox"/> incompleto
8. Profissão: _____
9. Trabalha em local: ventilado não/pouco ventilado
10. Estado civil: _____
11. Nº de pessoas que moram na residência: _____
12. Tem filhos: não sim
13. Número de filhos: _____

Sintomatologia relacionada à COVID-19: anotar a data de início de cada sintoma

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Febre _____
<input type="checkbox"/> Tosse _____
<input type="checkbox"/> Cansaço _____
<input type="checkbox"/> Dor de cabeça _____
<input type="checkbox"/> Dor muscular _____
<input type="checkbox"/> Dor de garganta _____
<input type="checkbox"/> Diarreia _____
<input type="checkbox"/> Conjuntivite _____
<input type="checkbox"/> Perda de olfato ou paladar _____
<input type="checkbox"/> Dificuldade para respirar ou falta de ar _____ | Realizou algum teste para COVID-19? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não
Resultado positivo: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não
Tipo de teste: <input type="checkbox"/> RT-qPCR <input type="checkbox"/> Teste rápido <input type="checkbox"/> sorológico |
|---|---|

Histórico médico

Tipo sanguíneo: _____

Possui alguma doença crônica? não sim Qual(is): _____

ANEXO 1 – TESTE SOROLÓGICO VALIDAÇÃO UFPR



Teste de ELISA para detecção de anticorpo humano COVID-19 IgG

MANUAL DE INSTRUÇÕES

Material para pesquisa UFPR
Formato de 96 poços para 44 testes (em duplicatas)
Armazene todos os reagentes a 2-8 ° C
Prazo de validade: 60 dias
Para amostras: Soro ou plasma

APENAS PARA USO EM PESQUISA. NÃO UTILIZAR PARA DIAGNÓSTICO. POR FAVOR LEIA TODO O PROCEDIMENTO ANTES DE INICIAR.

USO PRETENDIDO

Este kit utiliza o sistema de ELISA para a detecção do anticorpo IgG contra proteína N do vírus SARS-CoV-2 (COVID-19) em soro ou plasma humano.

PRINCÍPIO DO ENSAIO

O anticorpo humano COVID-19 IgG é detectado a partir da placa de ELISA revestida com proteína Nucleocapsídeo do SARS-CoV-2 e outros reagentes. Se a reação for positiva irá ocorrer desenvolvimento de coloração azul, que, após a adição da **HCl**, se torna amarela. A intensidade da cor é proporcional a quantidade de anticorpo COVID-19 IgG, quando o valor da absorbância é maior que o valor de corte, o resultado é considerado positivo. O teste é indicado para detectar infecções prévias por SARS-CoV-2. Melhores resultados são esperados se o soro for coletado 20 dias após início de sintomas.

MATERIAIS FORNECIDOS

- placa de 96 poços sensibilizada com proteína Nucleocapsídeo SARS-CoV-2;
- Leite em pó desnatado;
- TBST 10X
- Anti human IgG HPR
- Controle positivo (HC053)
- Controle negativo
- Solução de TMB
- Solução de HCl

MATERIAIS E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS, NÃO FORNECIDOS

- 1) Pipetadores de precisão e ponteiros descartáveis para fornecer 2-1000 µl.
- 2) Desejável pipetadores multicanal de 12 ou 8 canais e suporte para solução
- 3) Água ultrapura.
- 4) Tubos para preparar as diluições da amostra.
- 5) Papel absorvente.
- 6) Leitor de microplacas capaz de medir a absorbância a 450 nm.
- 7) Cronômetro.

ANTES DE COMEÇAR PREPARE AS SEGUINTE SOLUÇÕES

- Dilua **TBST 10X** para 1X. Misture bem e guarde **solução A 1X** a 2-8 °C por até 10 dias.
- **Solução TBST 1X + leite**. Misture 50 mL de **TBST 1 X** com 0.5 g de **Leite em pó**. Misture vigorosamente até homogeneização completa. A solução **TBST 1X + leite** pode ser armazenada entre 2-8° C por até 7 dias.

Laboratório de Microbiologia Molecular – UFPR LITORAL – Prof. Luciano Huergo –
 luciano.huergo@gmail.com – (41) 9 9676-5856



Teste de ELISA para detecção de anticorpo humano COVID-19 IgG

DILUIÇÃO DE AMOSTRAS E CONTROLES

Diluição do soro e controles. Em tubos novos de 2 mL adicione 2 mL de solução **TBST 1X + leite**. Adicione 2 µL de soro e misture bem. O mesmo procedimento deve ser realizado para o **controle positivo** e **controle negativo**.

PROCEDIMENTO DO ENSAIO

- Adicione 100 µL de **TBST 1X + leite** aos poços A1 e B1 (este será controle sem soro);
 -
 - Adicione 100 µL de **controle negativo diluído** aos poços A2 e B2 (este será controle soro negativo);
 - Adicione 100 µL de **controle positivo diluído** aos poços A3 e B3 (este será controle soro positivo);
 - Adicione 100 µL de amostras diluídas aos outros poços em duplicata (i.e amostra 1; A4 e B4)
- 1) Tampe a placa e incube a placa por 1 hora em temperatura ambiente;
 - 2) Este sistema está adaptado para lavagem Manual das placas. Remova a mistura de incubação invertendo o conteúdo da placa em um recipiente de resíduos adequado. Com a placa invertida remova completamente o líquido batendo com a placa em papel absorvente até remoção total e completa do líquido. *A remoção completa do líquido em cada etapa é essencial para um bom desempenho;*
 - 3) Preencha cada poço com 200 µL de **TBST 1x**. Agite levemente a placa e remova completamente o líquido invertendo a placa e batendo contra papel absorvente. **Este processo deve ser repetido ao total de 3 vezes;**
 - 4) Preparar no momento do uso 12 mL de **anti human IgG HPR diluído 1/3000**. Adicione 100 µL do **secundário** diluído a cada poço. Misture bem. Cubra e incube a placa por 1 hora em temperatura ambiente;
 - 5) Lave a placa de 3x vezes com 200 µL de **TBST 1x** como descrito no item 3;
 - 6) Adicione 100 µL de **TMB** a cada poço. Inicie o cronômetro para garantir que todas as amostras tenham o mesmo tempo de incubação final ao adicionar **HCl**. Incubar em temperatura ambiente por 10 min. *Misture ocasionalmente com leve agitação da placa;*
 - 7) Adicione 100 µL de **HCl** a cada poço.
 - 8) Determine a absorbância a 450 nm usando um leitor de microplacas.

Notas importantes

Todos os controles e amostras são executados em duplicata. Controles e amostras devem ser testados ao mesmo tempo. Agite levemente a placa após adicionar cada solução;



Teste de ELISA para detecção de anticorpo humano COVID-19 IgG

Ao pipetar reagentes, mantenha uma ordem consistente de adição de poço para poço. Isso garante que os tempos de incubação sejam iguais para todos os poços;

Leia a absorbância imediatamente após adicionar a solução de parada;

A lavagem incompleta afetará o resultado do teste. Todo o líquido de lavagem residual deve ser drenado dos poços de maneira eficiente, seguida de batida forçada da placa em papel absorvente. Nunca insira papel absorvente diretamente nos poços;

A **start solution** é sensível à luz, evite a exposição prolongada à luz. Evite contato com suporte metálico dos pipetadores pois isto degrada a solução. A solução não deve ser usada caso apresente qualquer tonalidade de cor.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Para que o ensaio seja válido, as seguintes especificações devem ser atendidas:

- 1) Os poços A1 e B1 sem soro não devem desenvolver cor (Absorbância menor que 0,1);
- 2) A média obtida da Absorbância do controle positivo (A2 e B2) deve ser maior que 1,8 e o coeficiente de variação (CV%) das duplicatas menor que 10%;
- 3) O controle negativo deve ter absorbância média inferior a 13% do valor do controle positivo;
- 4) O CV das duplicatas com Absorbância $\leq 0,5$ não deve ser superior a 20%;
- 5) O CV das duplicatas com Absorbância $\geq 0,5$ não deve ser superior a 15%.
- 6) Multiplique o resultado da absorbância média obtida com o controle positivo (Poços A3 e B3) por 0,13 para determinar o valor de corte do ensaio. Exemplo: absorbância do controle positivo = 2,2. O valor de corte será = $2,2 \times 0,13 = 0,286$.

Amostras com valores médios de Absorbância maiores que o valor de corte (no exemplo acima, 0,286) são consideradas POSITIVAS para IgG.

A intensidade da absorbância é proporcional a quantidade de IgG reativo para proteína N do SARS-CoV-2 na amostra.

NOTAS DE SEGURANÇA

- Este kit contém soluções irritantes e corrosivas. Evite contato com a pele e os olhos. Em caso de contato, lave a área com água em abundância. Em caso de ingestão e inalação acidental, procure atendimento médico imediatamente;
- Use luvas, roupas e proteção facial durante a manipulação;
- Deve-se tomar cuidado ao manipular amostras biológicas, seguindo as regras de biossegurança;
- Evite a geração de aerossóis;
- Os resíduos devem ser descartados de acordo com os regulamentos federais, estaduais e locais de controle ambiental.

Laboratório de Microbiologia Molecular – UFPR LITORAL – Prof. Luciano Huergo –
luciano.huergo@gmail.com – (41) 9 9676-5856



Teste de ELISA para detecção de anticorpo humano COVID-19 IgG

Modelo de placa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													A
B													B
C													C
D													D
E													E
F													F
G													G
H													H

EXCLUSIVO PARA USO EM PESQUISA. NÃO AUTORIZADO PARA USO EM PROCEDIMENTOS DIAGNÓSTICOS

ANEXO 2 –TESTE SOROLÓGICO COMERCIAL



allserum E I A

COVID19 IgG
Instruções de Uso

Teste ELISA para determinação qualitativa de anticorpos IgG anti-coronavírus SARS-CoV-2, causador da COVID-19, em amostras de soro e plasma humano

 **MBIOLÓG**
DIAGNÓSTICOS

FINALIDADE

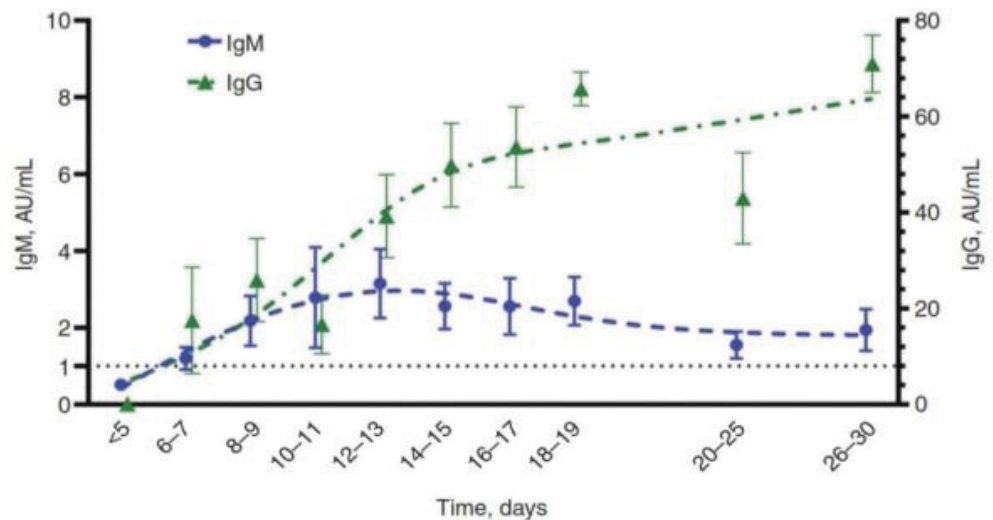
O kit Allserum COVID19 IgG é um sistema para determinação qualitativa de anticorpos da classe IgG contra o coronavírus SARS-CoV-2 em amostras de soro e plasma humano.

Somente para uso diagnóstico in vitro por profissionais habilitados da área médica e com especialização em análises clínicas.

SIGNIFICADO CLÍNICO

Em dezembro de 2019, a cidade de Wuhan, capital da província de Hubei na China, tornou-se o epicentro do surto de uma pneumonia de causa desconhecida. No início de janeiro de 2020, próximo ao dia 07, cientistas chineses isolaram o novo coronavírus SARS-CoV-2 de pacientes infectados com a pneumonia severa, posteriormente denominada de COVID-19.

O ensaio para pesquisa do RNA viral, RT-PCR, possui valor diagnóstico durante o período inicial da infecção e é considerado o padrão ouro, para identificação do vírus SARS-Cov-2. O ensaio para pesquisa de anticorpos, como os de ELISA, é eficaz para identificação de indivíduos que tiveram exposição passada ao vírus, uma vez que anticorpos começam a ser produzidos entre 5-7 dias após o início dos sintomas. A pesquisa de anticorpos é ainda uma importante ferramenta em estudos de soroprevalência, pois possibilita a identificação de indivíduos assintomáticos ou oligossintomáticos, que foram expostos ao vírus.



Perfil de produção de anticorpos IgG e IgM versus tempo da infecção em pacientes acometidos com COVID-19. Dados de referência para ensaio de quimioluminescência. Padoan et al., Clin Chem Lab, 2020. <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-0443>

PRINCÍPIO DO MÉTODO











Neste método, os poços da microplaca são recobertos proteínas recombinantes do nucleocapsídeo do vírus SARS-Cov-2 (fase sólida). Na primeira incubação os anticorpos (IgG, IgA e IgM) anti-Sars-Cov-2 presente na amostra ligam-se as proteínas recombinantes da fase sólida. Após o processo de lavagem todos os outros componentes da amostra não complexados são retirados. Em uma segunda incubação os anticorpos da classe IgG anti-SARS-Cov-2 são detectados pela adição de um segundo anticorpo policlonal anti-IgG humano conjugado a enzima peroxidase (HRP). Um segundo processo de lavagem retira os componentes não fixados. A enzima capturada na fase sólida agindo no substrato, gera um composto de coloração azul proporcional a quantidade de anticorpos anti-IgG presentes na amostra. A reação é interrompida pela adição de uma solução ácida, alterando a coloração da reação para amarela, cuja absorbância é lida a 450/620 nm.

ARMAZENAMENTO, TRANSPORTE E VALIDADE

- ✓ A data de validade está impressa no rótulo de cada reagente, porém, a validade do produto acabado é de 6 (Seis) meses, conforme Resolução RDC N° 348 de 17/03/2020.
- ✓ Não usar reagentes cuja data de validade tenha expirado.
- ✓ Todos os componentes devem ser mantidos sob refrigeração entre 2 a 8°C, mesmo após sua abertura e utilização.
- ✓ Os reagentes poderão ser transportados por até 72 horas entre 15-25°C, sem que isso afete a qualidade dos mesmos.
- ✓ Manter o kit ao abrigo da luz e da umidade.
- ✓ Os reagentes devem permanecer fora do refrigerador somente o tempo necessário para as dosagens. Não congelar os reagentes.
- ✓ Os reagentes em uso, quando respeitado o armazenamento correto, são estáveis até a data de validade informada nos rótulos.

Atenção: produto de uso único, **não** sendo passível de reutilização.

COMPOSIÇÃO E APRESENTAÇÕES

COMPONENTES	COMPOSIÇÃO	APRESENTAÇÕES	
		96T	192T
MICROPLACA 	Microplaca com 12 tiras com 8 pocinhos recobertos com antígeno recombinante do coronavírus SARS-COV-2. <i>Pronta para uso.</i>	1x96 Cav.	2x96 Cav.
CONJUGADO 	Anticorpo policlonal de cabra anti-IgG humana conjugado com enzima peroxidase (HRP). <i>Pronto para uso.</i>	1x15 mL	2x15 mL
DILUENTE DE AMOSTRA 	Solução proteica tamponada com conservantes. <i>Pronto para uso.</i>	1x100 mL	2x100 mL
CONTROLE POSITIVO 	Soro humano contendo anticorpos IgG específicos para coronavírus SARS-COV-2, diluído em solução tampão com conservantes. <i>Pronto para uso.</i>	1x1,2 mL	1x1,2 mL
CONTROLE NEGATIVO 	Soro humano isento de anticorpos IgG específicos para coronavírus SARS-COV-2, diluído em solução tampão com conservantes. <i>Pronto para uso.</i>	1x1,2 mL	1x1,2 mL
SOLUÇÃO DE LAVAGEM 20X 	Solução tampão com detergente e conservantes. <i>Concentrada 20X.</i>	1x60 mL	1x150 mL
SUBSTRATO  	3,3',5,5'-tetra-metil-benzidina (TMB) em solução tampão contendo peróxido de hidrogênio H ₂ O ₂ . <i>Pronto para uso.</i>	1x15 mL	1x30 mL
SOLUÇÃO DE PARADA  	Solução de (H ₂ SO ₄). <i>Pronta para uso.</i>	1x15 mL	1x30 mL
MATERIAIS AUXILIARES	Manual de Instruções	1 Un.	1 Un.
	Folhas Adesivas	2 Un.	4 Un.

PRECAUÇÕES E CUIDADOS ESPECIAIS

1. Não pipetar reagentes com a boca. Utilizar sempre pipetas automáticas ou dispositivos de sucção de reagentes;
2. Não misturar ou trocar lotes de reagentes diferentes;
3. Os controles contendo componentes de natureza humana foram testados e determinados como não-reativos para HBsAg, HCV e HIV. Apesar disso, não há nenhum ensaio laboratorial que possa oferecer completa confiabilidade de ausência de agentes infecciosos. Portanto, manipular os controles como sendo potencialmente infecciosos;
4. As tiras da microplaca não utilizadas devem ser protegidas da umidade e mantidas na bolsa plástica fornecida com o kit;
5. Evitar contaminação microbiana dos reagentes e não utilizar reagentes que tenham sinais de contaminação ou precipitação;
6. Caso haja contato com quaisquer reagentes lavar a área afetada com água em abundância. Em caso de ingestão de reagentes ou contato com os olhos e/ou mucosas, procurar auxílio médico imediato levando esta instrução de uso;
7. Utilizar equipamentos de proteção individual, segundo normas de biossegurança;
8. A água (destilada ou deionizada) utilizada na limpeza do material ou nos procedimentos deve ser recente e isenta de agentes contaminantes;
9. Certificar-se das condições adequadas de funcionamento dos equipamentos de análise;
10. O descarte do material utilizado deve ser feito segundo os critérios de biossegurança;
11. Lavar as mãos após trabalhar com material potencialmente infeccioso;
12. Utilizar sempre as tampas e frascos enviados com o kit para armazenamento dos reagentes. Não intercambiar as tampas dos reagentes;
13. A data de validade está descrita no rótulo dos reagentes. Não utilizar produtos após a data de validade;
14. Armazenar o produto conforme especificações do rótulo. O armazenamento inadequado poderá afetar a qualidade do produto;
15. Manter as boas práticas laboratoriais a fim de minimizar os erros pré-analíticos, analíticos e pós-analíticos.

LIMITAÇÕES DO ENSAIO E RISCOS RESIDUAIS

- Um resultado negativo não exclui a presença do vírus. Outros métodos e técnicas devem ser realizados para confirmação do resultado.
- Toda técnica ELISA pode apresentar resultados falsamente reativos.
- Utilizar amostras controle e/ou controles internos rotineiramente.
- Os resultados positivos devem ser confirmados por outras técnicas.

INSUMOS E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS

- ✓ Água destilada ou deionizada;
- ✓ Leitora de ELISA com filtro para 450/620 nm;
- ✓ Lavadora de placas (Opcional);
- ✓ Cronômetro;
- ✓ Pipetas manuais ou automáticas;
- ✓ Ponteiras descartáveis;
- ✓ Estufa 37°C
- ✓ Vidrarias.

AMOSTRA BIOLÓGICA

- ✓ Soro
- ✓ Plasma (EDTA / Heparina / Citrato / Fluoreto)

PROCEDIMENTO PARA COLETA

 Utilizar EPIs como máscara N95, ou equivalente, e óculos de proteção para coleta de amostras

1. Realizar a coleta por técnicas de flebotomia conhecidas;
2. Centrifugar a amostra e separar o soro/plasma;
3. Armazenar a amostra por até 7 dias entre 2-8 °C ou por seis meses congeladas.
4. Evitar congelar e descongelar as amostras repetidamente.

Importante: Não utilizar amostras lipêmicas, ictéricas ou altamente hemolisadas. Tais amostras podem apresentar resultados falsos. Também, não inativar as amostras com calor pois pode deteriorar a molécula alvo da reação.

PREPARO DOS REAGENTES E PROCEDIMENTO PRÉ-OPERACIONAIS

- ✓ Antes da realização do teste, estabilizar todos os reagentes e amostras à temperatura ambiente (15 a 30°C) e homogeneizá-los suavemente.

Diluição das Amostras

- ✓ Diluir cada amostra de soro/plasma a ser testada com o diluente da amostra, na proporção de 1:101 (exemplo: 10 µL de amostra + 1 mL de diluente). Homogeneizar a diluição sem provocar a formação de espuma.
- ✓ Os controles positivo e negativo são prontos para uso.
- ✓ Montar o protocolo de identificação e orientação de aplicação das amostras e dos padrões na placa onde será realizada a análise.
- ✓ Testar obrigatoriamente o controle negativo em duplicata. Preferencialmente, testar o controle positivo e amostras em duplicata.
- ✓ Deixar que a placa atinja a temperatura ambiente antes de abrir a sua embalagem. Separar somente as tiras necessárias para a realização do teste, mantendo as restantes na embalagem plástica com dessecante. Retirar o ar da embalagem e fechá-la hermeticamente.

Solução de lavagem

- ✓ A solução de lavagem é fornecida concentrada 20X. Para o preparo da solução de lavagem de uso diluir uma (1) parte da solução de lavagem concentrada [20X] para dezenove (19) partes de água deionizada ou destilada (1:20). A solução após preparada deverá ser estocada em frasco limpo e seco devidamente tampado. Cristais na solução concentrada desaparecerão após aquecimento em banho-maria a 37°C. Estável por trinta dias se armazenada entre 2 e 8°C.

Sugestão de esquema de placa

Sugerimos a orientação ao lado para dispensar controles e amostras, reservando um poço para o branco:

Reagente	Posição
Branco	A1
Controle Positivo	B1
Controle Negativo	C1, D1
Amostras	E1 em diante

PROCEDIMENTO

PASSO 1	Conforme protocolo de aplicação das amostras, dispensar 100 µL de controle positivo e negativo (sempre em duplicata) e de cada amostra diluída (preferencialmente em duplicata) nos respectivos pocinhos das tiras. Deixar o pocinho A1 vazio para o branco. Atenção: cobrir a placa com folha adesiva e incubá-la por 40 minutos a 37°C ;
PASSO 2	Lavar cada cavidade da microplaca (5 vezes cada cavidade) com 300 µL da Solução de Lavagem SL diluída (vide preparo dos reagentes). Esta etapa deve ser realizada adequadamente para garantir resultados confiáveis e precisos. No caso de lavagem manual da microplaca, remover o fluido restante batendo vigorosamente a placa invertida sobre folhas de papel absorvente;
PASSO 3	Dispensar 100 µL do conjugado em cada pocinho, exceto no pocinho do branco. Atenção: cobrir a placa com folha adesiva e incubá-la por 40 minutos a 37°C ;
PASSO 4	Repetir o processo de lavagem como descrito no item 2. Remover o fluido restante batendo vigorosamente a placa invertida sobre folhas de papel absorvente.
PASSO 5	Dispensar 100 µL de substrato em <u>todos</u> os pocinhos, inclusive no poço A1 do branco. Cobrir novamente e incubar por <u>exatamente</u> 10 minutos à temperatura ambiente (20 a 25°C), <u>ao abrigo da luz</u> .
PASSO 6	Adicionar 100 µL da solução de parada em todos os pocinhos para interromper a reação. Qualquer cor azul desenvolvida durante a incubação se tornará amarela. Amostras altamente positivas podem causar precipitações escuras.
PASSO 7	Ler a Absorbância a 450/620 nm com o leitor de ELISA, dentro de 10 minutos. Usar o pocinho A1 como "branco" para zerar o aparelho ou, quando isso não for possível, descontar o valor do "branco" de todos os valores mensurados.

VALIDAÇÃO DO ENSAIO

Os resultados de um ensaio serão considerados válidos quando:

- ✓ **Branco:** $\leq 0,100$
- ✓ **Controle Negativo:** $\leq 0,300$ (após descontar o branco)
- ✓ **Controle Positivo:** Após descontar a absorbância do branco $\geq 0,800$ D.O.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Quando não for possível zerar o aparelho, descontar o valor da Absorbância do "branco" (A1), das demais Absorbâncias obtidas.

Considerar cada placa individualmente para o cálculo dos resultados.

- **Valor médio de Absorbância do Controle Negativo [VMCN]**
Calcular o valor médio das Absorbâncias do controle negativo:

Fórmula	Exemplo
$VMCN = \frac{(Abs1 + Abs2)}{2}$	$VMCN = \frac{(0,074 + 0,072)}{2} = 0,073$

- **Valor do "Cut-Off" [CO]**
Adicionar 0,250 ao VMCN

Fórmula	Exemplo
$CO = VMCN + 0,250$	$CO = 0,073 + 0,250 = 0,323$

- **Índice de cada amostra**
- Dividir o valor da Absorbância de cada amostra pelo valor do CO:

Fórmula	Exemplo
$Index = \frac{Abs. da Amostra}{CO}$	$Index = \frac{0,830}{0,323} = 2,57$

Observado	índice	Interpretação
Valores (médios) de Absorbância do soro mais de 10% acima do CO	>1,1	POSITIVO
Valores (médios) de Absorbância do soro entre 10% acima e 10% abaixo do CO	0,9–1,1	INDETERMINADO
Valores (médios) de Absorbância do soro mais de 10% abaixo do CO	<0,9	NEGATIVO

CARACTERÍSTICAS DO SISTEMA

Sensibilidade e Especificidade

O ensaio de ELISA ALLSERUM COVID19 IgG da MBiolog foi comparado com amostras clínicas de pacientes provenientes do surto de coronavírus no Brasil. As amostras positivas são de pacientes internados com insuficiência respiratória aguda e que foram determinadas como positivas para a doença infecciosa COVID-19 pelo método de PCR em tempo real. As amostras negativas são soros e plasmas provenientes de pessoas saudáveis do banco de amostras da MBiolog armazenadas e coletadas anteriormente ao surto de COVID-19. Os resultados apresentados na Tabela abaixo, indicam o grau de concordância entre a clínica do paciente e o referido produto.

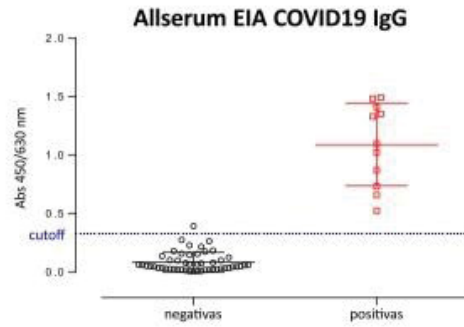
		PCR tempo Real/Painel Interno		
		DETECTÁVEL	NÃO DETECTÁVEL	TOTAL
Allserum COVID19 IgG	+ IgG	38	0	38
	- IgG	4	120	124
	Total	42	120	162

Sensibilidade: $42/46 = 91,3\%$

Especificidade: $120/120 = 100\%$

Sensibilidade diagnóstica relacionada ao período após o início dos sintomas

Dias após início dos Sintomas	N	Reagente	Não Reagente	Sensibilidade
< 10 Dias	8	5	3	73%
> 10 Dias	34	33	1	97%



TERMO DE GARANTIA

A qualidade dos reagentes é assegurada até a data de validade mencionada na embalagem de apresentação, desde que armazenados e transportados nas condições adequadas.

SIMBOLOGIA UTILIZADA



RISCO BIOLÓGICO



REAGENTE CORROSIVO
(Manipular com precaução)



REAGENTE FOTOSSENSÍVEL
(Manter ao abrigo da luz)



LIMITE DE TEMPERATURA
(conservar a)



O CONTEÚDO É SUFICIENTE
PARA <N> TESTES



NÚMERO DO LOTE



PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO
IN VITRO



DATA DE VALIDADE
(último dia do mês)



CONSULTAR
INSTRUÇÕES DE USO



FABRICANTE



Rua Gama, 337 | Vila Paris | Contagem/MG | CEP: 32372-120
CNPJ: 03.590.360/0001-89
Tel.: (31) 3507.0707 | (31)3507.0700
mbiolog@mbiolog.com.br | www.mbiolog.com.br

Revisão: 02 – 06/2020

Farm. Resp.: Fabrício Galvão de Brito - CRF-MG: 9587