

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CONTRA SARS-CoV-2 ANALISADA POR ATÉ
SEIS MESES DA INFECÇÃO AGUDA E UTILIDADE CLÍNICA DE TESTES
RÁPIDOS IMUNOCROMATOGRÁFICOS INDIRETOS DISPONÍVEIS NO BRASIL

Por

Camila Amormino Corsini

BELO HORIZONTE

2022

Camila Amormino Corsini

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CONTRA SARS-CoV-2 ANALISADA POR ATÉ
SEIS MESES DA INFECÇÃO AGUDA E UTILIDADE CLÍNICA DE TESTES
RÁPIDOS IMUNOCROMATOGRÁFICOS INDIRETOS DISPONÍVEIS NO BRASIL

Dissertação de mestrado apresentada no programa de pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial de obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde - Área de concentração Doenças infecto-parasitárias e crônicas não transmissíveis/ DIP- DCNT.

Orientadora: Dra. Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz.

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 01/09/2022

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB 6 3740/00

C818a Corsini, Camila Amormino.
2022

Avaliação da resposta imune contra SARS-CoV-2 analisada por até seis meses da infecção aguda e utilidade clínica de testes rápidos imunocromatográficos disponíveis no Brasil/ Corsini, Camila Amormino. – Belo Horizonte, 2022

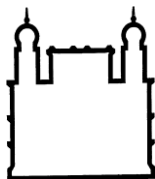
XX, 190 f., il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 131-156

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Doenças infecto-parasitárias e crônicas não transmissíveis/DIP - DCNT

1. Imunologia 2. COVID-19 3. SARS-CoV-2 I. Título. II. Queiroz, Rafaella Fortini Grenfell (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.2



MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
Instituto René Rachou – FIOCRUZ MINAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências da

Saúde

Ata da ducentésima octogésima quinta defesa de dissertação de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da aluna Camila Amormino Corsini orientada pela Dra. Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz.

No primeiro dia do mês de setembro de dois mil e vinte e dois, às quatorze horas, realizou-se por web conferência o exame da ducentésima octogésima quinta defesa de dissertação de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou/FIOCRUZ MINAS, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências – área de concentração: Doenças infecto-parasitárias e crônicas não transmissíveis/DIP -DCNT. A dissertação da aluna **Camila Amormino Corsini** intitula-se **“Avaliação da resposta imune contra SARS-CoV-2 analisada por até seis meses da infecção aguda e utilidade clínica de testes rápidos imunocromatográficos indiretos disponíveis no Brasil”**. A banca examinadora foi constituída pelos professores: Dra. Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz – IRR/FIOCRUZ MINAS (Orientadora/Presidente), Dra. Andréa Teixeira de Carvalho – IRR/FIOCRUZ MINAS (Titular) e Dr. Daniel Gonçalves Chaves - UFMG/Hemominas (Titular). Após exposição, a candidata foi arguida oralmente pelos membros da banca tendo como resultado:

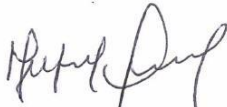
APROVADA

APROVADA CONDICIONALMENTE: Quando o trabalho final necessitar de elaboração adicional ou revisões parciais.

NÃO APROVADA

Uma vez encerrado o exame, eu, Dra. Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz, presidente da banca, assino a presente ata e atesto a participação remota dos membros da Banca Examinadora.

Belo Horizonte, 01 de setembro de 2022.


Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz
Pesquisadora em Saúde Pública
SIAPE: 2182582
Centro de Pesquisas René Rachou / Fiocruz

Dra. Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz - IRR/FIOCRUZ MINAS (Orientadora/Presidente)



p/

Dra. Andréa Teixeira de Carvalho – IRR/FIOCRUZ MINAS(Titular)

p/



Dr. Daniel Gonçalves Chaves - UFMG/Hemominas (Titular)

Rua Uberaba, 780 - Barro Preto Belo Horizonte MG Brasil Cep: 30180-080
Tel.: (31) 3295-1492 <http://www.cpqrr.fiocruz.br/posgraduacao/cienciasdasaude>

Dedico este trabalho a todos os pacientes e aos profissionais de saúde que enfrentaram (e enfrentam) bravamente a COVID-19.



“Construí amigos, enfrentei derrotas, venci obstáculos, bati na porta da vida e disse-lhe: Não tenho medo de vivê-la!”

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

Nestes últimos dois anos de muito trabalho e coragem durante o enfrentamento da pandemia de COVID-19, gostaria de agradecer as pessoas que me acompanharam e me incentivaram desde o início do meu mestrado e foram fundamentais para a conclusão deste sonho.

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus pela dádiva da vida e por todas as minhas conquistas alcançadas. Obrigada por me permitir errar, aprender, crescer, e por toda a força que tem me dado diante de qualquer adversidade. Sou extremamente grata por ser rodeada por tantas pessoas especiais que são luz em minha vida.

Nossa Senhora Aparecida, obrigada por nunca soltar a minha mão e iluminar meus passos aonde quer que eu vá.

Agradeço em especial minha família querida pelo incentivo diário e por todos os momentos de alegria e união. Agradeço imensamente aos meus pais, Consuelo e Lucil, que desde criança me ensinaram sobre a importância da simplicidade, do conhecimento e da ajuda ao próximo. Obrigada pelo imenso apoio em todas as etapas da minha vida! Sem vocês, eu não chegaria até aqui.

Ao meu querido e brilhante irmão Rafael, por todo o apoio, incentivo e companheirismo em todos os momentos da minha vida.

À minha orientadora e amiga de vida Dra. Rafaella Fortini, por toda confiança e apoio desde que decidimos trabalhar com este projeto no início de 2020, onde ainda não tínhamos a dimensão do que seria a pandemia de COVID-19 e os desafios que iríamos enfrentar. Obrigada pelos ensinamentos, conselhos e por todos os incentivos que têm me passado durante estes anos na Fiocruz. Obrigada por ser luz e benção em minha vida.

À toda equipe do grupo Diagnóstico e Terapia de Doenças Infecciosas e Câncer, meu querido DATA, que se fez inteiramente presente durante o enfrentamento da pandemia desde o dia 1.

Obrigada em especial as minhas queridas “Batgirls”, Priscilla, Nathalie e M Luysa, que sempre foram a minha força e são mais que minhas amigas de trabalho, são presentes que a pesquisa me trouxe durante esta caminhada.

Obrigada Priscilla, querida Pri (Socorro), pela extrema parceria nas idas incansáveis ao Hospital da Baleia durante as coletas nas ALAs e CTIs de COVID-19. Obrigada pela força que tem me dado principalmente nos dias ruins, com a enfermaria lotada, quando recebíamos péssimas notícias de nossos pacientes. Obrigada pela dedicação durante as coletas dos prontuários e por todo o carinho que tem depositado nesta pesquisa. Sem dúvidas, sua ajuda foi crucial para o desenvolvimento deste estudo. Obrigada por sua amizade, parceria e companheirismo de sempre.

Obrigada Nathalie, querida Nath, por toda a ajuda nas coletas dos pacientes nas ALAs como nos retornos dos pacientes durante o acompanhamento pós internação, além de toda a ajuda nas diferentes etapas desta pesquisa. Obrigada por todo o carinho, amizade, preocupação e força que tem me dado nestes dois anos. Sua parceria tanto nos experimentos, como nas disciplinas, foi fundamental. Não tenho como agradecer.

Obrigada Maria Luysa, querida Malu, pela amizade, conselhos, paciência, e por sempre me socorrer durante os desafios das disciplinas e durante a escrita da dissertação. Obrigada por toda a confiança que tem me passado desde o primeiro dia que assumi a referência no grupo DATA. Espero trabalharmos juntas novamente em breve.

Obrigada aos meus queridos amigos da Fiocruz, Dr. Paulo, Daniel, Sarah, Viviane, Priscila Fernanda, Jéssica, Wander, Jussara, Áureo, Suelene, Matheus e Patrícia, que foram fundamentais para a realização desta pesquisa, seja na logística das coletas, retorno dos pacientes, ajuda nos experimentos ou no incentivo diário.

Obrigada Dr. Olindo Assis pela grande parceria e contribuição durante as análises da resposta imune celular deste trabalho.

Obrigada a toda equipe do Hospital da Baleia, em especial a Adelina e Cecília, pela amizade e companheirismo desde o início deste projeto.

Aos meus queridos amigos da Fundação Hemominas pelo grande incentivo desde o primeiro dia da minha iniciação científica na instituição.

Pesquisadores componentes da banca: Andréa Teixeira, Daniel Chaves e Pedro Alves, um agradecimento especial a estes que aceitaram participar deste momento tão importante durante minha formação como cientista.

Aos meus amigos de infância e carreira acadêmica, em especial minhas amigas de profissão e de vida, Érica, Larissa, Fabíola, Déborah, Carolina e Amanda. Obrigada pelos ensinamentos e conselhos durante a iniciação científica, como também no mestrado.

E claro, obrigada mais que especial ao meu incentivador maior, meu marido, companheiro de vida, Luiz Fernando. Obrigada por todo amor, carinho, preocupação, apoio e compreensão em tantos momentos difíceis durante esta caminhada. Obrigada por estar ao meu lado durante todos esses anos e pelos presentes de cada dia, e por saber me fazer tão feliz.

Por fim, agradeço imensamente a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta pesquisa. Muito obrigada!

RESUMO

A atual pandemia de COVID-19 representa uma crise aguda de saúde e economia global, com consequências alarmantes na mortalidade e morbidade humana. Diante disso, há uma necessidade urgente de maiores estudos acerca da resposta imune inata quanto adquirida frente a infecção pelo SARS-CoV-2, para poder tanto aumentar sua eficácia, quanto prevenir seus efeitos deletérios. Com isso, este trabalho teve como objetivo esclarecer a cronologia de anticorpos IgM/IgG, a cinética de mediadores solúveis séricos após COVID-19 e a aplicabilidade do uso dos testes rápidos indiretos disponíveis no Brasil. Para avaliar a resposta imune inata e humoral frente a infecção por SARS-CoV-2, amostras de 330 pacientes internados no Hospital da Baleia, Belo Horizonte, positivos e negativos para COVID-19, com amostras coletadas no início da internação até seis meses do aparecimento dos primeiros sintomas, foram coletadas para a determinação da resposta imune utilizando ELISA *in house* e citometria de fluxo, para posterior avaliação da utilidade e confiabilidade dos testes rápidos indiretos disponíveis para uso no Brasil. De um modo geral, os pacientes RT-qPCR+ passaram a ter IgM detectáveis por ELISA a partir da primeira semana de acompanhamento, o qual permaneceu detectável por até oito semanas. O anticorpo do tipo IgG apresentou altos títulos a partir da segunda semana do início de sintomas e permaneceu detectável durante os seis meses do estudo. Ao avaliar separadamente a cronologia dos anticorpos IgM e IgG entre os pacientes RT-qPCR positivos por idade, gênero, presença ou não de neoplasia e por gravidade clínica da doença, foi observado perfis de anticorpos semelhantes entre estes grupos, não tendo diferença estatística significativa. Ao realizar a quantificação dos biomarcadores solúveis sistêmicos, as quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas reguladoras e fatores de crescimento avaliados, apresentaram uma queda durante os seis meses de acompanhamento com exceção para CCL11, CXCL8, CCL3, CCL4, CCL5, IL-6, IFN-g, IL-17, IL-5, FGF-basic, PDGF, VEGF, G-CSF e GM-CSF. Após análise de anticorpos neutralizantes pelo teste ECO F COVID nAb (ECO Diagnóstica), um número significativo dos pacientes infectados apresentou anticorpos neutralizantes para a cepa de referência de Wuhan e para as variantes Alpha, Gamma e Beta. Ainda, ao avaliar os testes rápidos imunocromatográficos indiretos disponíveis no Brasil, os mesmos apresentaram uma boa sensibilidade e especificidade na detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 após 15 dias de sintomas.

Palavras-chave: SARS-CoV-2, COVID-19, resposta imune.

ABSTRACT

The current COVID-19 pandemic represents an acute global health and economic crisis, with alarming consequences for human mortality and morbidity. Therefore, there is an urgent need for further studies on the innate and acquired immune response to SARS-CoV-2 infection, to both increase its effectiveness and prevent its deleterious effects. Thus, this study aimed to clarify the chronology of IgM/IgG antibodies, the kinetics of serum soluble mediators after COVID-19 and the applicability of the use of indirect rapid tests available in Brazil. To evaluate the innate and humoral immune response to SARS-CoV-2 infection, samples from 330 patients hospitalized at Baleia Hospital, Belo Horizonte, positive and negative for COVID-19, with samples collected at the beginning of hospitalization up to six months after admission. Appearance of the first symptoms, were collected for the determination of the immune response using in-house ELISA and flow cytometry, for later evaluation of the usefulness and reliability of the indirect rapid tests available for use in Brazil. Overall, RT-qPCR+ patients had ELISA detectable IgM from the first week of follow-up, which remained detectable for up to eight weeks. The IgG-type antibody showed high titers from the second week of symptom onset and remained detectable during the six months of the study. When separately evaluating the chronology of IgM and IgG antibodies among RT-qPCR positive patients by age, gender, presence, or absence of neoplasia and by clinical severity of the disease, similar antibody profiles were observed between these groups, with no statistically significant difference. When performing the quantification of soluble systemic biomarkers, the chemokines, pro-inflammatory cytokines, regulatory cytokines, and growth factors evaluated showed a decrease during the six months of follow-up, except for CCL11, CXCL8, CCL3, CCL4, CCL5, IL-6, IFN-g, IL-17, IL-5, FGF-basic, PDGF, VEGF, G-CSF e GM-CSF. After analysis of neutralizing antibodies by the ECO F COVID nAb test (ECO Diagnóstica), a significant number of infected patients had neutralizing antibodies to the Wuhan reference strain and to the Alpha, Gamma and Beta variants. Also, when evaluating the rapid indirect immunochromatographic tests available in Brazil, they showed good sensitivity and specificity in the detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies after 15 days of symptoms.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, immune response.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Classificação dos coronavírus humanos (ICTV, 2022).....	22
Figura 2 Casos cumulativos confirmados de COVID-19 por milhão de pessoas, 3 de julho de 2022 (OurWorldInData.org, 2022).	266
Figura 3 Casos e mortes de COVID-19 por região relatados semanalmente pela OMS em 26 de junho de 2022 (WHO, 2022).....	26
Figura 4 Casos acumulados de COVID-19 no Brasil por data de notificação. Dados das Secretarias Estaduais de Saúde, Brasil, julho de 2022.	27
Figura 5 Óbitos acumulados de COVID-19 no Brasil por município de notificação. Dados das Secretarias Estaduais de Saúde, Brasil, julho de 2022.....	28
Figura 6 Representação da estrutura do SARS-CoV-2.....	29
Figura 7 Ciclo replicativo do SARS-CoV-2. Figura adaptada de: HARRISON et al., 2020.	31
Figura 8 Reação em cadeia da polimerase em tempo real via transcrição reversa (RT-qPCR).	43
Figura 9 Teste imunocromatográfico indireto na detecção de anticorpos IgM/IgG anti-SARS-CoV-2.. ..	45
Figura 10 Epidemiologia genômica global do SARS-CoV-2 Nos últimos seis meses. Construído por Nextstrain/ncov; Dados GISAID, junho de 2022.....	53
Figura 11 Coleta de acompanhamento/retorno dos pacientes recuperados após internação com suspeita ou diagnóstico confirmado de COVID-19 no Hospital da Baleia. Belo Horizonte, maio de 2020.	59
Figura 12 Definição do limiar de corte do método ELISA IgM anti-S SARS-CoV-2 pelo software Prism 8.0.....	71
Figura 13 Definição da acurácia diagnóstica do método ELISA IgM anti-S SARS-CoV-2 pelo software MedCalc®.	72
Figura 14 Definição do limiar de corte do método ELISA IgG anti-S SARS-CoV-2 pelo software Prism 8.0.....	74
Figura 15 Definição da acurácia diagnóstica do método ELISA IgG anti-S SARS-CoV-2 pelo software MedCalc®.	75

Figura 16 Cinética de mediadores solúveis séricos após infecção aguda por SARS-CoV-2 entre os tempos 30 (D30), 90 (D90) e 180 dias (D180) após o início de sintomas em comparação ao grupo controle de indivíduos saudáveis (HC).....	111
Figura 17 Perfil de mediadores solúveis séricos após infecção aguda por SARS-CoV-2 entre indivíduos que foram admitidos e internados no hospital até a primeira semana (COVID D30 T(0-6)) e entre 7 e 27 dias após o início dos sintomas (COVID D30 T7-27), com amostras coletadas após 30 dias após a infecção em comparação com indivíduos saudáveis.	113
Figura 18 Assinatura geral de mediadores solúveis séricos após infecção aguda por SARS-CoV-2 entre os tempos 30, 90 e 180 dias após o início de sintomas em relação a mediana global.	115

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Determinação do valor de corte - ELISA IgM anti-S de SARS-CoV-2.	70
Gráfico 2 Curva ROC ELISA IgM anti-S SARS-CoV-2.....	71
Gráfico 3 Determinação do valor de corte - ELISA IgG anti-S de SARS-CoV-2.....	73
Gráfico 4 Curva ROC ELISA IgG anti-S SARS-CoV-2.	74
Gráfico 5 IgM anti-S SARS-CoV-2 de pacientes RT-qPCR não detectável durante seis meses após o início de sintomas.	76
Gráfico 6 IgG anti-S SARS-CoV-2 de pacientes RT-qPCR não detectável durante seis meses após o início de sintomas.	77
Gráfico 7 IgM anti-S SARS-CoV-2 de pacientes RT-qPCR detectável durante seis meses após o início de sintomas.	78
Gráfico 8 IgG anti-S SARS-CoV-2 de pacientes RT-qPCR detectável durante seis meses após o início de sintomas.	79
Gráfico 9 Perfil longitudinal geral de anticorpos do tipo IgM de pacientes RT-qPCR negativos e positivos para COVID-19 após internação hospitalar acompanhados durante seis meses após o início de sintomas.	80
Gráfico 10 Perfil longitudinal geral de anticorpos do tipo IgG de pacientes RT-qPCR negativos e positivos para COVID-19 após internação hospitalar acompanhados durante seis meses após o início de sintomas.	81
Gráfico 11 Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgM de pacientes na faixa etária de 1-60 anos de idade RT-qPCR negativos e positivos para COVID-19 após internação hospitalar acompanhados durante seis meses após o início de sintomas.	82
Gráfico 12 Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgG de pacientes na faixa etária de 1-60 anos de idade RT-qPCR negativos e positivos para COVID-19 após internação hospitalar acompanhados durante seis meses após o início de sintomas.	83
Gráfico 13 Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgM de pacientes na faixa etária de 61-91 anos de idade RT-qPCR negativos e positivos para COVID-19 após internação hospitalar acompanhados durante seis meses após o início de sintomas.	84

Gráfico 14 Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgG de pacientes na faixa etária de 61-91 anos de idade RT-qPCR negativos e positivos para COVID-19 após internação hospitalar acompanhados durante seis meses após o início de sintomas.	85
Gráfico 15 Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgM de pacientes na faixa etária de 1-60 e 61-91 anos de idade RT-qPCR positivos acompanhados durante seis meses após o início de sintomas.	86
Gráfico 16 Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgG de pacientes na faixa etária de 1-60 e 61-91 anos de idade RT-qPCR positivos acompanhados durante seis meses após o início de sintomas.	87
Gráfico 17 Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgM de pacientes do sexo masculino RT-qPCR negativos e positivos para COVID-19 após internação hospitalar acompanhados durante seis meses após o início de sintomas.	88
Gráfico 18 Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgG de pacientes do sexo masculino RT-qPCR negativos e positivos para COVID-19 após internação hospitalar acompanhados durante seis meses após o início de sintomas.	89
Gráfico 19 Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgM de pacientes do sexo feminino RT-qPCR negativos e positivos para COVID-19 após internação hospitalar acompanhados durante seis meses após o início de sintomas.....	900
Gráfico 20 Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgG de pacientes do sexo feminino RT-qPCR negativos e positivos para COVID-19 após internação hospitalar acompanhados durante seis meses após o início de sintomas.....	91
Gráfico 21 Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgM de pacientes RT-qPCR positivos do sexo feminino e masculino acompanhados durante seis meses após o início de sintomas.....	92
Gráfico 22 Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgG de pacientes RT-qPCR positivos do sexo feminino e masculino acompanhados durante seis meses após o início de sintomas.....	93
Gráfico 23 Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgM de pacientes que apresentaram algum tipo de neoplasia RT-qPCR negativos e positivos para COVID-19 após internação hospitalar acompanhados durante seis meses após o início de sintomas.....	94

Gráfico 24 Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgG de pacientes que apresentaram algum tipo de neoplasia RT-qPCR negativos e positivos para COVID-19 após internação hospitalar acompanhados durante seis meses após o início de sintomas.....	95
Gráfico 25 Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgM de pacientes RT-qPCR positivos neoplásicos e não neoplásicos acompanhados durante seis meses após o início de sintomas.....	96
Gráfico 26 Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgG de pacientes RT-qPCR positivos neoplásicos e não neoplásicos acompanhados durante seis meses após o início de sintomas.....	97
Gráfico 27 Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgM de pacientes que apresentaram a forma grave da doença RT-qPCR negativos e positivos para COVID-19 após internação hospitalar em centros de tratamento intensivo acompanhados durante seis meses após o início d	98
Gráfico 28 Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgG de pacientes que apresentaram a forma grave da doença RT-qPCR negativos e positivos para COVID-19 após internação hospitalar em centros de tratamento intensivo acompanhados durante seis meses	99
Gráfico 29 Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgM de pacientes RT-qPCR positivos que apresentaram a forma moderada e grave de COVID-19 acompanhados durante seis meses após o início de sintomas.	100
Gráfico 30 Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgG de pacientes RT-qPCR positivos que apresentaram a forma moderada e grave de COVID-19 acompanhados durante seis meses após o início de sintomas.	101
Gráfico 31 Anticorpos neutralizantes (nAbs) contra SARS-CoV-2 de pacientes RT-qPCR detectável e não detectável.	103
Gráfico 32 Correlação de Spearman entre o título de anticorpos IgG anti-S de pacientes RT-qPCR positivos detectados por ELISA e anticorpos neutralizantes frente a cepa de Wuhan (referência) e variante Alpha.	1055
Gráfico 33 Correlação de Spearman entre o título de anticorpos IgG anti-S de pacientes RT-qPCR positivos detectados por ELISA e anticorpos neutralizantes frente as variantes Gamma e Beta.	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Vacinas aprovadas pela Anvisa e disponíveis no Brasil (2022)	50
Tabela 2 Classificação das variantes de SARS-CoV-2. Variantes de preocupação; VOI: Variantes de interesse; VUM: Variantes sob monitoramento. Organização Mundial da Saúde, junho de 2022.....	54
Tabela 3 Dados demográficos e características de 330 pacientes assistidos no Hospital da Baleia, Belo Horizonte, de maio de 2020 a maio de 2021 com confirmação ou suspeita de COVID-19.....	67
Tabela 4 Tabela complementar de anticorpos neutralizantes (nAbs) contra SARS-CoV-2 de pacientes RT-qPCR detectável e não detectável.....	104
Tabela 5 Avaliação do desempenho de testes rápidos IgM/IgG anti-SARS-CoV-2 disponíveis para uso no Brasil.....	108

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACE2 Enzima conversora de angiotensina 2

Anvisa Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CDC Centros de Controle e Prevenção de Doenças

cDCs Células dendríticas convencionais

COVID-19 Doença do coronavírus 2019

CoVs Coronavírus

CTD Domínios C-terminais

DCs Células dendríticas

DPOC Doença pulmonar obstrutiva crônica

ELISA Ensaio de imunoabsorção enzimática

ERGIC Compartimento intermediário retículo endoplasmático - Golgi

FDA *Food and Drug Administration*

HCoV 229E Coronavírus Humano 229E

HCoV HKU1 Coronavírus Humano HKU1

HCoV NL63 Coronavírus Humano NL63

HCoV OC43 Coronavírus humano OC43

IB Instituto Butantan

ICTV Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus

IFNs Interferons

IgA Imunoglobulina A

IgG Imunoglobulina G

IgM Imunoglobulina M

IL Interleucina

ILCs células linfoides inatas

Kb Kilobases

LOD Limite de detecção

MERS-CoV Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio

moDCs Células dendríticas derivadas de monócitos

nAbs Anticorpos neutralizantes

NETs *Neutrophils Extracellular Traps*

NK Células citotóxicas natural killer

nm Nanômetros

nsp Proteínas não estruturais

nsp_s Proteínas não estruturais individuais

NTD Domínios N-terminais

OD Densidade óptica

OMS Organização Mundial de Saúde

PBS Phosphate-buffer-saline

pDCs Células dendríticas plasmocitóides

POCT *Point of care testing*

R_0 Número básico de reprodução

RBD Domínio de ligação ao receptor

RdRp RNA polimerase dependente de RNA

RNA Ácido ribonucleico

ROC Receiver Operating Characteristic Curve

rpm Rotações por minuto

RT-qPCR Reação em cadeia da polimerase em tempo real via transcrição reversa

SARS-CoV Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave

SARS-CoV-2 Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2

SDRA Síndrome do desconforto respiratório agudo

-sgRNA RNAs subgenômicos de sentido negativo

+sgmRNA mRNAs subgenômicos de sentido positivo

+ssRNA RNA de sentido positivo de fita simples

SpO₂ Nível de saturação de oxigênio no sangue

TA Temperatura ambiente

TCLE termo de consentimento livre e esclarecido

TCT Tomografia computadorizada de tórax

TMB 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

TMPRSS2 Protease transmembrana serina 2

TNF- α Fator de necrose tumoral- α

TRI Trato respiratório inferior

TRS Trato respiratório superior

UPAs Unidades de pronto atendimento

VOCs Variantes de preocupação

VOIs variantes de interesse

VPN Valor Preditivo Negativo

VPN Valores preditivos negativos

VPP Valor Preditivo Positivo

VPP Valores preditivos positivos

VUMs Variantes sob monitoramento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Classificação dos coronavírus humanos.....	21
1.2 SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2.....	22
1.3 A COVID-19	24
1.3.1 Epidemiologia da COVID-19.....	24
1.3.2 Estrutura e ciclo replicativo do SARS-CoV-2	28
1.3.3 Dinâmica de transmissão do SARS-CoV-2.....	31
1.3.4 Apresentação clínica da COVID-19	32
1.3.5 Imunologia da COVID-19.....	34
1.3.6 Diagnóstico	41
1.3.7 Tratamento	48
1.3.8 Prevenção e controle	50
1.3.9 Variantes.....	51
2 JUSTIFICATIVA	55
3 OBJETIVOS	57
3.1 Objetivo Geral	57
3.2 Objetivos específicos	57
4 METODOLOGIA.....	58
4.1 Ética	58
4.2 Obtenção de amostras biológicas dos participantes	58
4.3 Obtenção de dados epidemiológicos e clínicos dos participantes	60
4.4 Desenvolvimento do ELISA IgM e IgG anti-S do SARS-CoV-2	60
4.4.1 ELISA para detecção de IgM anti-S do SARS-Cov-2	60
4.4.2 ELISA para detecção de IgG anti-S do SARS-Cov-2.....	61
4.5 Anticorpos neutralizantes (nAbs) contra SARS-CoV-2	61

4.6 Avaliação do desempenho de testes rápidos IgM/IgG anti-SARS-CoV-2 disponíveis para uso no Brasil	62
4.7 Avaliação da resposta celular desenvolvida	62
4.8 Análise dos dados.....	63
5 RESULTADOS	65
5.1 Dados epidemiológicos	65
5.2 ELISA para detecção de IgM anti-S do SARS-CoV-2.....	69
5.3 ELISA para detecção de IgG anti-S do SARS-CoV-2	72
5.4 Determinação do perfil longitudinal de anticorpos anti-SARS-CoV-2.....	75
5.5 Anticorpos neutralizantes (nAbs) contra SARS-CoV-2	102
5.6 Avaliação do desempenho de testes rápidos IgM/IgG anti-SARS-CoV-2 disponíveis para uso no Brasil	106
5.7 Avaliação da resposta celular desenvolvida	110
6 DISCUSSÃO	116
7 CONCLUSÃO.....	129
8 REFERÊNCIAS.....	131
ANEXOS	157

1 INTRODUÇÃO

1.1 Classificação dos coronavírus humanos

Os coronavírus (CoVs) infectam uma ampla diversidade de mamíferos e são associados a infecções respiratórias e/ou gastroentéricas. Estes vírus pertencem à família *Coronaviridae* e aparentam ter uma “coroa solar”, devido à presença de glicoproteínas espiculadas, de onde deriva o nome da família (do latim *corona* = coroa), são envelopados e possuem um genoma de RNA de sentido positivo de fita simples (+ssRNA) de aproximadamente 26-32 kilobases (kb), o que é considerado o maior genoma de RNA de ocorrência natural conhecido atualmente (CHEN et al., 2020; SU et al., 2016; OF THE INTERNATIONAL, *Coronaviridae* Study Group, 2020).

Segundo o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), duas subfamílias são reconhecidas na família *Coronaviridae*. A subfamília *Letovirinae* e *Orthocoronavirinae*, a qual possui quatro gêneros reconhecidos: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus* e *Gammacoronavirus*, sendo que os gêneros *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus*, possuem grande importância médica (ICTV, 2022).

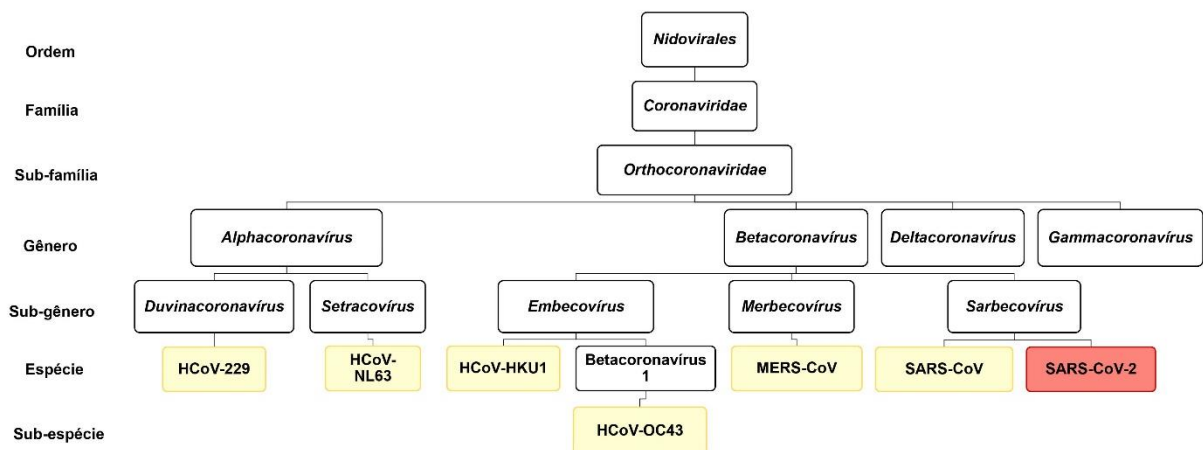
O gênero *Alphacoronavirus* possui 12 subgêneros reconhecidos e 17 espécies. Dentre as espécies, duas podem infectar humanos, o Coronavírus Humano 229E (HCoV 229E), pertencente ao subgênero *Duvinacovirus*, e o Coronavírus Humano NL63 (HCoV NL63), pertencente ao subgênero *Setracovirus* (ICTV, 2022).

O gênero *Betacoronavirus* possui cinco subgêneros reconhecidos e 12 espécies. Dentre as espécies com capacidade de infectar humanos estão o Coronavírus Humano HKU1 (HCoV HKU1), pertencente ao subgênero *Embecovirus*; o Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV), descrito em 2002 (subgênero *Sarbecovirus*); e o Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), descrito em 2012 (subgênero *Merbecovirus*). Outro coronavírus também capaz de infectar humanos deste mesmo gênero, é o Coronavírus humano OC43 (HCoV OC43), o qual é subespécie da espécie *Betacoronavirus 1* (ICTV, 2022).

O novo coronavírus, provisoriamente chamado de 2019-nCoV e posteriormente denominado como SARS-CoV-2 (Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2), é classificado no subgênero *Sarbecovirus* e é o agente etiológico da COVID-19 (OF THE INTERNATIONAL, Coronaviridae Study Group, 2020; ICTV, 2022).

Resumidamente, sete coronavírus possuem a capacidade de infectar humanos: HCoV 229E, HCoV NL63, HCoV HKU1, HCoV OC43, SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2 (Figura 1). Destes, o HCoV 229E, HCoV NL63, HCoV HKU1 e HCoV OC43 são endêmicos e causam sinais clínicos leves de doença respiratória, comumente referidos como um “resfriado”. Contudo, três coronavírus atravessaram a barreira de espécies e infectaram humanos, sendo associados à quadros de pneumonia, com alta taxa de mortalidade e transmissibilidade (CHEN et al., 2020).

Figura 1: Classificação dos coronavírus humanos



Fonte: ICTV, 2022.

1.2 SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2

Em 2002 foram relatados casos de pneumonia atípica na província de Guangdong, na China. O agente etiológico foi identificado meses mais tarde e denominado de

coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV). A doença se espalhou para mais de duas dúzias de países na América do Norte, América do Sul, Europa e Ásia antes que o surto global de SARS de 2003 fosse contido (GENSINI et al., 2004; HUI et al., 2019).

Em 2012, na Península Arábica, novos casos de pneumonia foram relatados, e o agente identificado foi nomeado como coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV). Foram detectados casos de MERS em 27 países, porém, diferente da SARS, a maioria dos casos foi restrito à Península Arábica com surtos localizados. Tanto na SARS quanto na MERS, um grande número de casos foi atribuído à infecção hospitalar, principalmente de profissionais da área da saúde (AZHAR et al., 2019).

Em novembro de 2019, em Wuhan, na província de Hubei, China, surgiu um novo coronavírus que rapidamente se espalhou para diversos países. Poucos meses após a sua identificação e devido a sua relação taxonômica com o SARS-CoV, passou a ser denominado como SARS-CoV-2, causador da doença de coronavírus 2019 (COVID-19), que em 11 de março de 2020, foi declarada como pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (ZHU et al., 2020; WHO, 2022).

Estudos epidemiológicos e moleculares demonstraram que o SARS-CoV e o MERS-CoV tiveram origem em um animal silvestre e adaptaram-se à espécie humana. Os hospedeiros naturais foram determinados como sendo morcegos insetívoros, e os vírus foram transmitidos a humanos por hospedeiros intermediários. Na SARS, a civeta foi considerada um hospedeiro intermediário, e na MERS, o dromedário. Para o SARS-CoV-2 acredita-se que o hospedeiro definitivo também seja um morcego, e que o hospedeiro intermediário seja um pangolim (HUI et al., 2019; AZHAR et al., 2019; ANDERSEN, et al., 2020).

1.3 A COVID-19

1.3.1 Epidemiologia da COVID-19

A atual pandemia de COVID-19, a qual possui como agente etiológico o coronavírus 2 relacionado à síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2), representa uma crise aguda de saúde e economia global, com consequências alarmantes na mortalidade e morbidade humana (RANDO et al., 2021).

No início de fevereiro de 2020, estava cada vez mais claro o início da pandemia causada pelo coronavírus SARS-CoV-2. O grande e rápido aumento do número de casos de COVID-19 antes das medidas de isolamento entrarem em vigor em Wuhan, China, em janeiro de 2020, mostrou a eficiência da transmissão do vírus entre humanos. Ainda, o número crescente de infecções fora da China indicou que a contenção regional do SARS-CoV-2 seria improvável. Com isso, epidemiologistas e infectologistas do mundo todo avaliaram seu potencial de contenção e projetaram a disseminação do vírus em várias escalas geográficas (KOELLE et al., 2022).

As primeiras análises epidemiológicas realizadas de COVID-19 se concentraram em estimar a taxa de propagação viral a partir de dados de casos relatados em Wuhan, China, além de dados de surtos anteriores dos outros coronavírus, como o SARS-CoV e MERS-CoV. Isso levou a estimativa do número básico de reprodução (R_0) do SARS-CoV-2, variando entre 2 e 4, antes da implementação das medidas de bloqueio em Wuhan, sendo que $R_0 > 1$, indica uma contenção mais difícil em relação a transmissão de doenças infecciosas (KOELLE et al., 2022).

Apesar disso, o SARS-CoV-2 se espalhou para muitas regiões da China e em todo o mundo, sendo que em 11 de março de 2020, a COVID-19 foi declarada como pandemia pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2022).

Embora houvesse alguns países que alcançaram o controle quase completo da disseminação inicial do vírus por meio de rigorosos esforços de vigilância como a Nova Zelândia e Vietnã, a transmissão comunitária avançou rapidamente em muitos outros países (BAKER et al., 2020; VAN TAN et al., 2021).

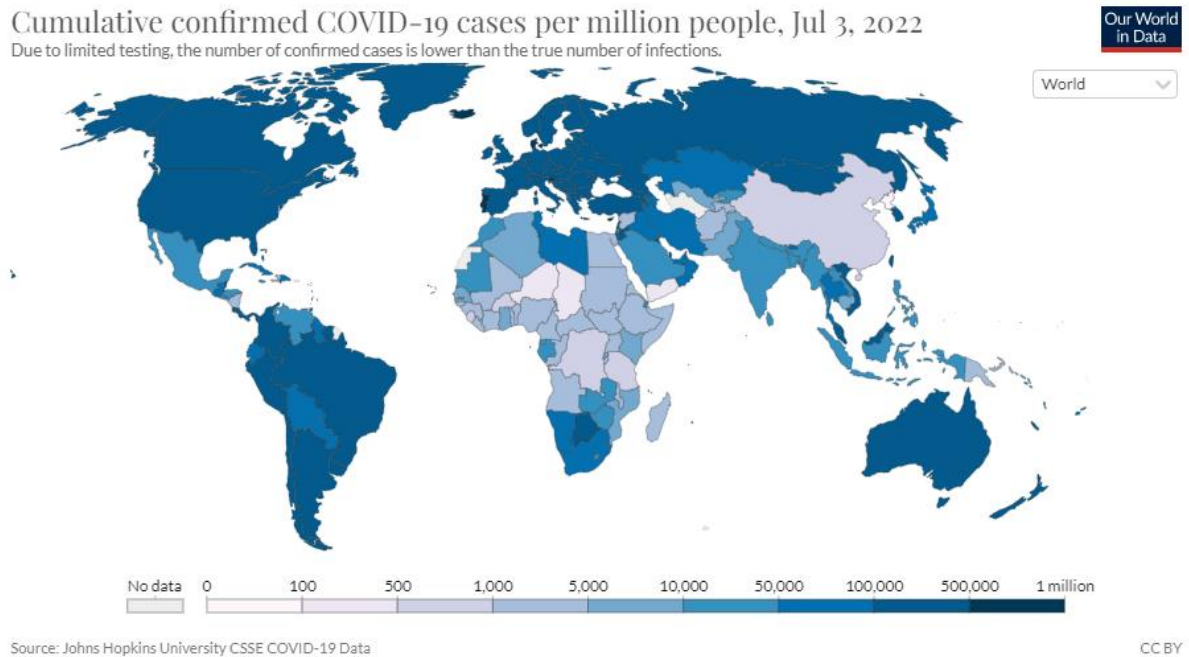
Modelos matemáticos alarmantes previam a devastação que resultaria se não fossem implementadas medidas de controle, os quais levaram a restrições impostas pelos governos de vários países a fim de conter a propagação viral (WU et al., 2020; WALKER et al., 2020; ADAM et al., 2020).

As intervenções não farmacêuticas, como as medidas de distanciamento social e o uso de máscaras faciais durante a primeira onda da pandemia, serviram para achatam a curva de transmissão da doença, ou seja, estender o período de ocorrência dos casos. Achatar a curva de casos era desejável por três razões: Primeiro, evitaria que o sistema de saúde ficasse sobrecarregado devido a possibilidade de o número máximo de leitos ocupados ser menor do que internações necessárias; Em segundo: retardaria o impulso do surto, e em terceiro, permitiu um maior tempo para o desenvolvimento de medidas estratégicas, melhorar a capacidade de atendimentos clínicos, além de avaliar e projetar medidas preventivas e terapêuticas (COBEY et al., 2020; KOELLE et al., 2022).

Mesmo com intervenções não farmacêuticas em vigor, grandes surtos ocorreram em todo o mundo, principalmente em locais de alto risco, devido principalmente à falta de saneamento e cuidados de saúde inadequados. Diferenças acentuadas nas taxas de casos também se tornaram claramente visíveis entre os grupos socioeconômicos e étnicos (FRANCO-PAREDES et al., 2020; BHALA et al., 2020).

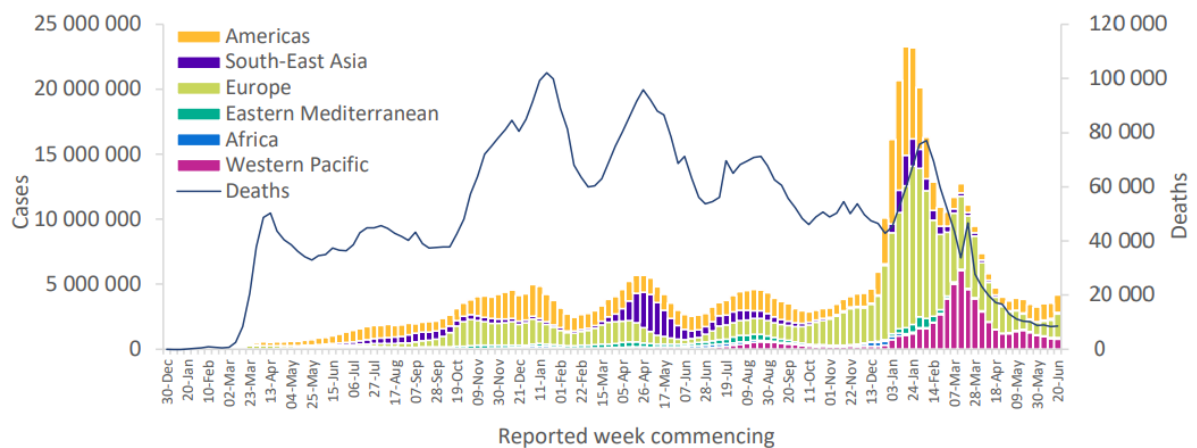
De acordo com o relatório operacional semanal sobre COVID-19 publicado em 29 de junho de 2022 pela OMS, mais de 541 milhões de casos confirmados e mais de 6,3 milhões de mortes foram relatados globalmente (Figura 2 e 3).

Figura 2: Casos cumulativos confirmados de COVID-19 por milhão de pessoas, 3 de julho de 2022.



Fonte: OurWorldInData.org, 2022.

Figura 3: Casos e mortes de COVID-19 por região relatados semanalmente pela OMS em 26 de junho de 2022

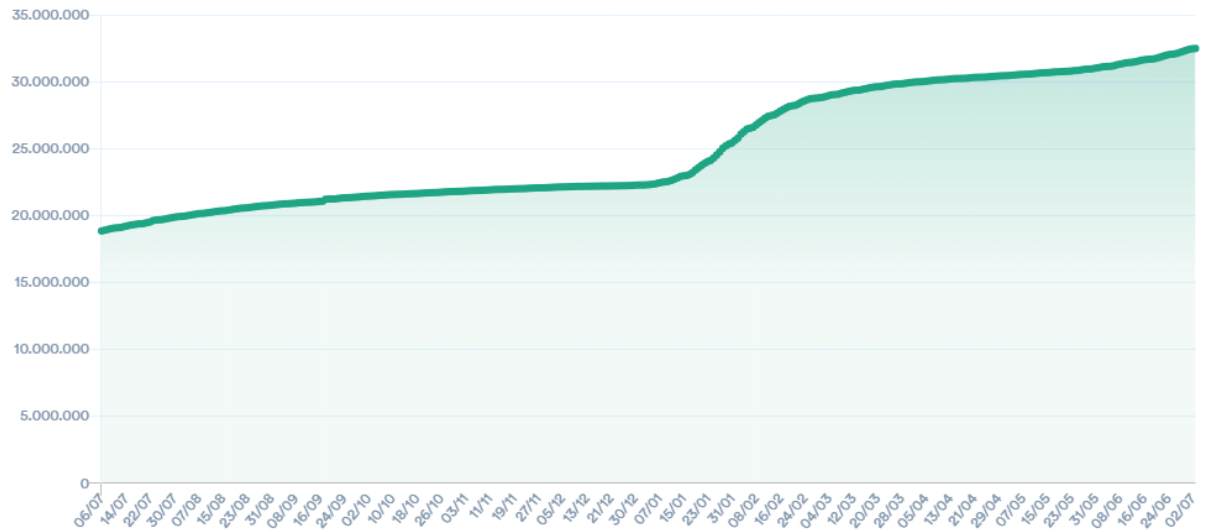


Fonte: WHO, 2022.

No Brasil, de acordo com a recém atualização do painel de casos de COVID-19 disponibilizado pelo Ministério da Saúde em julho de 2022, atualmente há

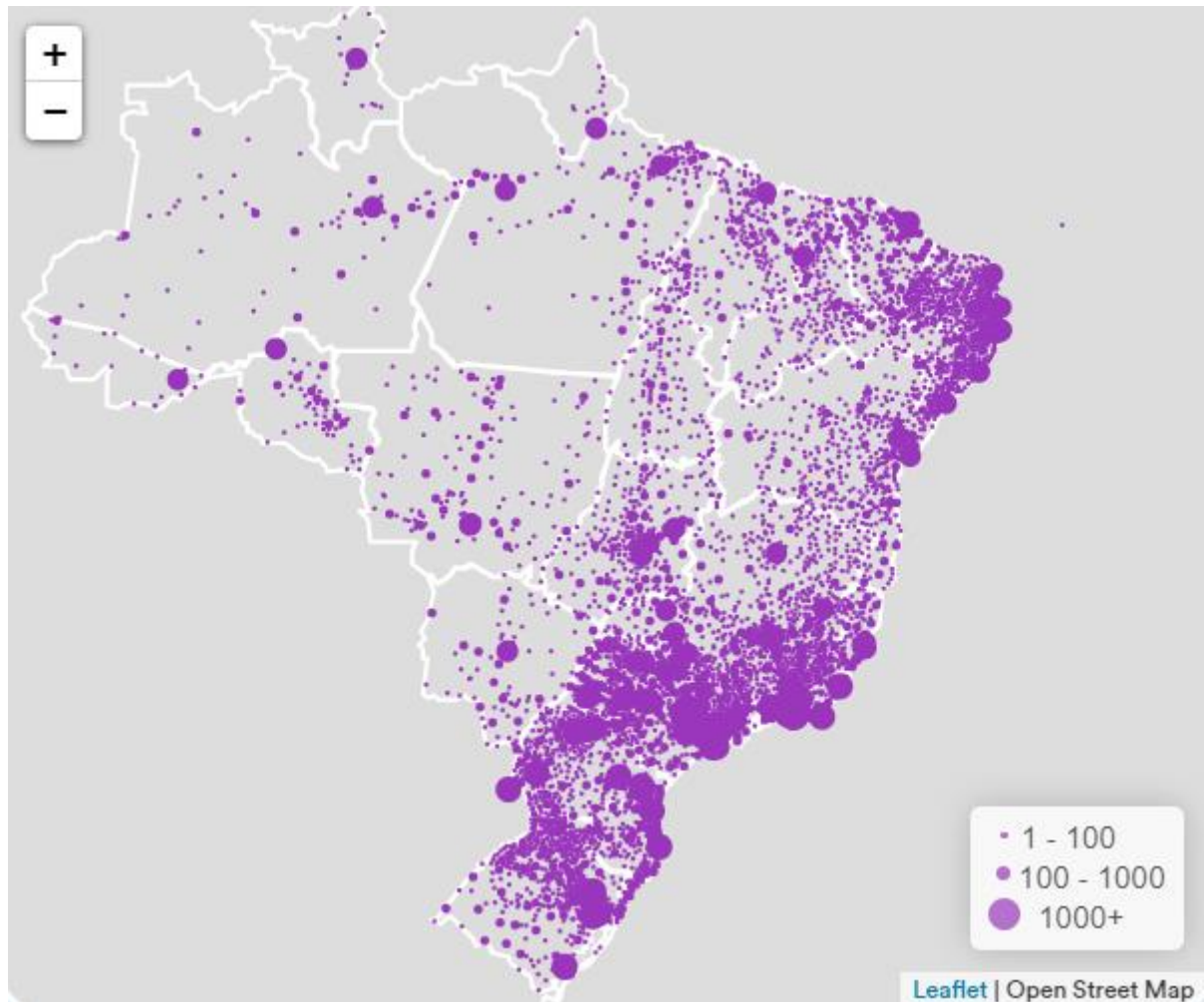
32.490.422 casos relatados (Figura 4) com um total de 671.911 mortes pela doença no país (Figura 5) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Figura 4: Casos acumulados de COVID-19 no Brasil por data de notificação.



Fonte: Dados das Secretarias Estaduais de Saúde, Brasil, julho de 2022.

Figura 5: Óbitos acumulados de COVID-19 no Brasil por município de notificação.



Fonte: Dados das Secretarias Estaduais de Saúde, Brasil, julho de 2022.

1.3.2 Estrutura e ciclo replicativo do SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA de sentido positivo de fita simples (+ssRNA) e possui um genoma com cerca de 29,9kb. A estrutura genômica dos coronavírus humanos é conservada e possui três regiões principais: uma contendo o gene da replicase, outra que inclui genes que codificam proteínas estruturais e uma região que contém genes acessórios intercalados (LU et al., 2020; RANDO et al., 2021).

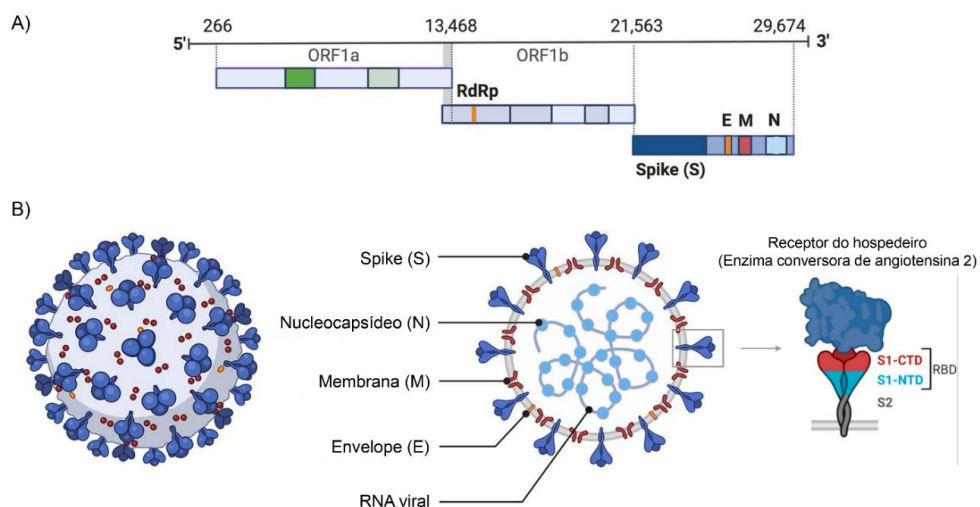
O gene da replicase compreende cerca de dois terços do genoma e consiste em dois quadros de leitura abertos, ORFs 1a e 1b, que são traduzidos com deslocamento de quadro ribossômico e codificam 16 proteínas não estruturais (nsp)

que incluem enzimas como a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (FEHR 2015).

O terço restante do genoma codifica proteínas estruturais, incluindo as proteínas spike (S), membrana (M), envelope (E) e nucleocapsídeo (N), representadas na figura 6 (LU et al., 2020; RANDO et al., 2021).

Figura 6 Representação da estrutura do SARS-CoV-2. A) O genoma do SARS-CoV-2 possui cerca de 29,9kb. Pelo menos dois terços do genoma viral estão contidos em ORF1a e ORF1b, que codificam 16 proteínas não estruturais que estão envolvidas na transcrição e replicação do genoma do vírus, como a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). As ORFs restantes codificam as proteínas estruturais spike (S), envelope (E), membrana (M) e a proteína do nucleocapsídeo (N), além de várias proteínas acessórias. B) Características estruturais do SARS-CoV-2. A proteína spike (S), a proteína da membrana (M) e a proteína do envelope (E) são incorporadas no envelope viral. O genoma de RNA de sentido positivo de fita simples (+ssRNA) é complexado com a proteína do nucleocapsídeo (N). A proteína S é ampliada para representar suas subunidades principais (S1 e S2) e domínios N-terminais (NTD) e domínios C-terminais (CTD) na subunidade S1 que abrange o domínio de ligação ao receptor (RBD). A proteína S tem como receptor celular a enzima conversora de angiotensina 2, através do RBD na subunidade S1.

Figura 6: Representação estrutura SARS COV-2



Fonte: RANDO et al., 2021 e JAIN et al., 2020.

A proteína spike presente no envelope viral do SARS-CoV-2 em sua porção mais externa possui um domínio de ligação ao receptor (RBD) que medeia o contato direto com a célula hospedeira, a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), e um sítio de clivagem polibásico S1/S2 que é clivado proteoliticamente pela catepsina L celular e pela protease transmembrana serina 2 (TMPRSS2) (ZHOU et al., 2020; PERLMAN et al., 2009; WU et al., 2020; HOFFMANN et al., 2020).

A TMPRSS2 facilita a entrada do vírus na membrana plasmática das células, enquanto a catepsina L ativa a proteína spike em endossomos podendo assim compensar a entrada do SARS-CoV-2 em células que não possuem TMPRSS2 (HOFFMANN et al., 2020).

Uma vez que o genoma é liberado no citosol da célula hospedeira, ORF1a e ORF1b são traduzidos. As poliproteínas pp1a e pp1ab resultantes são co-traducionalmente e pós-traducionalmente processadas nas proteínas não estruturais individuais (nsps) (V'KOVSKI et al., 2021).

As proteínas não-estruturais formam o complexo replicase-transcriptase ativo, compreendendo a RNA polimerase RNA-dependente (RdRp). A RdRp associa-se à extremidade 3'UTR e inicia a transcrição de RNAs de sentido negativo. Durante a replicação, cópias de RNA de comprimento total do genoma e sentido negativo são produzidas a partir de genomas de RNA de comprimento total e sentido positivo.

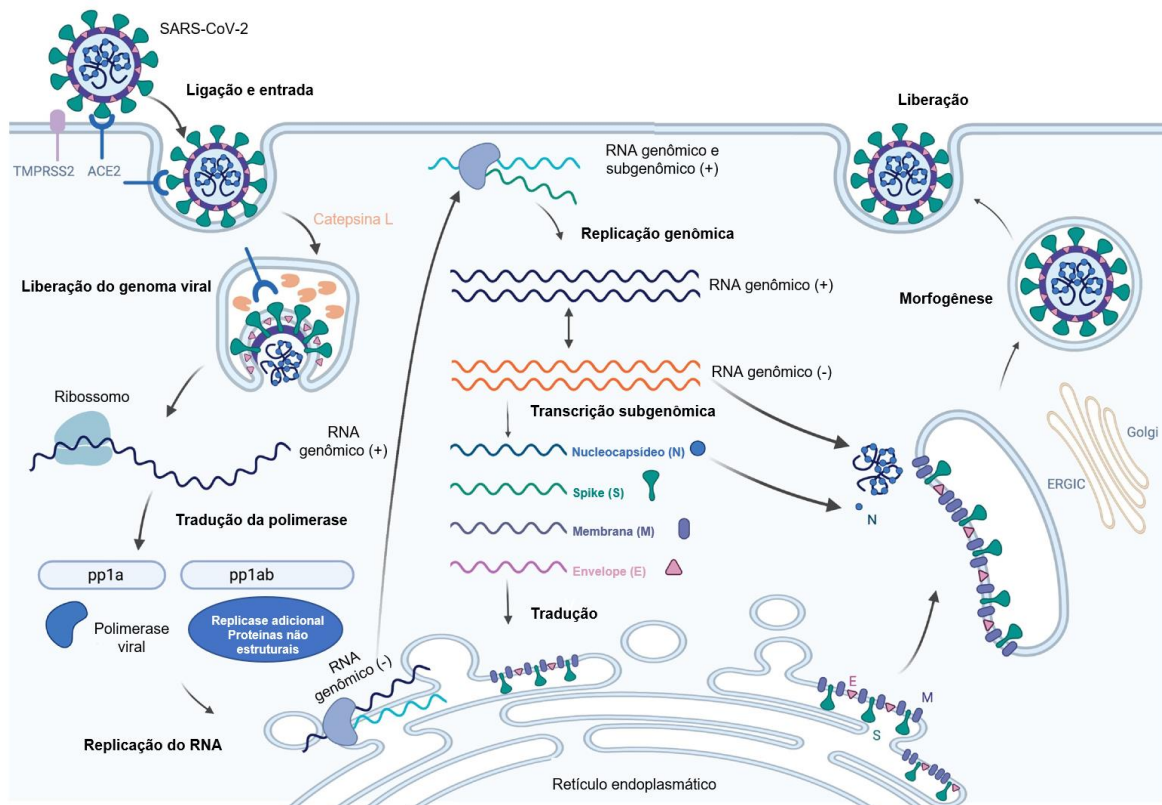
Durante a transcrição, um subconjunto de sete a nove RNAs subgenômicos, os quais codificam as proteínas estruturais, são produzidos através da transcrição descontínua. Nesse processo, os RNAs subgenômicos de sentido negativo são sintetizados combinando comprimentos variados da extremidade 3' do genoma com a sequência líder 5' necessária para a tradução (copy-choice).

Os RNAs subgenômicos de sentido negativo (-sgRNA) são então transcritos em mRNAs subgenômicos de sentido positivo (+sgmRNA). Os +sgmRNA são traduzidos nos ribossomos associados à membrana do retículo endoplasmático rugoso ou livres no citoplasma. Após a tradução, as proteínas são processadas de acordo com a sua finalidade, podendo ser glicosiladas, fosforiladas e/ou clivadas.

A morfogênese ocorre pela associação de múltiplas cópias da proteína N com o genoma viral e a formação de um nucleocapsídeo helicoidal. As proteínas S, M e E

sintetizadas são coletadas no retículo endoplasmático e transportadas para o compartimento intermediário retículo endoplasmático - Golgi (ERGIC), onde interagem com o nucleocapsídeo e se agrupam em partículas virais, as quais são transportadas em vesículas até a membrana plasmática e liberadas por exocitose, como representado na figura 7. (DE WIT et al., 2016; SNIJDER et al., 2006; WU et al., 2010; HARRISON et al., 2020).

Figura 7: Ciclo replicativo do SARS-CoV-2.



Fonte: HARRISON et al., 2020.

1.3.3 Dinâmica de transmissão do SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 é transmitido através de fômites e gotículas durante o contato próximo e desprotegido entre os infectados e os não infectados. Relatos iniciais de pacientes com tosse, tomografia computadorizada de tórax (TCT) apresentando opacidade em vidro fosco e progressão dos sintomas para pneumonia grave,

sugeriram a transmissibilidade do SARS-CoV-2 pela via respiratória (ZHOU et al., 2020; PEIRIS et al., 2003; HUANG et al., 2020).

A transmissão direta por gotículas respiratórias é reforçada pela replicação do vírus tanto no trato respiratório superior (TRS) quanto no trato respiratório inferior (TRI), além do grande número de relatos indicando disseminação entre humanos a partir de contatos próximos que apresentavam algum tipo de sintoma, principalmente tosse ativa (KUJAWSKI et al., 2020; WANG et al., 2020; LI et al., 2020; CHAN et al., 2020).

A disseminação viral pode começar de 5 a 6 dias antes do aparecimento dos primeiros sintomas e pode permanecer até 37 dias nos sobreviventes, porém, pode perdurar por mais dias em imunocomprometidos com diabetes mellitus ou tumores malignos, devido à fraca resposta imune destes indivíduos (HE et al., 2020; ZHOU et al., 2020; AVANZATO et al., 2020; BUETTI al., 2020; YE et al., 2020).

Ainda, há evidências de disseminação do SARS-CoV-2 entre indivíduos não sintomáticos e pré-sintomáticos, o que contrasta com a dinâmica de transmissão do SARS-CoV (ARONS et al., 2020).

1.3.4 Apresentação clínica da COVID-19

Em geral, os CoVs endêmicos de resfriado comum, tendem a causar sintomas leves de TRS e envolvimento gastrointestinal ocasional. Por outro lado, a infecção por CoVs altamente patogênicos, incluindo o SARS-CoV-2, causa sintomas mais graves semelhantes à gripe, mas que podem progredir para um desconforto respiratório agudo (SDRA), pneumonia, insuficiência renal e morte (WANG et al., 2020; CHAN et al., 2020; KSIAZEK et al., 2003; GUERY et al., 2013).

Os sintomas de COVID-19 mais comuns são febre, tosse e dispneia na grande maioria dos pacientes em estudos epidemiológicos (CHEN et al., 2020).

O resultado da infecção pelo SARS-CoV-2 varia amplamente, onde a maioria de crianças e jovens adultos apresentam sintomas mais leves da doença, e a população idosa, possui um maior risco do desenvolvimento da COVID-19 grave (CHAO et al., 2020; BRODIN, 2020).

Apesar do risco no desenvolvimento de sintomas mais severos ser maior com o aumento da idade, uma parcela de indivíduos jovens pode apresentar baixa saturação de oxigênio e respostas inflamatórias maciças no pulmão evoluindo para o estágio grave da doença, podendo progredir para uma inflamação sistêmica com risco de vida e disfunção de múltiplos órgãos (CHAO et al., 2020).

Além disso, o gênero também influencia no percurso da infecção, pois os homens em sua maioria estão entre os pacientes com doença grave, presumivelmente devido a diferenças nas respostas imunes entre homens e mulheres (TAKAHASHI et al., 2020).

Pacientes com comorbidades como hipertensão, diabetes, obesidade, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), doenças cardiovasculares, entre outras, também estão associados a um maior risco no desenvolvimento da COVID-19 grave (HUANG et al., 2020).

Os mecanismos fisiopatológicos dominantes na COVID-19 aguda incluem toxicidade viral direta, dano endotelial e lesão microvascular, desregulação do sistema imunológico e estimulação de um estado hiperinflamatório, hipercoagulabilidade com trombose in situ e macrotrombose resultante e alterações na via da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) (GUPTA et al., 2020).

Com o decorrer da pandemia, ficou mais claro que a COVID-19 abrange não apenas doenças respiratórias/gastrointestinais, mas também pode ocasionar problemas a longo prazo, como por exemplo inflamação do miocárdio (PUNTMANN et al., 2020).

Novas evidências científicas e clínicas estão sendo avaliadas sobre os efeitos subagudos e a longo prazo pós infecção pelo SARS-CoV-2, os quais podem afetar vários sistemas na apresentação de sequelas (GUPTA et al., 2020).

Relatos iniciais sugerem efeitos residuais da infecção, como fadiga, dispneia, dor torácica, distúrbios neurológicos, artralgia e declínio na qualidade de vida (CARFÌ et al., 2020; TENFORDE et al., 2020; HUANG et al., 2021).

Períodos de internação intensiva, danos celulares, resposta imune inata intensa com produção exacerbada de citocinas inflamatórias e um estado pró-coagulante induzido durante a infecção pelo vírus, podem contribuir para essas sequelas observadas (MCELVANEY et al., 2020; SUNGNAK et al., 2020; TANG et al., 2020).

Indivíduos sobreviventes de infecções anteriores por outros coronavírus humanos, incluindo o SARS-CoV, durante a epidemia de 2003 e durante o surto da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS), em 2012, demonstraram sintomas persistentes semelhantes, reforçando a preocupação com sequelas clinicamente significativas da COVID-19 (HUI et al., 2005; AHMED et al., 2020).

1.3.5 Imunologia da COVID-19

1.3.5.1 Sistema imune inato

O sistema imune inato possui a capacidade de detectar infecções virais usando diferentes receptores de reconhecimento para detectar padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (TAY et al., 2020; LI et al., 2020).

Infecções por SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2 produzem respostas inflamatórias localizadas, incluindo o aumento da secreção de citocinas, como IFN- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, IL-33, TNF- α , TGF β , etc., e quimiocinas, como CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10, etc. (CONG et al., 2018; TAY et al., 2020; LI et al., 2020).

Os coronavírus SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2 possuem a capacidade de inibir e retardar a indução do IFN tipo I pelas células infectadas, levando a respostas de IFN do tipo I atrasadas ou suprimidas em geral, contribuindo para a imunopatologia associada a tais infecções (SPIEGEL et al., 2005; MIORIN et al., 2020; ARUNACHALAM et al., 2020).

Essa capacidade de inibição permite que o vírus se replique e induza mais danos nos tecidos e desencadeie uma resposta imune excessiva ao passo que o sistema imunológico luta para frear a replicação viral. A imunopatologia continua à medida que as células inflamatórias fluem para o pulmão e produzem grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias, agravando ainda mais o quadro da doença. A resposta imune exacerbada e desequilibrada, causada em parte pelas respostas precoces do IFN do tipo I prejudicadas, são os fatores mais prováveis para o

desenvolvimento da COVID-19 grave (BLANCO-MELO et al., 2020; LUCAS et al., 2020; VABRET et al., 2020).

Novas evidências de um forte envolvimento do sistema imune inato na COVID-19 estão sendo elucidadas com o decorrer do tempo. Altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias em pacientes infectados levaram à hipótese de que uma “tempestade de citocinas” são um dos principais fatores no desenvolvimento da forma grave da doença (VABRET et al., 2020; TAY et al., 2020; MEHTA et al., 2020).

A tempestade de citocinas ou também chamada de inflamação patogênica, compartilha semelhanças com o que já foi observado em pacientes infectados pelos outros coronavírus, incluindo o SARS-CoV e MERS-CoV, e tem semelhanças com a síndrome de liberação de citocinas (MOORE et al., 2020).

O sistema fagocitário mononuclear desempenha um papel importante na resposta imune anti-SARS-CoV-2 e é um dos principais contribuintes para a síndrome hiperinflamatória (ZHOU et al., 2020; KVEDARAITE et al., 2021). No sangue periférico, este sistema é composto por células dendríticas (DCs) e monócitos, que são eficientes células apresentadoras de antígenos, e são responsáveis pela produção de citocinas e na regulação das respostas imunes (GUILLIAMS et al., 2014; RESCIGNO et al., 2015).

Embora o papel preciso das citocinas na fisiopatologia na COVID-19 ser ainda bastante debatido, suas concentrações circulantes têm sido associadas a piores desfechos clínicos (HUANG et al., 2020; WANG et al., 2020; SINHA et al., 2020).

Além disso, a relação neutrófilo-linfócito elevada tem sido associada à gravidade, e a infiltração de neutrófilos tem sido descrita nos pulmões e no lavado broncoalveolar de indivíduos infectados (QIN et al., 2020; ZHOU et al., 2020; NATHAN et al., 2020).

As respostas imunes da mucosa frente a agentes infecciosos são reguladas por células mieloides com funções especializadas, que incluem células dendríticas convencionais (cDCs), DCs derivadas de monócitos (moDCs), DCs plasmocitóides (pDCs) e macrófagos. Estudos recentes apontam evidências de que as respostas mieloides desreguladas podem impulsionar as síndromes marcantes da COVID-19, como a síndrome do desconforto respiratório agudo, síndrome de liberação de citocinas e a linfopenia (MEHTA et al., 2020).

O aumento da interleucina IL-6 também pode estar associado a níveis mais altos de IL-2, IL-7, IFN- γ e GM-CSF, como visto na linfocitose hemofagocítica secundária. Em resposta a infecções virais, os fagócitos mononucleares impulsionam a produção de interleucinas e IFN-I e IFN-III, resultando na ativação do inflamassoma, indução de respostas patogênicas de células Th1 e Th17, recrutamento de células imunes efetoras e a síndrome de liberação de citocinas (TANAKA et al., 2016; PROKUNINA-OLSSON et al., 2020).

As células linfoides inatas (ILCs) são células efetoras da imunidade inata que não possuem a expressão de receptores de antígenos rearranjados. A família ILC é dividida em dois grupos principais, os quais incluem as ILCs auxiliares não citotóxicas, ILC1, ILC2 e ILC3 e as células citotóxicas natural killer (NK) (VIVIER et al., 2018).

As funções de ILC1, ILC2 ou ILC3 na infecção por SARS-CoV-2 permanecem pouco compreendidas, pois estes três subconjuntos estão presentes no pulmão de indivíduos saudáveis (YUDANIN et al., 2019; VABRET et al., 2020). ILC2s por exemplo, são essenciais para uma melhora da função pulmonar após a infecção por influenza em modelo murino através da restauração mediada por anfirregulina do epitélio das vias aéreas e saturação de oxigênio (MONTICELLI et al., 2011). No entanto, ILC2s também podem produzir IL-13, o qual está associada ao recrutamento de macrófagos para o pulmão e hiperreatividade das vias aéreas induzida por influenza (CHANG et al., 2011).

De fato, as ILCs estão envolvidas na polarização dos macrófagos alveolares e devido as concentrações aumentadas de IL-13 e a desregulação de macrófagos observada em pacientes com COVID-19, o papel desempenhado pelas ILCs durante a infecção pelo SARS-CoV-2 deve ser melhor estudada (HUANG et al., 2020).

As células NK convencionais incluem células que são especializadas na produção de citocinas ou na citotoxicidade. Vários estudos realizados demonstraram números reduzidos de células NK no sangue periférico de pacientes com COVID-19, o que está associado à gravidade desta doença (ZHENG et al., 2020; VABRET et al., 2020).

Complexos de DNA e proteínas citoplasmáticas secretados por neutrófilos ativado denominados *Neutrophils Extracellular Traps* (NETs) foram detectados em soros de pacientes e podem estar relacionados a lesão pulmonar e a trombose associada à COVID-19 grave (ZUO et al., 2020; MIDDLETON et al., 2020; NARASARAJU et al., 2020).

Diante o exposto, a imunidade inata está envolvida em respostas antivirais, pois além de sua contribuição para a hiperinflamação, uma disfunção ou atraso da imunidade inata também pode contribuir para uma perda do controle da replicação viral, como já demonstrado em estudos onde a resposta do interferon tipo I prejudicada em pacientes com COVID-19, foram associados à uma carga viral persistente (BASTARD et al., 2020; ZHANG et al., 2020).

Além disso, também pode-se citar a alta incidência, cerca de 50%, de infecções bacterianas e fúngicas graves em pacientes não sobreviventes de COVID-19, sugerindo uma imunossupressão destes indivíduos. Essas infecções recorrentes observadas, em particular a aspergilose invasiva, são remanescentes de deficiências imunes inatas primárias, como a doença granulomatosa crônica (VAN ARKEL et al., 2020).

Com isso, esses achados sobre a resposta imune sugerem fortes papéis das células inatas nas respostas hiperinflamatórias na patogênese da COVID-19, como também sua associação na imunodeficiência tardia observada em alguns pacientes. Conforme descrito por vários autores, há uma necessidade urgente de maiores estudos acerca da resposta imune inata frente a infecção pelo SARS-CoV-2 para poder tanto aumentar sua eficácia quanto prevenir seus efeitos deletérios (BIRRA et al., 2020).

Além disso, também há evidências de que o COVID-19 é marcada pela desregulação das células mieloides (SCHULTE-SCHREPPING et al., 2020). Ainda, pacientes críticos apresentam altas concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas IL-6, IL-1 β , IL-2, IL-8, IL-17 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (LEISMAN et al., 2020).

O TNF- α é importante em quase todas as reações inflamatórias agudas, atuando como amplificador da inflamação, sendo que o bloqueio de TNF- α tem sido

amplamente utilizado no tratamento de diversas doenças inflamatórias autoimunes (FELDMANN et al., 2020).

A IL-1 também é uma citocina pró-inflamatória altamente ativa, e a monoterapia que bloqueia a atividade da IL-1 é utilizada no tratamento de doenças inflamatórias, incluindo artrite reumatóide e síndromes autoinflamatórias hereditárias, como síndromes associadas à criopirina (DINARELLO et al., 2012).

A IL-8 é uma potente citocina pró-inflamatória que desempenha um papel crucial no recrutamento e ativação de neutrófilos durante a inflamação e, dada a frequente neutrofilia observada em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, é possível que a IL-8 contribua fortemente na fisiopatologia da COVID -19 (DEL VALLE et al., 2020).

A IL-6 também está associada a uma resposta pró-inflamatória sistêmica, uma vez que devido ao seu envolvimento em vários mecanismos frente a uma infecção, como a proliferação de células B e T, hematopoiese e quimiotaxia de neutrófilos (WALTER et al., 2022).

Com isso, a avaliação precoce de citocinas são preditores importantes durante o percurso da doença e podem ser utilizados para tomadas de decisões durante o tratamento. O valor preditivo dessas citocinas pode ajudar no planejamento de intervenções terapêuticas para determinar quais indivíduos são mais propensos no desenvolvimento de uma insuficiência respiratória, lesão de órgãos-alvo e óbito. Portanto, um modelo de previsão baseado nos níveis de citocinas durante a fase aguda da doença, pode auxiliar no tratamento de indivíduos infectados pelo SARS-CoV-2 na avaliação de indivíduos que podem desenvolver um estágio mais crítico da COVID-19 (DEL VALLE et al., 2020).

1.3.5.2 Sistema imune adaptativo

As respostas imunes adaptativas induzidas pela infecção por SARS-CoV-2 seguem padrões esperados com base no que é conhecido de outras infecções virais e outros coronavírus humanos, com mais de 90% dos indivíduos infectados apresentando soroconversão em algumas semanas pós infecção e surgimento dos primeiros sintomas (GUDBJARTSSON et al., 2020; WAJNBERG et al., 2020).

Estudos sobre o perfil de anticorpos durante a COVID-19, mostraram que o tempo médio de soroconversão para IgM foi de 10 a 12 dias pós início de sintomas (WU et al., 2021; BETTENCOURT et al., 2020; GRZELAK et al., 2020) e o título de anticorpos aumentou em duas a três semanas, porém diminuiu significativamente após cinco semanas (HOU et al., 2020; LIU et al., 2020).

Outras pesquisas que avaliaram a cronologia de anticorpos anti-SARS-CoV-2 do tipo IgA, mostraram que a produção deste anticorpo demonstrou ser semelhante ao IgM, obtendo uma soroconversão de cerca de 11 dias pós início de sintomas atingindo um pico em 3 semanas, mantendo-se títulos altos até cerca de 6 semanas (MA et al., 2020; JÄÄSKELÄINEN et al., 2020; PADOAN et al., 2020).

Ainda, outras pesquisas relatam que os níveis de anticorpos do tipo IgA e IgG podem apresentar um alto título em pacientes com COVID-19 grave em relação aos pacientes com sintomas mais leves, sugerindo que o IgA pode ter efeitos sinérgicos com o IgG na promoção de citotoxicidade celular dependente de anticorpos e exacerbação da COVID-19 (YU et al., 2020).

Em outros estudos, anticorpos específicos do tipo IgG anti-SARS-CoV-2 apresentaram um tempo médio de soroconversão de 12 a 14 dias pós início de sintomas (WU et al., 2021; HOU et al., 2020; LIU et al., 2020) obtendo níveis altos em cerca de 28 dias, sendo esse alto nível mantido em até oito semanas (LIU et al., 2020; ZHAO et al., 2020; XIANG et al., 2020).

Os anticorpos neutralizantes gerados durante a infecção são direcionados principalmente às proteínas de superfície dos coronavírus, sendo que a maioria dos epítomos indutores de anticorpos neutralizantes estão localizados na porção N-terminal da proteína spike (RBD) (WAJNBERG et al., 2020).

As respostas das células T à proteína spike de SARS-CoV-2 correlacionam-se com as respostas das células B à mesma proteína e são detectáveis na maioria dos pacientes convalescentes. A reatividade das células T ao SARS-CoV-2 também pode ser detectada em indivíduos não expostos, supostamente devido à imunidade reativa cruzada pelo contato com outros coronavírus humanos, como os pacientes sobreviventes a epidemia da SARS, em 2003 (GRIFONI et al., 2020; SU et al., 2013; LE BERT et al., 2020).

No sistema imune adquirido, as células T desempenham um papel fundamental nas infecções virais de um modo geral, onde células T CD4 fornecem ajuda às células B na produção de anticorpos e determinam a resposta de outras células imunes, enquanto as células T CD8 matam as células infectadas para reduzir a carga viral e conseqüentemente controlar a infecção. No entanto, respostas de células T desreguladas podem resultar em uma imunopatologia (VABRET et al., 2020).

Assim como relatado em estudos anteriores sobre a resposta imune adquirida durante a infecção pelo SARS-CoV (HE et al., 2005), várias pesquisas recentes enfatizam a ocorrência de linfopenia com números drasticamente reduzidos de células T CD4 e CD8 em casos moderados e graves de COVID-19, sendo que esta linfopenia é mais marcante para as células TCD8 em pacientes que precisaram de uma internação em centros de terapia intensiva (CHEN et al., 2020; WANG et al., 2020; ZHENG et al., 2020).

Em contraste, pacientes com sintomas mais leves geralmente apresentam contagens de células T normais ou ligeiramente mais altas, como já descrito em outros estudos (THEVARAJAN et al., 2020).

A resposta das células B frente a uma infecção viral serve não apenas para proteger do desafio inicial durante a infecção aguda, mas também para oferecer imunidade estendida contra uma possível reinfecção. Após a resolução de uma infecção, as células plasmáticas formadas durante a fase aguda e convalescente da doença continuam a secretar anticorpos, dando origem à memória sorológica, pois as células B de memória podem responder rapidamente a uma reinfecção gerando novas células plasmáticas de alta afinidade contra o antígeno invasor (VABRET et al., 2020).

Vários estudos demonstraram que altos títulos de anticorpos específicos anti-SARS-CoV-2 estão correlacionados com uma maior neutralização viral *in vitro* e são inversamente correlacionados com a carga viral em pacientes infectados (OKBA et al., 2020; WÖLFEL et al., 2020; ZHAO et al., 2020).

No entanto, títulos mais altos também estão associados a casos clínicos mais graves, sugerindo que uma resposta robusta de anticorpos por si só é insuficiente

para evitar o desenvolvimento da forma grave da doença (OKBA et al., 2020; ZHAO et al., 2020).

1.3.6 Diagnóstico

Diagnósticos com alta acurácia são chave para tomadas de decisões corretas e rápidas, pois estratégias de isolamento de pacientes infectados podem amenizar a propagação desta doença contagiosa (GUAN et al., 2020; WIERSINGA et al., 2020, UDUGAMA al., 2020).

A metodologia de biologia molecular da reação em cadeia da polimerase em tempo real via transcrição reversa (RT-qPCR) é considerada desde o início da pandemia padrão ouro no diagnóstico de COVID-19 (WALLER et al., 2020). Algumas metodologias convencionais, como tomografia computadorizada de tórax (TC), radiografia de tórax portátil e broncoscopia flexível têm sido utilizados como ferramentas suplementares ao diagnóstico da doença (WALLER et al., 2020; YE et al., 2020; PEREIRA et al., 2020; LOOR et al., 2021).

Devido a infecções assintomáticas ou capacidade de detecção limitada, em razão principalmente da baixa carga viral de alguns indivíduos, nem todos os pacientes podem obter evidências diretas de infecção (THOMPSON et al., 2020; MARÍA et al., 2021).

Além disso, as mudanças dinâmicas nos níveis de anticorpos contra SARS-CoV-2 durante os diferentes períodos de infecção, os ensaios sorológicos também desempenham um papel importante na identificação de infecção prévia, diagnóstico de convalescença, investigação epidemiológica e avaliação do efeito pós vacinal (TANG et al., 2020; WU et al., 2021).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) aprovou kits de teste rápido (ensaio imunocromatográfico), como método complementar de diagnóstico. Os kits estão divididos em dois grupos: os que usam amostras das vias respiratórias dos pacientes e detectam o vírus, os testes de antígeno, como o ECO F COVID-19 Ag; e os que usam amostra de sangue e detectam anticorpos (IgM e IgG), como COVID-19 Ab Plus ECO Teste IgM/IgG e TR DPP® COVID-19 IgM/IgG Bio-Manguinhos.

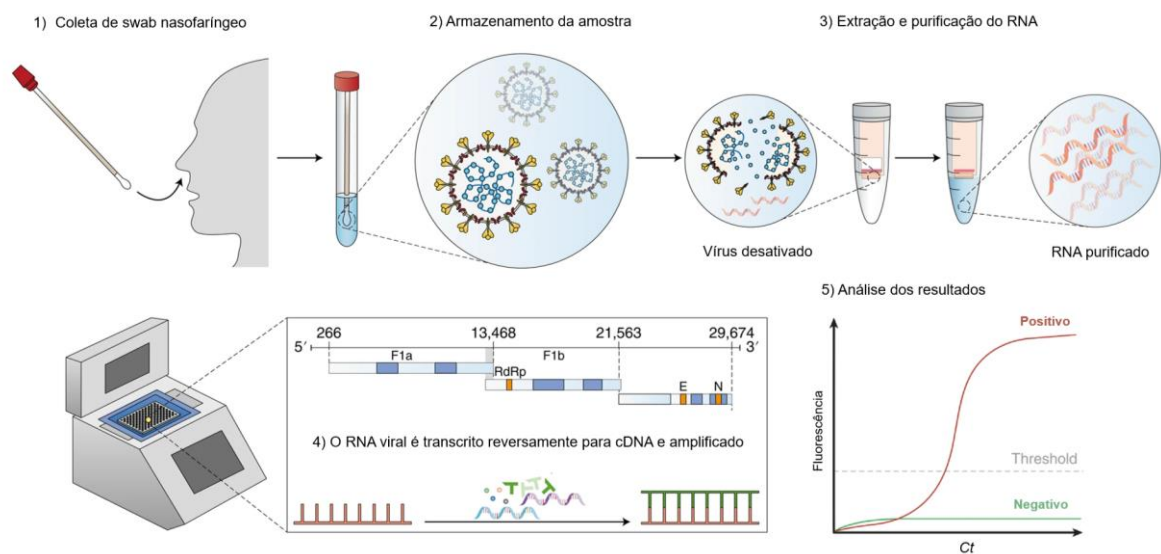
1.3.6.1 Reação em cadeia da polimerase em tempo real via transcrição reversa (RT-qPCR)

O SARS-CoV-2 é detectado em casos suspeitos principalmente a partir de coleta de swab nasofaríngeo para a realização RT-qPCR, técnica recomendada para a detecção de SARS-CoV-2 pela OMS e pelos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) de diferentes países (figura 8). Este método possui alta sensibilidade e especificidade, sendo o método de referência para o diagnóstico da COVID-19. (WHO, 2020; LU et al., 2020; LIANG et al., 2020).

Vários conjuntos de primer-probe foram projetados e utilizados para a detecção de SARS-CoV-2, incluindo os genes N e ORF1-nsp10 (China CDC), N1, N2 e N3 (United States CDC), N e ORF1-nsp14 (Hong Kong University) e E, N e RdRp (Charité Institute of Virology, Universitätsmedizin Berlin, Alemanha) (WHO, 2020; LU et al., 2020; LIANG et al., 2020; CORMAN et al., 2020).

A sensibilidade desta metodologia é inferior no diagnóstico de pacientes com baixa carga viral, principalmente no estágio inicial e na fase de convalescência da COVID-19. Com isso, resultados falso-negativos são inevitáveis, uma vez que o conteúdo de RNA viral é inferior ao limite de detecção deste teste (MEI et al., 2020; JAMAL et al., 2021; TANG et al., 2020; AI et al., 2020).

Figura 8: Reação em cadeia da polimerase em tempo real via transcrição reversa (RT-qPCR). 1) Realização da coleta de swab nasofaríngeo de pacientes suspeitos. 2) Armazenamento da amostra. 3) O RNA viral é extraído e purificado de fluidos que contêm células infectadas por SARS-CoV-2 e de partículas virais livres. 4) O RNA viral recuperado é então transcrito reversamente para cDNA e amplificado. 5) Casos positivos ultrapassam o limite de detecção (threshold).



Fonte: KEVADIYA et al., 2021.

1.3.6.2 Imunoensaios

O ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) é um antigo teste químico universal amplamente disponível na maioria dos laboratórios (ENGVALL et al., 1972; LEE et al., 2008). Antígenos específicos do SARS-CoV-2, como o domínio S1 ou RBD da proteína spike e a proteína do nucleocapsídeo, são revestidos na superfície da placa de ELISA, os quais são colocados em contato com a amostra de soro dos indivíduos a serem testados e posteriormente, anticorpos anti-IgM, anti-IgG ou anti-IgA marcados com enzimas são adicionados para se ligarem a anticorpos específicos. Após os procedimentos de incubação e lavagem da placa, substratos relevantes reagem com a enzima marcador e induzem a mudança de cor, que pode ser detectada usando espectrofotometria para a detecção qualitativa ou semi-quantitativa de anticorpos específicos contra o SARS-CoV-2 (PFAAR et al., 2021).

Comparando-se com a detecção total de anticorpos, os testes de IgM, IgG ou IgA específicos separados, continuam sendo os principais analitos de interesse e que também podem obter um melhor desempenho. Os anticorpos IgM e IgG são amplamente utilizados pois o IgM é produzido na fase inicial da infecção e o IgG possui uma produção e duração mais longa, sugerindo uma fase tardia da infecção ou possivelmente uma infecção prévia (DEEKS et al., 2020; GALIPEAU et al., 2020; WANG et al., 2020).

Além dos ensaios de ELISA, outros métodos são utilizados na detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2, como o imunoensaio de quimioluminescência, imunoensaio de eletroquimioluminescência e ensaio fluorescente ligado a enzima. A maioria dessas metodologias são ensaios automatizados, permitindo um processamento e análises rápidos, de alto rendimento e com boa especificidade (PFAAR et al., 2021).

1.3.6.3 Testes Laboratoriais Remotos (TLR) - Ensaios de fluxo lateral

1.3.6.3.1 Teste imunocromatográfico indireto ou teste de anticorpos

O teste imunocromatográfico indireto é uma plataforma *point of care testing* (POCT) baseada em papel, geralmente fita de nitrocelulose, para o ensaio rápido de detecção de anticorpos amplamente utilizado no diagnóstico sorológico de diferentes patógenos (XIANG et al., 2012).

Geralmente, a plataforma do teste é composta principalmente por três partes: bloco de amostra, bloco do conjugado e bloco de detecção.

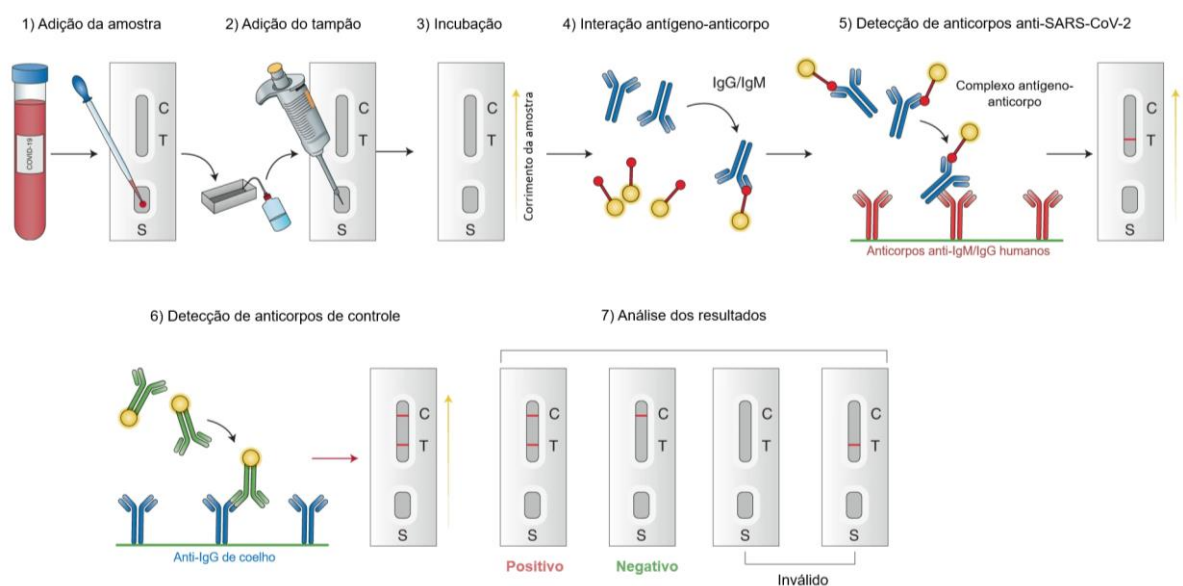
O bloco da amostra torna a amostra de soro ou sangue total adicionados adequados para se ligarem aos componentes de captura. O bloco do conjugado contém componentes que são específicos para os anticorpos de interesse e são conjugados com partículas coloridas ou fluorescentes, como por exemplo ouro coloidal e microesferas de látex (KOCZULA et al., 2016).

O bloco de detecção geralmente inclui duas linhas, uma linha de controle e uma linha de teste com anticorpos específicos imobilizados nas linhas. As mudanças de

cor das linhas de teste e controle indicam resultados reagentes, enquanto resultados negativos são definidos na ausência de resposta apenas na linha teste, como demonstrado na figura 9.

Dada a situação pandêmica durante os picos de transmissão quando o número de casos supera a capacidade diagnóstica e a falta de uma estrutura laboratorial adequada para a realização do diagnóstico sorológico de COVID-19, os ensaios imunocromatográficos rápidos foram desenvolvidos visando um diagnóstico de baixo custo, fácil operação e detecção rápida de anticorpos IgM e/ou IgG específicos contra o SARS-CoV-2.

Figura 9: Teste imunocromatográfico indireto na detecção de anticorpos IgM/IgG anti-SARS-CoV-2. A amostra teste (sangue total, plasma ou soro) entra em contato com a membrana de nitrocelulose (1) após a adição do tampão (2) e incubação da amostra no dispositivo teste (3). Os anticorpos formam complexos com conjugados de látex com anticorpos antivirais humanos (interação antígeno anticorpo) (4). Se anticorpos IgM/IgG específicos anti-SARS-CoV-2 estiverem presentes na amostra, é formado uma faixa colorida em T indicando um resultado positivo (5). O complexo é capturado na membrana formando uma linha de controle vermelha em C (6). Uma banda vermelha em T indica a presença de anticorpos anti-SARS-CoV-2 e resultados sem uma banda visível em C são considerados inválidos (7).



Fonte: KEVADIYA et al., 2021.

1.3.6.3.2 Teste imunocromatográfico direto ou teste de antígeno

Os testes rápidos de antígeno são baseados na detecção direta de proteínas virais do SARS-CoV-2 em amostras de nasofaringe, orofaringe ou swabs nasais. O teste é baseado em um imunoenensaio de fluxo lateral que fornece o resultado em até 30 minutos sem a necessidade de equipamentos laboratoriais dispendiosos ou conhecimentos técnicos especiais, permitindo uma tomada de decisão rápida sobre o isolamento de possíveis pacientes infectados pelo vírus (DINNES et al., 2021; MAK et al., 2020; SCOHY et al., 2020).

As principais proteínas estruturais do SARS-CoV-2 utilizadas no teste rápido de antígeno incluem a proteína do nucleocapsídeo (N), a proteína spike (S), a proteína do envelope (E) e a proteína da membrana (M) (KANDEEL et al., 2020; WU et al., 2020).

Apesar da simplicidade e conveniência deste método *point of care*, o desempenho dele é relativo. A sensibilidade do teste é maior quando as cargas virais das amostras coletadas são altas, principalmente durante a primeira semana de infecção e manifestação dos primeiros sintomas. Com isso, apesar deste teste apresentar uma importante especificidade no diagnóstico da COVID-19, ele perde em sensibilidade comparando-se com a detecção do material genético do vírus através da RT-qPCR, principalmente em relação aos indivíduos assintomáticos e sintomáticos que apresentam uma baixa carga viral (PORTE et al., 2020; SCOHY et al., 2020; IGLOI et al., 2021).

Sendo assim, recomenda-se a não utilização deste teste como uma única base para o diagnóstico e exclusão de COVID-19 em função principalmente da possibilidade de resultados falsos negativos. No entanto, devido ao seu baixo custo, resultados rápidos e testes realizados em larga escala, a detecção de antígenos pode ser utilizada como um importante auxílio na triagem de pacientes suspeitos e vigilância epidemiológica, especialmente em situações de alta epidemia (ESHGHIFAR et al., 2021).

FILGUEIRAS e colaboradores (2022) avaliaram o primeiro teste de antígeno de SARS-CoV-2 recomendado OMS, o COVID-19 Ag ECO Test (ECO Diagnostica), em setembro de 2020 como alternativa para diagnóstico imediato de pacientes internados com suspeita de infecção durante o pico de COVID-19 no Brasil. Todos

os pacientes foram submetidos a RT-qPCR e teste rápido de antígeno através da coleta simultânea de dois swabs nasofaríngeos. Dados demográficos, comorbidades, sintomas e demais informações dos pacientes participantes da pesquisa foram adquiridos. Após análise dos dados, observaram que pacientes que apresentaram acidente vascular cerebral prévio, doença pulmonar obstrutiva crônica, dessaturação e taquipneia, foram determinantes para piores desfechos clínicos da COVID-19, incluindo óbito. Ainda, a comparação entre o teste rápido de antígeno e a RT-qPCR revelou um valor preditivo positivo geral de 97%, estendido para 100% quando realizado entre 4 e 15 dias de sintomas. Além disso, o teste rápido de antígeno avaliado não apresentou resultados inconclusivos. Entre os resultados discordantes e inconclusivos da RT-qPCR, 72% dos pacientes apresentaram em exames de imagem, opacidade em vidro fosco multifocais bilaterais, além de outras alterações relevantes. Ainda, a mediana de tempo para obtenção dos resultados do diagnóstico molecular foi de 83,6 horas, contra 15 minutos para o teste rápido de antígeno realizado, tempo precioso para uma decisão sobre o isolamento e manejo de pacientes com suspeita de COVID-19.

Ainda, a Anvisa aprovou em fevereiro de 2022 o primeiro autoteste para Covid-19 do Brasil, o Novel Coronavírus (Covid-19) Autoteste Antígeno, da empresa CPMH Comércio e Indústria de Produtos Médico-Hospitalares e Odontológicos Ltda. Este autoteste de antígeno foi aprovado para uso com amostra de swab nasal não profunda, com resultado após 15 minutos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Para conceder o registro de possíveis novos testes, a Anvisa analisa uma série de requisitos técnicos, entre os quais estão a usabilidade e o gerenciamento de risco, que servem para adequar o produto ao uso por pessoas leigas, garantindo uma maior segurança (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

A publicação da RDC 595/2022 estabelece os critérios para registro, distribuição, comercialização e uso de autotestes para detecção de antígenos do SARS-CoV-2 e a Anvisa vem se dedicando à avaliação dos produtos que possam ser usados como mais uma ferramenta para o enfrentamento da pandemia de COVID-19. Até junho de 2022, a Anvisa já aprovou 35 autotestes de antígeno, disponíveis para uso no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

O autoteste é um produto que permite que o paciente realize todas as etapas de testagem, desde a coleta da amostra até a interpretação do resultado, sem a necessidade de um auxílio profissional ou de equipamentos especializados. Para isso, deve-se seguir atentamente todas as informações e instruções de uso, que devem conter uma linguagem mais simples e figuras ilustrativas de seu passo a passo. Entretanto, os autotestes não definem um diagnóstico, o qual deve ser realizado adequadamente por um profissional de saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

1.3.7 Tratamento

A rápida identificação de possíveis estratégias terapêuticas diante do progressivo aumento de casos de infecção por SARS-CoV-2 tornou-se uma prioridade e uma necessidade global, embora no início da pandemia de COVID-19 não houvesse consenso sobre o tratamento farmacológico ideal para os pacientes acometidos pela doença (BARLOW et al., 2020).

A oxigenoterapia tem sido utilizada como tratamento de suporte de primeira linha para disfunção respiratória e dispneia em pacientes com COVID-19 com pneumonia e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (PERICO et al., 2021).

Entretanto, vários estudos foram realizados para encontrar tratamentos alternativos para a COVID-19, a fim de controlar a doença de forma eficaz. Testes com substâncias já aprovadas para outras doenças crônicas e infecciosas foram realizados (BARLOW et al., 2020).

Além disso, alguns medicamentos que foram testados em pacientes com SARS-CoV e MERS-CoV também foram avaliados para o tratamento da COVID-19, como Cloroquina, Hidroxicloroquina, Remdesivir, Baricitinibe, anticorpo monoclonal receptor da interleucina-6 (IL-6), Tocilizumab, medicamentos anti-influenza Favipiravir e Umifenovir (TRIGGLE et al., 2020).

Após diversos estudos *in vitro* e clínicos, alguns medicamentos se mostraram ineficazes no controle da doença, como a hidroxiclороquina e a ivermectina, enquanto outros trouxeram efeitos positivos como o uso de corticosteroides como a

dexametasona e anticoagulantes, como a heparina, além de outros medicamentos que continuam em fase de testes (BRAZ et al., 2021; TRIGGLE et al., 2020; BARLOW et al., 2020).

O antiviral remdesivir foi o primeiro medicamento a ser aprovado para uso contra o SARS-CoV-2 no Brasil e nos Estados Unidos. Ele é indicado para o tratamento de adultos e adolescentes infectados pelo vírus com pneumonia que requerem administração suplementar de oxigênio (oxigênio de baixo ou alto fluxo, ou outra ventilação não invasiva no início do tratamento) (ACTT-1 STUDY GROUP et al., 2020).

Além disso, a produção e estudos clínicos envolvendo anticorpos monoclonais, moléculas produzidas artificialmente a partir de clones de uma única célula e que ajudam a neutralizar o vírus no controle da COVID-19, apresentaram resultados promissores na redução significativa do risco de progressão da doença nos pacientes testados, como o REGEN-COV (combinação de anticorpos monoclonais Casirivimabe e Imdevimabe), Banlanivimabe e Etesevimabe, Regdanvimabe, Sotrovimabe e Baricitinibe, estes aprovados para uso pela ANVISA (TAYLOR et al., 2021).

Ainda, o Instituto Butantan (IB) está testando o uso do plasma de recuperados de COVID-19 como terapia para os pacientes com a forma grave da doença. Este plasma convalescente é rico em anticorpos anti proteínas específicas do SARS-CoV-2 e pode contribuir efetivamente no combate da infecção. Além disso, o IB também desenvolve imunoglobulinas anti-SARS-CoV-2 (Anti-SARS-CoV-2 equine F(Ab')₂ immunoglobulin) a partir de animais imunizados com proteínas do vírus. Ensaio pré-clínicos recentemente publicados mostraram que a imunoglobulina F(ab')₂ neutraliza com sucesso o coronavírus, é segura em modelos animais e reduz a gravidade da doença em modelo murino (BOTOSSO et al., 2022).

1.3.8 Prevenção e controle

A vacinação, em combinação com intervenções não farmacêuticas, como o isolamento social e o uso de máscaras, são as melhores formas de controle da pandemia. De acordo com o acompanhamento da OMS, atualmente há 193 vacinas candidatas e 35 aprovadas nos estudos de eficácia de fase III. No Brasil, quatro imunizantes foram adquiridos e tiveram seu uso autorizado pela Anvisa – TABELA 1. (WHO, 2022; ANVISA, 2022).

Tabela 1 Vacinas aprovadas pela Anvisa e disponíveis no Brasil (2022) (TREGONING et al., 2021; POLACK et al., 2020; VOYSEY et al., 2021; NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2022; LEDFORD, 2021; KIM et al., 2021). *CDC, Centros de Controle e Prevenção de Doenças; **FDA, Food and Drug Administration

Fabricante da vacina (nome da vacina)	Plataforma	Regime de ensaio clínico	Eficácia geral	Resultados por gravidade
Pfizer - BioNTech (BNT162b2)	mRNA	2 doses (com 21 dias de intervalo)	95%	100% eficaz na prevenção de doenças graves definidas pelo CDC*; 95,3% eficaz na prevenção de doenças graves definidas pela FDA**
AstraZeneca - (AZD1222 (Vaxzevria/Covishield)	Vetor viral	2 doses (> 12 semanas de intervalo)	81% (eficácia combinada 67%)	100% de eficácia contra a hospitalização
Johnson & Johnson (Ad26.COV2-S)	Vetor viral	Uma dose	66%	85,4% de eficácia contra doença grave-crítica que ocorre ≥28 dias após a vacinação
Sinovac Biotech (CoronaVac)	Vírus inativado	2 doses (14 dias de intervalo)	56,5% (Chile), 65% (Indonésia), 78% (Brasil) e 91% (Turquia)	51% de eficácia contra a infecção sintomática por SARS-CoV-2; 100% de eficácia contra doenças graves; 100% de eficácia contra hospitalização a partir de 14 dias após a segunda dose.

Fonte: a autora

Apesar da aprovação de um número considerável de vacinas de diferentes plataformas em um curto período de tempo, alcançar a cobertura vacinal global continua sendo um grande desafio, tanto em questão de equidade quanto em

relação ao controle de disseminação do vírus (MCADAMS et al., 2020). Ainda, o SARS-CoV-2 continua evoluindo sob pressão seletiva e imunológica, podendo ocasionar o surgimento de variantes com capacidade de escape das vacinas desenvolvidas.

1.3.9 Variantes

Com o aumento da transmissão do vírus e do número de casos de COVID-19, incluindo infecção prolongada em indivíduos com comorbidades e imunocomprometidos, novas variantes do SARS-CoV-2 surgiram e são diariamente monitoradas (figura 10).

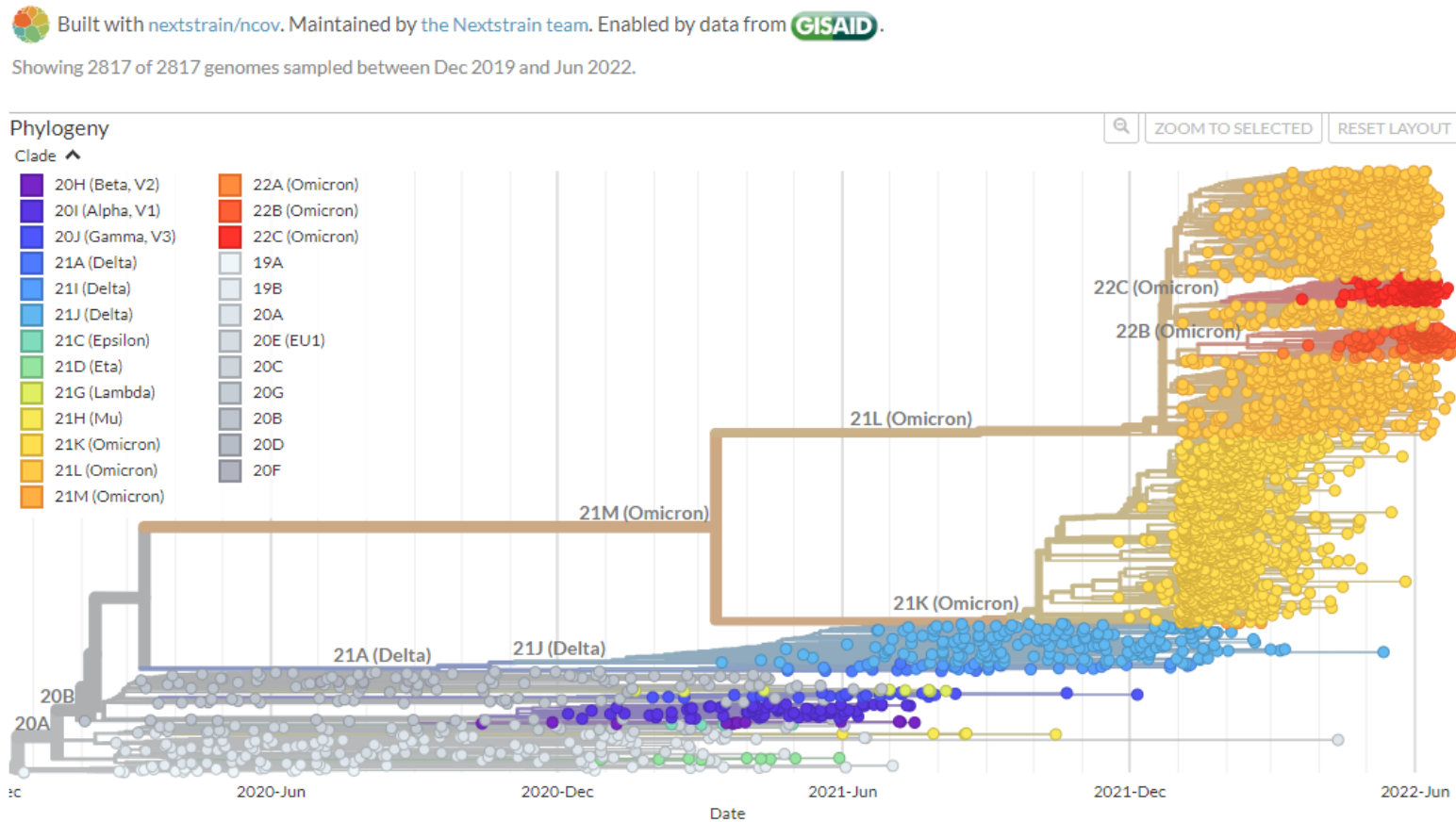
As variantes de preocupação (VOCs) são definidas pela OMS como um vírus com mutações em múltiplos clusters em comparação com o genoma de referência (Wuhan) com aumento da transmissão ou virulência ou diminuição do impacto das vacinas e protocolos de tratamento. As VOCs foram recentemente renomeadas pela OMS como Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1), Delta (B.1.617.2) e Omicron (B.1.1.529) (tabela 2) (WHO, 2022).

As variantes que se espalharam menos amplamente, mas contêm mutações semelhantes as presentes nas VOCs, foram classificadas pela OMS como variantes de interesse (VOIs). As últimas variantes classificadas como VOIs pela OMS foram as linhagens Lambda (C.37), originária do Peru, e Mu (B.1.621), detectada na Colômbia (WHO, 2022). Já a classificação de variantes sob monitoramento (VUMs), são destinadas às cepas com alterações genéticas suspeitas em afetar as características do vírus com alguma indicação de risco futuro, com impacto epidemiológico indeterminado, como por exemplo as variantes B.1.640 e XD (WHO, 2022).

Geralmente estas variantes apresentam predominantemente alterações no gene S em comparação com a cepa de referência. A alta frequência de mutações na proteína spike tem causado grande preocupação, pois essas mutações podem alterar as interações com o receptor do hospedeiro ACE2, alterando a taxa de infecção, ou podem ainda modificar a potência dos anticorpos neutralizantes,

comprometendo, portanto, a eficácia das vacinas disponíveis atualmente (WHO, 2022; TREGONING et al., 2021).

Figura 10: Epidemiologia genômica global do SARS-CoV-2 Nos últimos seis meses. Construído por Nextstrain/ncov.



Fonte: Dados GISAID, junho de 2022.

Tabela 2: Classificação das variantes de SARS-CoV-2. Variantes de preocupação; VOI: Variantes de interesse; VUM: Variantes sob monitoramento. Organização Mundial da Saúde, junho de 2022.

Nome da variante (OMS)	Linhagem Pango	Classificação	Primeira identificação	País de origem
Alpha	B.1.1.7	VOC	Setembro de 2020	Reino Unido
Beta	B.1.351	VOC	Maio de 2020	África do Sul
Gamma	P.1	VOC	Novembro de 2020	Brasil
Delta	B.1.617.2	VOC	Outubro de 2020	Índia
Omicron	B.1.1.529	VOC	Novembro de 2021	Vários países
Épsilon	B.1.427; B.1.429	VOI	Março de 2020	Estados Unidos
Zeta	P.2	VOI	Abril de 2020	Brasil
Eta	B.1.525	VOI	Dezembro de 2020	Vários países
Theta	P.3	VOI	Janeiro de 2021	Filipinas
Iota	B.1.526	VOI	Novembro de 2020	Estados Unidos
Kappa	B.1.617.1	VOI	Outubro de 2020	Índia
Lambda	C.37	VOI	Dezembro de 2020	Peru
Mu	B.1.621	VOI	Janeiro de 2021	Colômbia
	B.1.640	VUM	Setembro de 2021	Vários países
	XD	VUM	Janeiro de 2022	França

Fonte: a autora

2 JUSTIFICATIVA

Estudos anteriores sobre os outros coronavírus humanos, como SARS-CoV e MERS-CoV, demonstraram a importância do entendimento do perfil IgM/IgG durante e pós infecção e relataram que os anticorpos específicos para os respectivos vírus foram detectados em 80-100% dos pacientes duas semanas após o início dos sintomas (CHAFEKAR, Aasiyah; FIELDING, Burtram C., 2018; HSUEH, P.-R. et al., 2004; WOO, Patrick CY et al., 2004; KO, J.-H. et al., 2017; AL KAHLOUT, Reham A. et al., 2019; LOEFFELHOLZ, Michael J.; TANG, Yi-Wei., 2020).

Entretanto, o perfil traçado de anticorpos IgM/IgG contra o SARS-CoV-2, permanece com algumas lacunas de conhecimento. Estudos recentemente publicados a respeito da detecção de anticorpos IgM/IgG em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, além da grande maioria dos estudos conterem dados que possuem um curto período avaliativo, eles não correlacionam a relação dos anticorpos com a idade, gênero, gravidade da doença, comorbidades, protocolos de tratamento, entre outras características importantes dos pacientes COVID-19 positivos.

Portanto, as respostas de anticorpos e a resposta celular contra SARS-CoV-2 permanecem pouco compreendidas e a utilidade clínica dos testes sorológicos precisa ser melhor testada e estudada, sendo que o entendimento mais detalhado da resposta imune é particularmente importante para um maior conhecimento da infecção aguda, de suas possíveis sequelas e da duração e importância desta resposta.

Estudos recentes sobre a resposta imune sugerem fortes papéis das células inatas nas respostas hiperinflamatórias na patogênese da COVID-19, como também sua associação na imunodeficiência tardia observada em pacientes que desenvolvem a forma grave da doença (LEISMAN et al., 2020).

Evidências recentes demonstram que a COVID-19 é marcada pela desregulação das células mieloides (SCHULTE-SCHREPPING et al., 2020), e que pacientes críticos apresentam altas concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas IL-6, IL-1 β , IL-2, IL-8, IL-17 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (LEISMAN et al., 2020). Entretanto, faz-se necessário novas pesquisas acerca do comportamento a longo prazo destes mediadores solúveis séricos após a infecção

pelo SARS-CoV-2, dados estes escassos na literatura principalmente em relação aos indivíduos sobreviventes que apresentaram a forma moderada ou grave da doença.

Há uma necessidade urgente de maiores estudos acerca da resposta imune inata quanto adquirida frente a infecção pelo SARS-CoV-2 para poder tanto aumentar sua eficácia quanto prevenir seus efeitos deletérios. Com isso, buscando esclarecer a cronologia de anticorpos do tipo IgM e IgG, a cinética de mediadores solúveis séricos após infecção aguda por SARS-CoV-2, e a aplicabilidade do uso dos testes rápidos indiretos disponíveis no Brasil, este trabalho se propõe a avaliar a resposta imune frente a infecção de 330 pacientes internados no Hospital da Baleia, Belo Horizonte, com suspeita ou diagnóstico confirmado de COVID-19, com amostras coletadas no início da internação até seis meses do aparecimento dos primeiros sintomas, determinando a manutenção da resposta humoral e inata utilizando ELISA *in house* e citometria de fluxo, para posterior avaliação da utilidade e confiabilidade dos testes rápidos indiretos disponíveis para uso no Brasil.

Relatórios médicos e prontuários foram utilizados para acompanhamento de informações pessoais, sintomas, protocolos de tratamento, resultados do diagnóstico molecular, comorbidades, coinfeções virais, dentre outras informações.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar a resposta imune de anticorpos IgM e IgG específicos para o SARS-CoV-2 e a resposta celular desde a internação hospitalar até seis meses após início de sintomas de pacientes com suspeita ou diagnóstico confirmado de COVID-19 em Belo Horizonte, Minas Gerais.

3.2 Objetivos específicos

- Acompanhar pacientes com suspeita ou diagnóstico confirmado de COVID-19 internados no Hospital da Baleia durante a infecção aguda e durante seis meses após início dos sintomas;
- Avaliar o perfil epidemiológico e clínico dos pacientes participantes do estudo, incluindo dias de sintomas, idade, gênero, comorbidades, protocolo de tratamento, gravidade da doença e desfecho clínico;
- Desenvolver ELISA *in house* para detecção de IgM e IgG específicos para proteína S do SARS-CoV-2;
- Determinar o perfil longitudinal de anticorpos pelos ELISAs desenvolvidos para a avaliação da resposta humoral específica de pacientes COVID-19 positivos;
- Avaliar a aplicação de testes rápidos indiretos anti-SARS-CoV-2 correlacionando dias de sintomas e idade dos pacientes acompanhados.
- Avaliar a resposta celular desenvolvida pelos pacientes COVID-19 positivos através da quantificação dos biomarcadores solúveis sistêmicos;

4 METODOLOGIA

4.1 Ética

O termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido de cada paciente participante. Este estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Fundação Oswaldo Cruz e Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP nº 30428720.3.0000.5091).

Critério de inclusão: Pacientes com suspeita ou diagnóstico molecular confirmado para SARS-CoV-2 internados e em isolamento no Hospital da Baleia, Belo Horizonte, no período de maio de 2020 a maio de 2021 que aceitaram participar do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Critério de exclusão: Pacientes que não aceitaram participar da pesquisa e que não assinaram o TCLE e/ou que receberam protocolo primário de vacinação contra a COVID-19.

4.2 Obtenção de amostras biológicas dos participantes

Trezentos e trinta pacientes com diagnóstico molecular confirmado ou suspeita de COVID-19 internados e em isolamento no Hospital da Baleia, Belo Horizonte, Brasil, no período de maio de 2020 a maio de 2021, foram convidados a participar da pesquisa durante 6 meses. Foram obtidas amostras de sangue periférico desde 1º dia de internação até o 15º dia pós início de sintomas, a cada dois dias, seguido de uma coleta por mês durante 6 meses. Amostras de sangue periférico no volume de 10 ml foram coletadas por punção venosa, obedecendo as normas de biosegurança e centrifugadas a 3.000 g/5 min para coleta de soro, o qual foi armazenado a -20°C até o uso.

O TCLE foi devidamente apresentado durante o primeiro contato com um possível paciente participante alocado na ala restrita a indivíduos com suspeita ou diagnóstico confirmado de COVID-19 no Hospital da Baleia, respeitando todas as normas de biosegurança. Após a assinatura do termo e a coleta de informações de contato para o seguimento do acompanhamento, as amostras de soro foram

corretamente coletadas pelos técnicos de enfermagem do hospital respeitando o delineamento do estudo até a alta do paciente participante.

Após a alta, foi realizado contato telefônico para o posterior retorno do paciente ao hospital, para a marcação das coletas até seis meses do início de sintomas. A área de retorno dos pacientes recuperados após a internação foi montada em uma sala devidamente isolada no Hospital da Baleia, onde as amostras de soro foram coletadas pela equipe do grupo de Diagnóstico e Terapia de Doenças Infecciosas e Câncer (DATA/Instituto René Rachou) devidamente treinada, respeitando todas as normas de biossegurança (Figura 11). Os pacientes foram orientados sobre a importância do acompanhamento pós internação durante os seis meses, mas que poderiam desistir do retorno a qualquer momento da pesquisa. Todas as dúvidas referentes ao estudo foram sanadas pela equipe durante a realização das coletas deste estudo.

Figura 11: Coleta de acompanhamento/retorno dos pacientes recuperados após internação com suspeita ou diagnóstico confirmado de COVID-19 no Hospital da Baleia. Belo Horizonte, maio de 2020.



Fonte: O autor.

4.3 Obtenção de dados epidemiológicos e clínicos dos participantes

Relatórios médicos e prontuários foram utilizados para acompanhamento de informações pessoais, sintomas, protocolos de tratamento, resultados do diagnóstico molecular, comorbidades e coinfeções virais, além de informações individuais como sexo e idade.

O curso clínico da COVID-19 foi classificado com base na classificação da OMS (WHO, 2022) e foi categorizado como leve, moderado ou grave. COVID-19 leve foi definido como sintomas respiratórios sem evidência de pneumonia ou hipóxia, enquanto COVID-19 moderada ou grave foi definida como a presença de alguma evidência clínica e radiológica de pneumonia. Em casos moderados, o nível de saturação de oxigênio no sangue (SpO₂) foi de 90% em ar ambiente, enquanto que nos casos classificados como grave, foram considerados uma frequência respiratória >30 respirações/min ou SpO₂<90% em ar ambiente ou a necessidade de internação em centro de terapia intensiva.

4.4 Desenvolvimento do ELISA IgM e IgG anti-S do SARS-CoV-2

As amostras de soro dos indivíduos do estudo foram testadas para anticorpos do tipo IgM e IgG específicos contra a proteína spike do SARS-CoV-2. A proteína utilizada como antígeno foi produzida em células HEK293 recombinantes estáveis (ALVIM et al., 2020) e a detecção de anticorpos foi medida através dos ELISAs desenvolvidos.

4.4.1 ELISA para detecção de IgM anti-S do SARS-Cov-2

Placas de 96 poços (Corning) foram sensibilizadas com 200ng/poço da proteína Spike em 50 µl/poço de PBS, pH 7, por 16hs a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas cinco vezes com tampão de lavagem (PBS e Tween 20 1%) e bloqueadas com 2,5% de proteínas do leite diluídas em PBS por 1h à 37°C. As placas foram lavadas novamente por cinco vezes e soros diluídos a 1:100 em PBS, 50 µl/poço, foram adicionados e incubados por 1h em TA. As placas foram lavadas novamente seguidas por uma incubação de 1h com uma diluição em PBS de 1:50.000 do

anticorpo secundário conjugado com HRP anti-IgM humano (Sigma Aldrich). Após uma nova lavagem a reação foi iniciada pela adição 50 µl/poço de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma Aldrich) por 10 min e interrompida com a adição de 1N H₂SO₄. A densidade óptica (OD) foi lida a 450nm usando o leitor de placas Multiskan FC (Thermo Fisher).

4.4.2 ELISA para detecção de IgG anti-S do SARS-Cov-2

Placas de 96 poços (Corning) foram sensibilizadas com 200ng/poço da proteína Spike purificada em 50 µl/poço de solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7, por 16hs à 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS e bloqueadas com 2% de proteínas do leite por 1h30 à temperatura ambiente (TA). As placas foram lavadas novamente e soros diluídos a 1:40 em tampão de bloqueio 1%, 50 µl/poço, foram adicionados e incubados por 2hs em TA. As placas foram lavadas novamente seguidas por uma incubação de 90min com uma diluição em PBS de 1:60.000 do anticorpo secundário conjugado com HRP anti-IgG humano (A0170 - Sigma Aldrich). Após uma nova lavagem a reação foi iniciada pela adição 50 µl/poço de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma Aldrich) por 10 min e interrompida com a adição de 1N H₂SO₄. A densidade óptica (OD) foi lida a 450nm usando o leitor de placas Multiskan FC (Thermo Fisher).

4.5 Anticorpos neutralizantes (nAbs) contra SARS-CoV-2

Os anticorpos neutralizantes foram medidos em amostras de soro usando o kit comercial ECO F COVID nAb (ECO Diagnóstica), seguindo as instruções do fabricante (Anexos). Resumidamente, as amostras de soro e uma solução tampão foram adicionados em um micro tubo e esferas liofilizadas contendo proteínas RBD e ACE-2, foram dissolvidas e incubadas a 37°C por 20 min. As esferas foram separadas em dois grupos: "V1" detectou nAbs para cepas de Wuhan (cepa de referência) e para a variante Alpha e "V2" detectou nAbs para as variantes Gamma e Beta. Após o período de incubação, adicionou-se 100 µl de cada mistura no cassete de teste seguido de mais uma incubação de 15 min à temperatura ambiente. O LOD da reação foi definido em 20 e os anticorpos neutralizantes foram determinados através do leitor de imunofluorescência ECO Diagnóstica, F200.

4.6 Avaliação do desempenho de testes rápidos IgM/IgG anti-SARS-CoV-2 disponíveis para uso no Brasil

As amostras de soro foram direcionadas às análises de testes rápidos imunocromatográficos indiretos disponíveis para uso no Brasil para determinação da capacidade diagnóstica. Foram avaliados os seguintes testes: COVID-19 Ab Plus ECO Teste IgM/IgG, ECO Diagnóstica; TR DPP® COVID-19 IgM/IgG, Bio-Manguinhos; Celer Finecare SARS-CoV-2 Anticorpo RBD Test e Wondfo 2019-nCoV RBD Antibody Rapid Test.

A realização de cada teste seguiu rigorosamente as instruções dos fabricantes (Anexos).

4.7 Avaliação da resposta celular desenvolvida

Para as quantificações dos biomarcadores solúveis sistêmicos utilizou-se a plataforma Luminex Bio-Plex Pro™ human cytokines que permitiu a pesquisa dos respectivos analitos: Quimiocinas: CXCL8, CCL11, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, CXCL10; Citocinas pró-inflamatórias: IL-1b, IL-6, TNF-a, IL-12, IFN-g, IL-15 e IL-17; Citoninas reguladoras IL-1ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13; Fatores de crescimento FGF- basic, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-7 e IL-2.

Foram selecionadas 110 amostras de soro de pacientes COVID-19 positivos, coletadas entre 30, 90 e 180 dias após o início de sintomas e internação hospitalar. Como controle, foram utilizadas 37 amostras de soro de pacientes saudáveis coletadas 270 dias após a aplicação da primeira dose de CoronaVac (Sinovac Biotech).

Inicialmente, descongelaram-se as amostras dos soro (banho-maria a 37°C), as quais foram homogeneizadas (vórtex por 5 segundos) e centrifugadas a 14.000 x g, por 5 minutos à temperatura ambiente. Subsequentemente, adicionou-se 50 µL das amostras em placas para ensaio Luminex, previamente preparadas através da adição de 50 µL da mistura de beads (diluída 10x), em cada poço, seguida por lavagem (duas vezes com 100 µL de tampão de lavagem). Incubou-se as placas overnight, 4°C e sob agitação (300±50rpm). No dia seguinte, adicionou-se 25µL do

anticorpo de detecção em cada poço (previamente diluído 10x), incubou-se por 30 minutos em agitador (300 ± 50 rpm), temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Subsequentemente, procedeu-se a lavagem com 100µL de tampão de lavagem, (procedimento realizado por 3 vezes). Posteriormente, adicionou-se 50 µL da estreptavidina-ficoeritrina (SAPE) em cada poço (previamente diluído 10x) e incubou-se por 30 minutos em agitador (300 ± 50 rpm), temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Subsequentemente, procedeu-se a lavagem com 100 µL de tampão de lavagem. Ressuspendeu-se o pellet com adição de 125 µL de tampão de ensaio e as amostras foram homogeneizadas por 10 minutos.

Determinou-se as intensidades medias de fluorescência por aquisição das amostras (50 microesferas por analito avaliado) no equipamento Bio-Plex 200 (Bio-Rad Laboratories, California, EUA), utilizando-se o software Luminex xPONENT versão 3.1 (Merck Millipore, Massachusetts, EUA). As concentrações dos biomarcadores foram obtidas a partir da construção de curvas-padrão dos analitos (utilizando uma curva logística de ajuste de 5 parâmetros para transformar as intensidades médias de fluorescência em concentrações (pg/mL), utilizando-se o software Bio-Plex Manager™ versão 6.1 (Bio-Rad Laboratories, California, EUA).

4.8 Análise dos dados

Foram construídas curvas ROC pelo software Prism 8.0 para determinação do LOD dos resultados derivados do ELISA utilizado na quantificação da resposta humoral dos pacientes RT-qPCR positivos e negativos e para a determinação da sensibilidade e especificidade dos ensaios realizados.

Resultados obtidos com a quantificação de títulos de IgM e IgG dos pacientes do estudo foram analisados pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, Anova (Kruskal-Wallis) e Mann-Whitney, com níveis de significância $p < 0,05$.

Acurácia, valores preditivos positivos (VPP) e valores preditivos negativos (VPN) foram calculados pelo software estatístico MedCalc®.

A concordância entre os testes rápidos indiretos foi avaliada pelo Índice Kappa através do GraphPad Software: $k < 0,01$ 'sem concordância'; $k = 0,01-0,20$ 'ruim'; $k =$

0,20-0,40 'razoável'; k = 0,40-0,60 'moderada'; k = 0,60-0,80 'substancial'; k = 0,80-1,00 'quase perfeito'.

5 RESULTADOS

5.1 Dados epidemiológicos

Um total de 330 pacientes hospitalizados no Hospital da Baleia, Belo Horizonte, com suspeita ou diagnóstico confirmado de COVID-19 não vacinados foram identificados entre maio de 2020 e maio de 2021 e foram separados em dois grupos: RT-qPCR não detectável e RT-qPCR detectável.

Dos 165 pacientes com RT-qPCR não detectável, a idade mediana foi de 58 anos (variando de 1 a 88 anos), 88 (53,3%) eram do sexo feminino e 77 (46,7%) eram do sexo masculino, sendo que 148 (89,7%) foram classificados no grupo de risco da doença, conforme representado na tabela 3.

A maioria dos pacientes negativos participantes foram transferidos da hemodiálise do Hospital da Baleia (66, 40%) e de unidades de pronto atendimento (UPAs) (58, 35,2%).

As comorbidades mais comuns observadas foram hipertensão (84, 50,9%), doença renal crônica (76, 46,1%), diabetes (46, 27,9%) e câncer (32, 19,4%). Sete (4,2%) dos pacientes internados não apresentaram nenhuma comorbidade.

Sobre os principais sintomas primários relatados, 83 pacientes (50,3%) apresentaram dispneia, 66 (40%) febre, 28 (17%) tosse seca, 27 (16,4%) dessaturação, 19 (11,5%) mialgia e 17 (10,3%) odinofagia.

Em relação ao protocolo de medicação adotado durante a internação, os principais recursos utilizados foram o uso de antibióticos (158, 95,8%), administração de oxigênio através de cânula nasal (67, 40,6%), uso de corticoides (33, 20%), anticoagulantes (23, 13,9%) e antivirais (19, 11,5%).

Cento e quarenta e sete (89,1%) dos pacientes negativos no diagnóstico molecular não apresentaram gravidade clínica, entretanto, 18 (10,9%) indivíduos precisaram de tratamento intensivo, sendo que 10 (6,1%) dos pacientes evoluíram a óbito.

Dos 165 pacientes com RT-qPCR detectável, a idade mediana foi de 59 anos (variando de 10 a 91 anos), 99 (60%) eram do sexo masculino e 66 (40%) eram do

sexo feminino, sendo que 141 (85,5%) dos pacientes positivos foram classificados no grupo de risco da doença, conforme representado na tabela 3.

A maioria dos pacientes deste grupo foram transferidos de unidades de pronto atendimento (UPAs) (72, 43,6%), seguido do pronto atendimento e hemodiálise do Hospital da Baleia (49, 29,7%; 31, 18,8%).

Hipertensão (95, 57,6%), diabetes (53, 32,1%), doença renal crônica (38, 23%) e câncer (24, 14,5%) foram as comorbidades mais comuns observadas nos pacientes RT-qPCR detectável.

Os principais sintomas primários relatados foram dispneia (89, 53,9%), febre (81, 49,1%), tosse seca (41, 24,8%), mialgia (30, 18,2%), diarreia (25, 15,2%), dessaturação (23, 13,9%) e prostração (23, 13,9%).

Sobre o protocolo de medicação utilizado, 107 (64,8%) fizeram o uso de antibiótico, 70 (42,4%) cânula nasal de oxigênio, 37 (22,4%) corticoide, 23 (13,9%) antiviral e 14 (8,5%) anticoagulante.

Cento e trinta e três (80,6%) dos pacientes positivos no diagnóstico molecular não apresentaram gravidade clínica, entretanto, 32 (19,4%) indivíduos precisaram de tratamento intensivo, sendo que 17 (10,3%) dos pacientes evoluíram a óbito.

Tabela 3: Dados demográficos e características de 330 pacientes assistidos no Hospital da Baleia, Belo Horizonte, de maio de 2020 a maio de 2021 com confirmação ou suspeita de COVID-19.

Dados Epidemiológicos	RT-qPCR detectável (N=165)		RT-qPCR não detectável (N=165)		TOTAL (N=330)	
	N	%	N	%	N	%
Idade (anos)						
≤20	2	1,2	6	3,6	8	2,4
21-30	0	0,0	5	3,0	5	1,5
31-40	16	9,7	19	11,5	35	10,6
41-50	27	16,4	30	18,2	57	17,3
51-60	42	25,5	33	20,0	75	22,7
61-70	43	26,1	44	26,7	87	26,4
71-80	21	12,7	17	10,3	38	11,5
≥81	14	8,5	11	6,7	25	7,6
Gênero						
Masculino	99	60,0	77	46,7	176	58,7
Feminino	66	40,0	88	53,3	154	46,7
Origem						
Unidades de pronto atendimento (UPAs)	72	43,6	58	35,2	130	39,4
Pronto atendimento Hospital da Baleia	49	29,7	37	22,4	86	26,1
Hemodiálise Hospital da Baleia	31	18,8	66	40,0	97	29,4
Unimed-BH	8	4,8	1	0,6	9	2,7
Santa Casa	5	3,0	3	1,8	8	2,4
Grupo de risco						
Sim	141	85,5	148	89,7	289	87,6
Não	24	14,5	17	10,3	41	12,4
Comorbidades						
Hipertensão	95	57,6	84	50,9	179	54,2
Diabetes	53	32,1	46	27,9	99	30,0
Doença renal crônica	38	23,0	76	46,1	114	34,5
Câncer	24	14,5	32	19,4	56	17,0
Tabagismo	23	13,9	24	14,5	47	14,2

Obesidade	22	13,3	17	10,3	39	11,8
Etilismo	15	9,1	10	6,1	25	7,6
Cardiopatia	14	8,5	18	10,9	32	9,7
Fibrose pulmonar	13	7,9	15	9,1	28	8,5
Asma	10	6,1	12	7,3	22	6,7
Dislipidemia	9	5,5	5	3,0	14	4,2
Hipotireoidismo	8	4,8	6	3,6	14	4,2
Acidente vascular cerebral	3	1,8	5	3,0	8	2,4
Artrite reumatoide	2	1,2	1	0,6	3	0,9
Alzheimer	2	1,2	1	0,6	3	0,9
Usuário de crack	1	0,6	4	2,4	5	1,5
HIV	1	0,6	5	3,0	6	1,8
Hepatite C	1	0,6	1	0,6	2	0,6
Sem comorbidades	16	9,7	7	4,2	23	7,0
Sintomas primários						
Dispneia	89	53,9	83	50,3	172	52,1
Febre	81	49,1	66	40,0	147	44,5
Tosse seca	41	24,8	28	17,0	69	20,9
Mialgia	30	18,2	19	11,5	49	14,8
Dessaturação	23	13,9	27	16,4	50	15,2
Prostração	23	13,9	13	7,9	36	10,9
Diarreia	25	15,2	10	6,1	35	10,6
Anosmia	17	10,3	7	4,2	24	7,3
Odinofagia	17	10,3	17	10,3	34	10,3
Cefaleia	16	9,7	7	4,2	23	7,0
Astenia	14	8,5	13	7,9	27	8,2
Coriza	12	7,3	14	8,5	26	7,9
Tosse oligoprodutiva	7	4,2	10	6,1	17	5,2
Tosse produtiva	7	4,2	11	6,7	18	5,5
Dor torácica	5	3,0	7	4,2	12	3,6
Taquidispneia	3	1,8	0	0,0	3	0,9
Náusea	3	1,8	3	1,8	6	1,8
Confusão mental	2	1,2	2	1,2	4	1,2
Edema	1	0,6	4	2,4	5	1,5

Gravidade clínica						
Leve	0	0	0	0	0	0
Moderada	133	80,6	147	89,1	280	84,8
Grave	32	19,4	18	10,9	50	15,2
Protocolo de medicação						
Antibiótico	107	64,8	158	95,8	265	80,3
Uso de cânula nasal de oxigênio	70	42,4	67	40,6	137	41,5
Corticoide	37	22,4	33	20,0	70	21,2
Antiviral	23	13,9	19	11,5	42	12,7
Anticoagulante	14	8,5	23	13,9	37	11,2
Ventilação mecânica	12	7,3	4	2,4	16	4,8
Antiácidos	9	5,5	2	1,2	11	3,3
Broncodilatador	5	3,0	7	4,2	12	3,6
Analgésico e antipirético	4	2,4	12	7,3	16	4,8
Diurético	4	2,4	4	2,4	8	2,4
Vermífugo	4	2,4	1	0,6	5	1,5
Neuroléptico	1	0,6	0	0,0	1	0,3
Antimalárico	0	0,0	1	0,6	1	0,3
Desfecho						
Alta	148	89,7	155	93,9	303	91,8
Óbito	17	10,3	10	6,1	27	8,2

5.2 ELISA para detecção de IgM anti-S do SARS-CoV-2

O valor de corte determinado para o ensaio ELISA IgM anti-S do SARS-Cov-2 utilizando 220 amostras de soro de pacientes RT-qPCR positivos entre 5 e 15 dias pós início de sintomas e 264 amostras de pacientes negativos foi de 0,35 (gráfico 1). A área sob a curva ROC foi de 0,8203 IC (0,7819-0,8586), $p < 0,0001$ (gráfico 2).

A sensibilidade, especificidade e acurácia do ELISA IgM foram 63,18% (56,44-69,57%), 85,61% (80,78-89,61%) e 75,41% (71,33-79,19%) respectivamente (figuras 12 e 13).

Gráfico 1: Determinação do valor de corte - ELISA IgM anti-S de SARS-CoV-2. A mediana da OD de IgM anti-S é representada em barras, sendo que a de cor vermelha representa os pacientes RT-qPCR positivos e a de cor verde, RT-qPCR negativos. Pontos individuais apresentam cada OD de amostras coletadas entre 5 e 15 dias de sintomas. O limite de detecção de 0,3500 é representado pela linha tracejada. A diferença estatística de Mann-Whitney e ANOVA com níveis de significância $p < 0,05$ é apresentada entre os grupos.

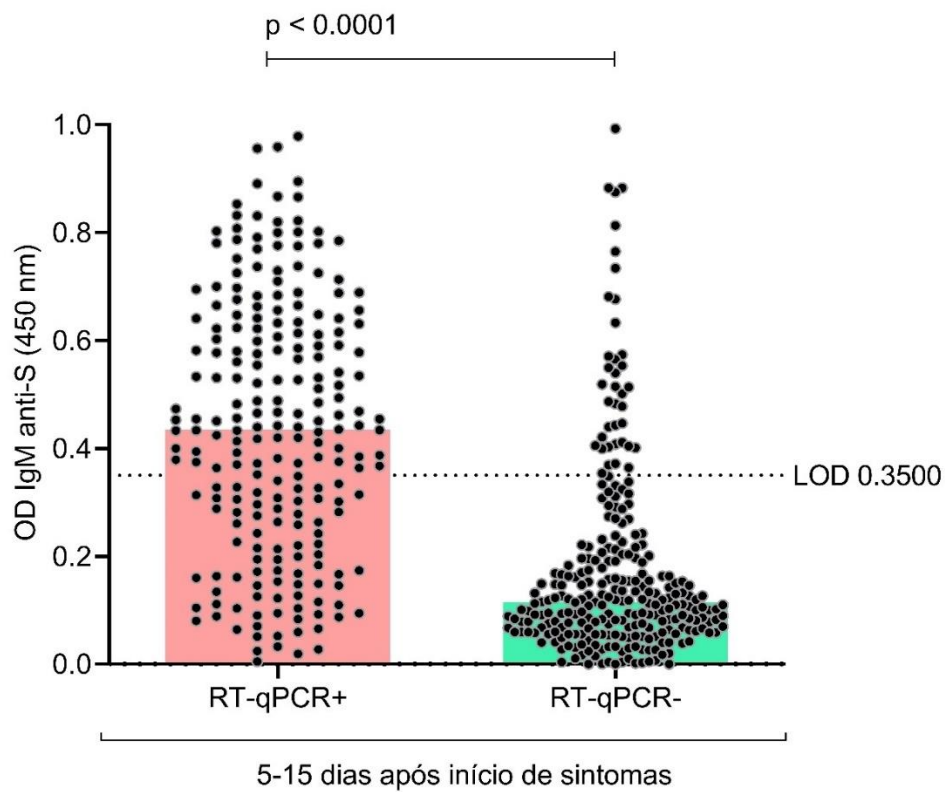


Gráfico 2: Curva ROC ELISA IgM anti-S SARS-CoV-2.

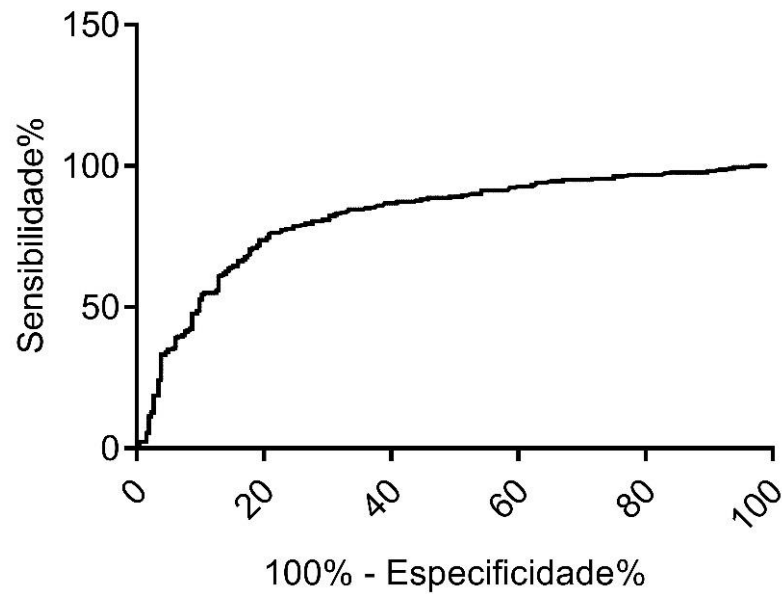


Figura 12: Definição do limiar de corte do método ELISA IgM anti-S SARS-CoV-2 pelo software Prism 8.0.

	Area					Sensitivity & Specificity						
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	
	Sensitivity%	95% CI	Specificity%	95% CI	Likelihood ratio							
> 0.3340	64.55	57.83% to 70.86%	84.85	79.94% to 88.95%	4.26							
> 0.3363	64.09	57.37% to 70.43%	84.85	79.94% to 88.95%	4.23							
> 0.3390	64.09	57.37% to 70.43%	85.23	80.36% to 89.28%	4.34							
> 0.3440	63.64	56.90% to 70.00%	85.23	80.36% to 89.28%	4.31							
> 0.3500	63.18	56.44% to 69.57%	85.61	80.78% to 89.61%	4.39							
> 0.3528	62.73	55.97% to 69.13%	85.61	80.78% to 89.61%	4.36							
> 0.3590	62.73	55.97% to 69.13%	85.98	81.20% to 89.94%	4.48							
> 0.3643	61.82	55.05% to 68.27%	85.98	81.20% to 89.94%	4.41							
> 0.3660	61.82	55.05% to 68.27%	86.36	81.62% to 90.26%	4.53							
> 0.3683	61.36	54.58% to 67.83%	86.36	81.62% to 90.26%	4.50							
> 0.3695	61.36	54.58% to 67.83%	86.74	82.05% to 90.59%	4.63							
> 0.3708	60.91	54.12% to 67.40%	86.74	82.05% to 90.59%	4.59							
> 0.3718	60.91	54.12% to 67.40%	87.12	82.47% to 90.91%	4.73							
> 0.3723	60.45	53.66% to 66.96%	87.12	82.47% to 90.91%	4.69							
> 0.3738	60.00	53.20% to 66.53%	87.12	82.47% to 90.91%	4.66							
> 0.3753	59.55	52.74% to 66.09%	87.12	82.47% to 90.91%	4.62							
> 0.3773	59.09	52.28% to 65.65%	87.12	82.47% to 90.91%	4.59							
> 0.3803	58.64	51.82% to 65.22%	87.12	82.47% to 90.91%	4.55							
> 0.3825	58.18	51.36% to 64.78%	87.12	82.47% to 90.91%	4.52							
> 0.3840	57.73	50.91% to 64.34%	87.12	82.47% to 90.91%	4.48							
> 0.3860	57.27	50.45% to 63.90%	87.12	82.47% to 90.91%	4.45							
> 0.3898	56.82	49.99% to 63.46%	87.12	82.47% to 90.91%	4.41							
> 0.3930	56.36	49.54% to 63.02%	87.12	82.47% to 90.91%	4.38							
> 0.3968	55.91	49.08% to 62.58%	87.12	82.47% to 90.91%	4.34							
> 0.3998	55.91	49.08% to 62.58%	87.50	82.90% to 91.24%	4.47							
> 0.4003	55.45	48.62% to 62.14%	87.50	82.90% to 91.24%	4.44							
> 0.4008	55.00	48.17% to 61.69%	87.50	82.90% to 91.24%	4.40							
> 0.4018	55.00	48.17% to 61.69%	87.88	83.32% to 91.56%	4.54							
> 0.4033	55.00	48.17% to 61.69%	88.26	83.75% to 91.88%	4.68							
> 0.4045	55.00	48.17% to 61.69%	88.64	84.18% to 92.20%	4.84							

Fonte: O autor.

Figura 13: Definição da acurácia diagnóstica do método ELISA IgM anti-S SARS-CoV-2 pelo software MedCalc®.

Results

Statistic	Value	95% CI
Sensitivity	63.18%	56.44% to 69.57%
Specificity	85.61%	80.78% to 89.61%
Positive Likelihood Ratio	4.39	3.22 to 5.99
Negative Likelihood Ratio	0.43	0.36 to 0.51
Disease prevalence (*)	45.45%	40.95% to 50.01%
Positive Predictive Value (*)	78.53%	72.83% to 83.31%
Negative Predictive Value (*)	73.62%	69.97% to 76.96%
Accuracy (*)	75.41%	71.33% to 79.19%

Fonte: O autor.

5.3 ELISA para detecção de IgG anti-S do SARS-CoV-2

O valor de corte determinado para o ensaio ELISA IgG anti-S do SARS-Cov-2 utilizando 271 amostras de soro de pacientes RT-qPCR positivos pós 15 dias do início de sintomas e 332 amostras de pacientes negativos foi de 0,1508 (gráfico 3). A área sob a curva ROC foi de 0,8822 IC (0,8538-0,9107), $p < 0,0001$ (gráfico 4).

A sensibilidade, especificidade e acurácia do ELISA IgG foram 84,13% (79,23-88,27%), 84,04% (79,64-87,81%) e 84,08% (80,91-86,91%), respectivamente.

Gráfico 3: Determinação do valor de corte - ELISA IgG anti-S de SARS-CoV-2. A mediana da OD de IgG anti-S é representada em barras, sendo que a de cor vermelha representa os pacientes RT-qPCR positivos e a de cor verde, RT-qPCR negativos. Pontos individuais apresentam cada OD de amostras coletadas a partir de 15 dias de sintomas. O limite de detecção de 0,1508 é representado pela linha tracejada. A diferença estatística de Mann-Whitney e ANOVA com níveis de significância $p < 0,05$ é apresentada entre os grupos.

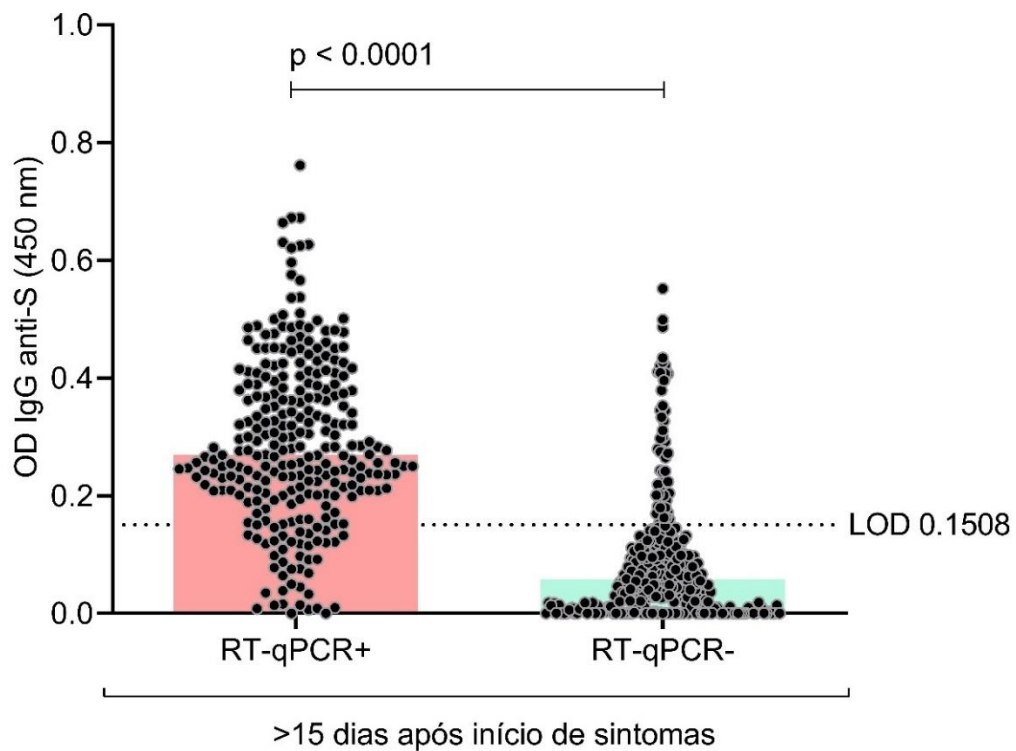


Gráfico 4: Curva ROC ELISA IgG anti-S SARS-CoV-2.

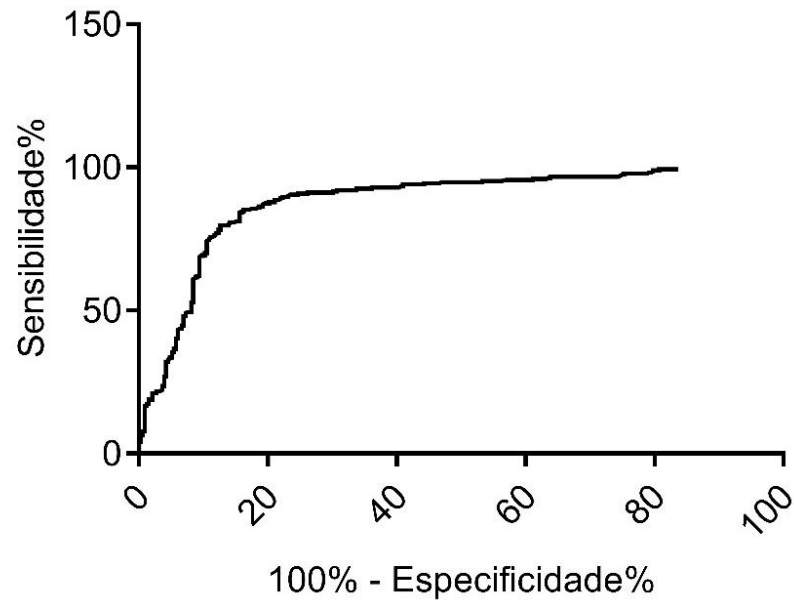


Figura 14: Definição do limiar de corte do método ELISA IgG anti-S SARS-CoV-2 pelo software Prism 8.0.

	Area				Sensitivity & Specificity					
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
	Sensitivity%	95% CI	Specificity%	95% CI	Likelihood ratio					
> 0.1262	87.82	83.33% to 91.47%	79.82	75.09% to 84.00%	4.35					
> 0.1277	87.45	82.91% to 91.15%	79.82	75.09% to 84.00%	4.33					
> 0.1298	87.45	82.91% to 91.15%	80.12	75.42% to 84.28%	4.40					
> 0.1317	87.45	82.91% to 91.15%	80.42	75.74% to 84.55%	4.47					
> 0.1323	87.08	82.50% to 90.84%	80.72	76.06% to 84.83%	4.52					
> 0.1330	86.72	82.09% to 90.52%	80.72	76.06% to 84.83%	4.50					
> 0.1338	86.35	81.67% to 90.20%	80.72	76.06% to 84.83%	4.48					
> 0.1347	86.35	81.67% to 90.20%	81.33	76.71% to 85.37%	4.62					
> 0.1370	85.98	81.26% to 89.88%	81.33	76.71% to 85.37%	4.60					
> 0.1392	85.61	80.86% to 89.56%	81.93	77.36% to 85.92%	4.74					
> 0.1402	85.61	80.86% to 89.56%	82.23	77.68% to 86.19%	4.82					
> 0.1408	85.61	80.86% to 89.56%	82.53	78.01% to 86.46%	4.90					
> 0.1420	85.24	80.45% to 89.24%	82.83	78.34% to 86.73%	4.96					
> 0.1438	85.24	80.45% to 89.24%	83.13	78.66% to 87.00%	5.05					
> 0.1450	85.24	80.45% to 89.24%	83.43	78.99% to 87.27%	5.15					
> 0.1457	85.24	80.45% to 89.24%	83.73	79.32% to 87.54%	5.24					
> 0.1464	84.87	80.04% to 88.92%	83.73	79.32% to 87.54%	5.22					
> 0.1476	84.50	79.63% to 88.60%	83.73	79.32% to 87.54%	5.20					
> 0.1508	84.13	79.23% to 88.27%	84.04	79.64% to 87.81%	5.27					
> 0.1516	83.76	78.82% to 87.95%	84.34	79.97% to 88.08%	5.35					
> 0.1518	83.39	78.42% to 87.62%	84.34	79.97% to 88.08%	5.32					
> 0.1532	83.03	78.02% to 87.30%	84.34	79.97% to 88.08%	5.30					
> 0.1549	82.66	77.61% to 86.97%	84.34	79.97% to 88.08%	5.28					
> 0.1566	82.29	77.21% to 86.64%	84.34	79.97% to 88.08%	5.25					
> 0.1586	81.92	76.81% to 86.31%	84.34	79.97% to 88.08%	5.23					
> 0.1598	81.55	76.41% to 85.99%	84.34	79.97% to 88.08%	5.21					
> 0.1602	81.18	76.01% to 85.66%	84.34	79.97% to 88.08%	5.18					
> 0.1614	81.18	76.01% to 85.66%	84.64	80.30% to 88.34%	5.28					
> 0.1653	80.81	75.61% to 85.32%	85.24	80.96% to 88.88%	5.48					
> 0.1687	80.81	75.61% to 85.32%	85.54	81.29% to 89.14%	5.59					
> 0.1697	80.81	75.61% to 85.32%	85.84	81.62% to 89.41%	5.71					
> 0.1703	80.44	75.21% to 84.99%	85.84	81.62% to 89.41%	5.68					
> 0.1710	80.44	75.21% to 84.99%	86.14	81.95% to 89.67%	5.81					
> 0.1703	80.44	75.21% to 84.99%	85.84	81.62% to 89.41%	5.68					
> 0.1710	80.44	75.21% to 84.99%	86.14	81.95% to 89.67%	5.81					

Fonte: O autor.

Figura 15: Definição da acurácia diagnóstica do método ELISA IgG anti-S SARS-CoV-2 pelo software MedCalc®.

Results

Statistic	Value	95% CI
Sensitivity	84.13%	79.23% to 88.27%
Specificity	84.04%	79.64% to 87.81%
Positive Likelihood Ratio	5.27	4.10 to 6.78
Negative Likelihood Ratio	0.19	0.14 to 0.25
Disease prevalence (*)	44.94%	40.92% to 49.01%
Positive Predictive Value (*)	81.14%	76.97% to 84.70%
Negative Predictive Value (*)	86.65%	83.09% to 89.55%
Accuracy (*)	84.08%	80.91% to 86.91%

Fonte: O autor.

5.4 Determinação do perfil longitudinal de anticorpos anti-SARS-CoV-2

Para a definição do perfil de anticorpos do tipo IgM e IgG de pacientes negativos e infectados pelo SARS-CoV-2 deste estudo, gráficos do tipo scatter foram construídos para a visualização do título de anticorpos de cada paciente ao decorrer do tempo (gráficos 5 a 8). Observou-se que em alguns indivíduos, apesar do resultado não detectável no diagnóstico molecular, apresentaram reatividade no ELISA IgM e IgG durante o estudo (gráficos 5 e 6). Este fato pode estar relacionado com resultados falsos negativos na RT-qPCR ou devido a reação cruzada e/ou falha na especificidade no teste imunoenzimático.

Gráfico 5: IgM anti-S SARS-CoV-2 de pacientes RT-qPCR não detectável durante seis meses após o início de sintomas. A mediana da OD de IgM anti-S de pacientes RT-qPCR negativos é representada pelas barras verdes. Pontos individuais apresentam cada OD de amostras coletadas ao longo de 180 dias após o início de sintomas. O limite de detecção de 0,3500 é representado pela linha tracejada.

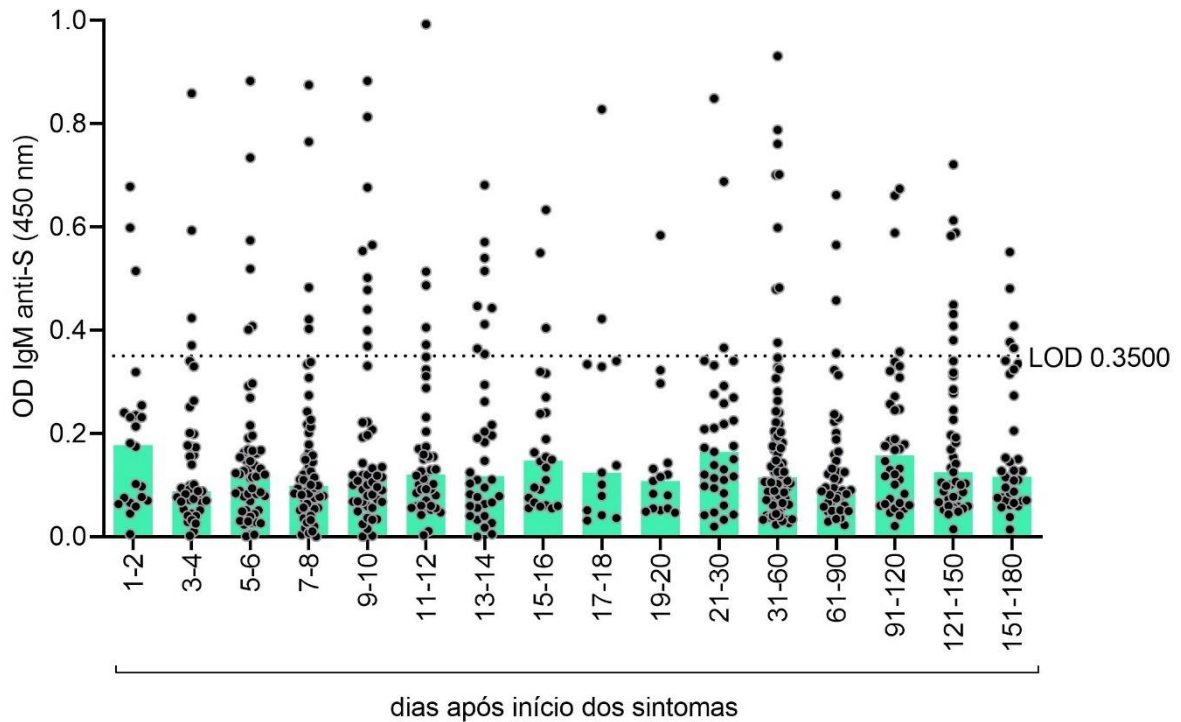
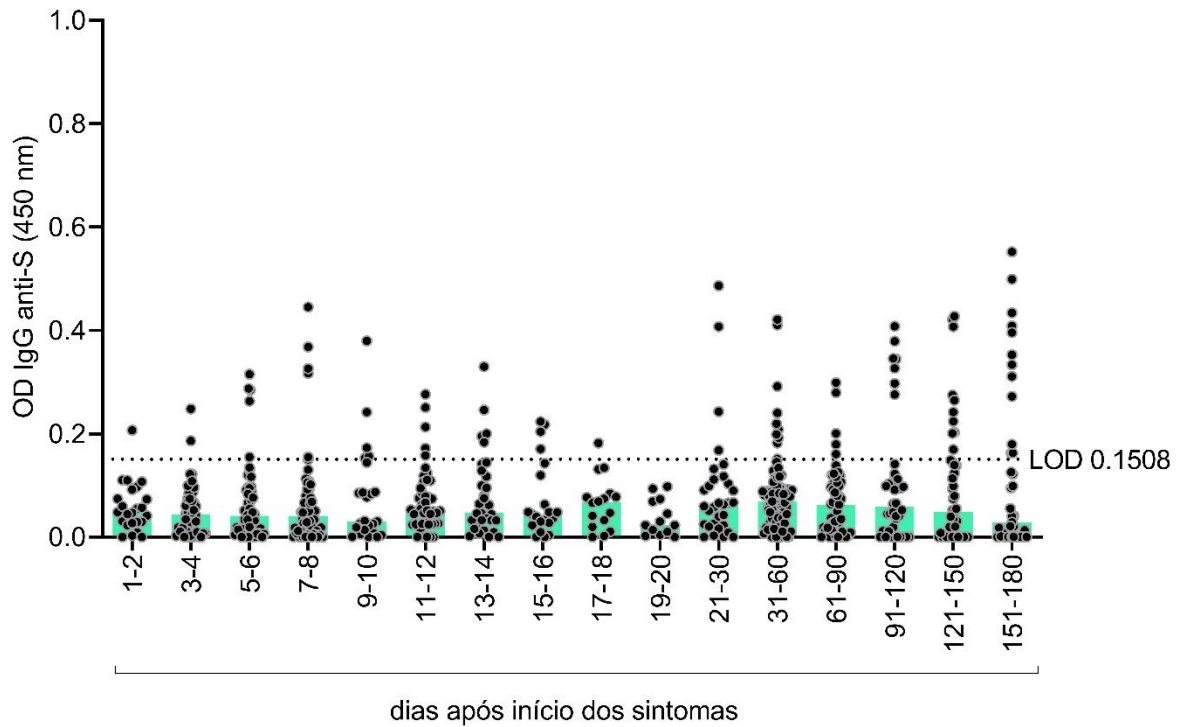
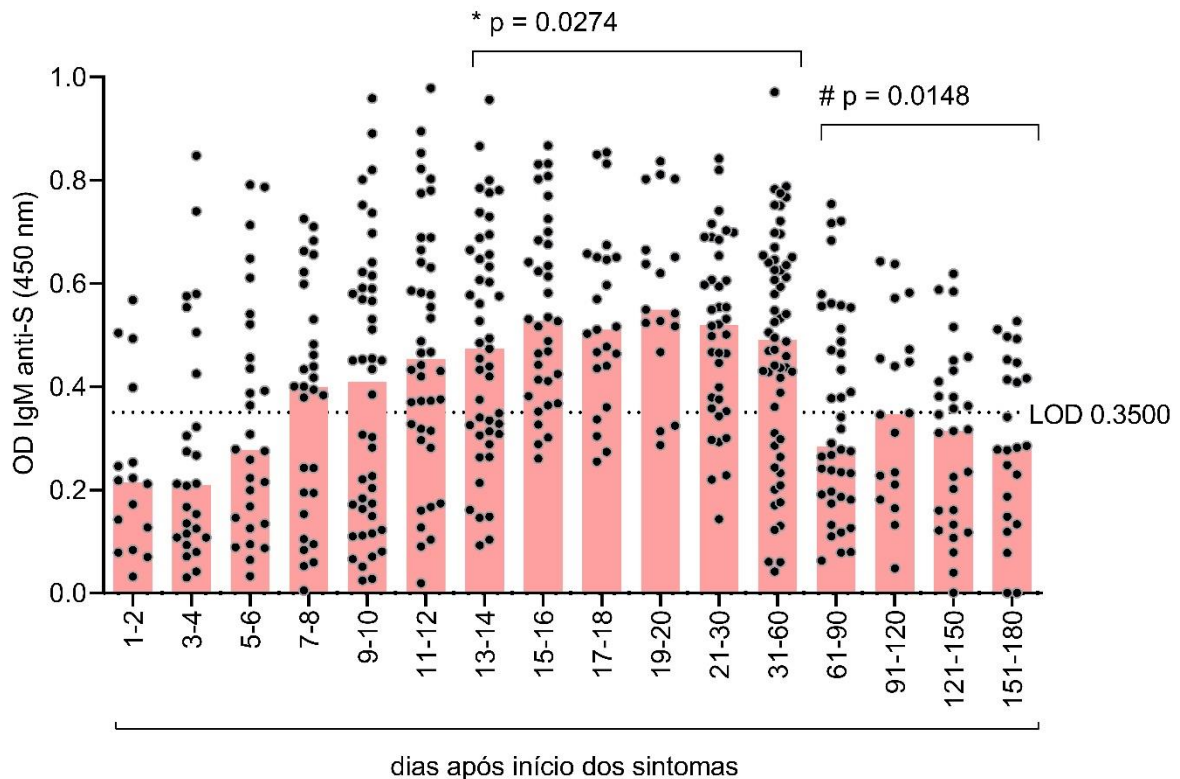


Gráfico 6: IgG anti-S SARS-CoV-2 de pacientes RT-qPCR não detectável durante seis meses após o início de sintomas. A mediana da OD de IgG anti-S de pacientes RT-qPCR negativos é representada pelas barras verdes. Pontos individuais apresentam cada OD de amostras coletadas ao longo de 180 dias após o início de sintomas. O limite de detecção de 0,1508 é representado pela linha tracejada.



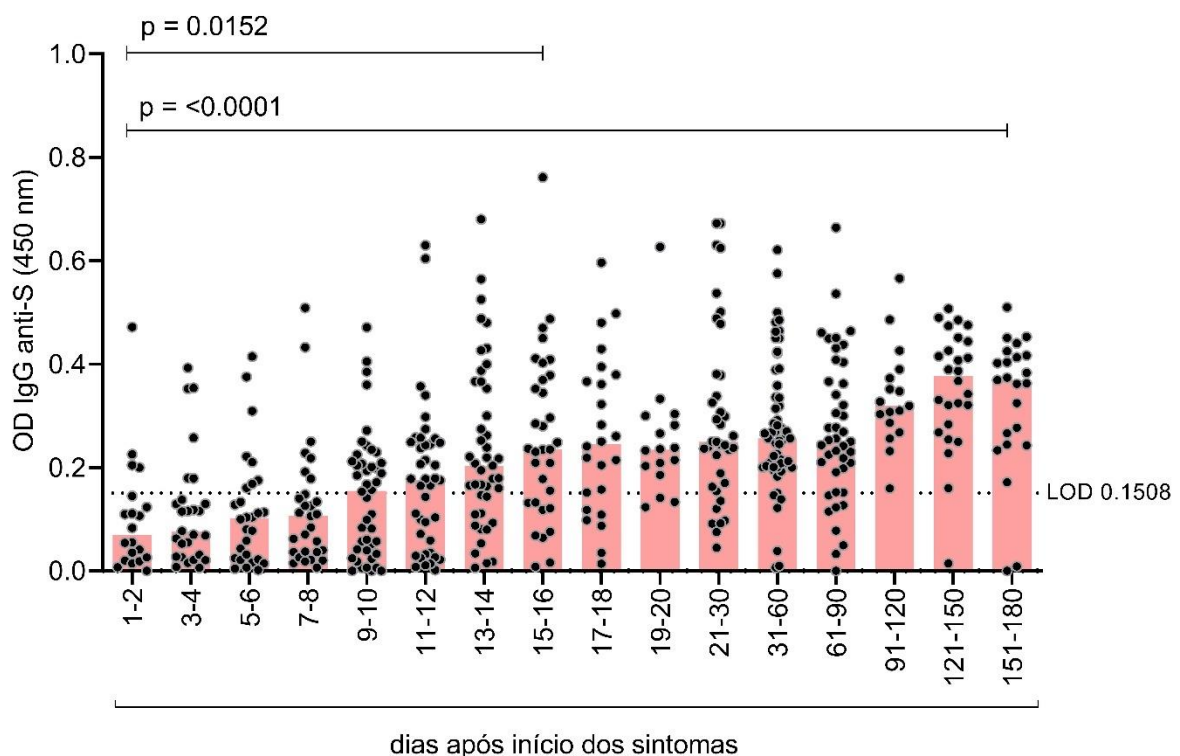
Com base nas medianas, os pacientes RT-qPCR+ passaram a ter IgM detectáveis por ELISA a partir de 7 dias de sintomas e este anticorpo parou de ser detectável a partir de 61 dias. O título de IgM apresentou-se elevado a partir de 13 dias apresentando diferença significativa ($p = 0.0274$) em comparação com os dias iniciais da infecção. Da mesma forma, houve redução no título de IgM após 60 dias com diferença significativa ($p = 0.0148$) em comparação com 15 dias após início de sintomas (gráfico 7).

Gráfico 7: IgM anti-S SARS-CoV-2 de pacientes RT-qPCR detectável durante seis meses após o início de sintomas. A mediana da OD de IgM anti-S de pacientes RT-qPCR positivos é representada pelas barras vermelhas. Pontos individuais apresentam cada OD de amostras coletadas ao longo de 180 dias após o início de sintomas. O limite de detecção de 0,3500 é representado pela linha tracejada. A diferença estatística de Mann-Whitney e ANOVA com níveis de significância $p < 0,05$ é apresentada em (*) e (#), demonstrando o aumento e redução de IgM, respectivamente, durante os tempos avaliados.



Com base nas medianas, os pacientes RT-qPCR+ passaram a ter IgG detectáveis por ELISA a partir de 9 dias de sintomas e este anticorpo continuou detectável até o último período de acompanhamento. O título de IgG apresentou-se elevado a partir de 15 dias apresentando diferença significativa ($p < 0.0152$) em comparação com os dias iniciais da infecção e permaneceu com uma diferença significativa até 180 dias ($p < 0.0001$) (gráfico 8).

Gráfico 8 :IgG anti-S SARS-CoV-2 de pacientes RT-qPCR detectável durante seis meses após o início de sintomas. A mediana da OD de IgG anti-S de pacientes RT-qPCR positivos é representada pelas barras vermelhas. Pontos individuais apresentam cada OD de amostras coletadas ao longo de 180 dias após o início de sintomas. O limite de detecção de 0,1508 é representado pela linha tracejada. A diferença estatística de Mann-Whitney e ANOVA com níveis de significância $p < 0,05$ é apresentada entre os tempos avaliados.

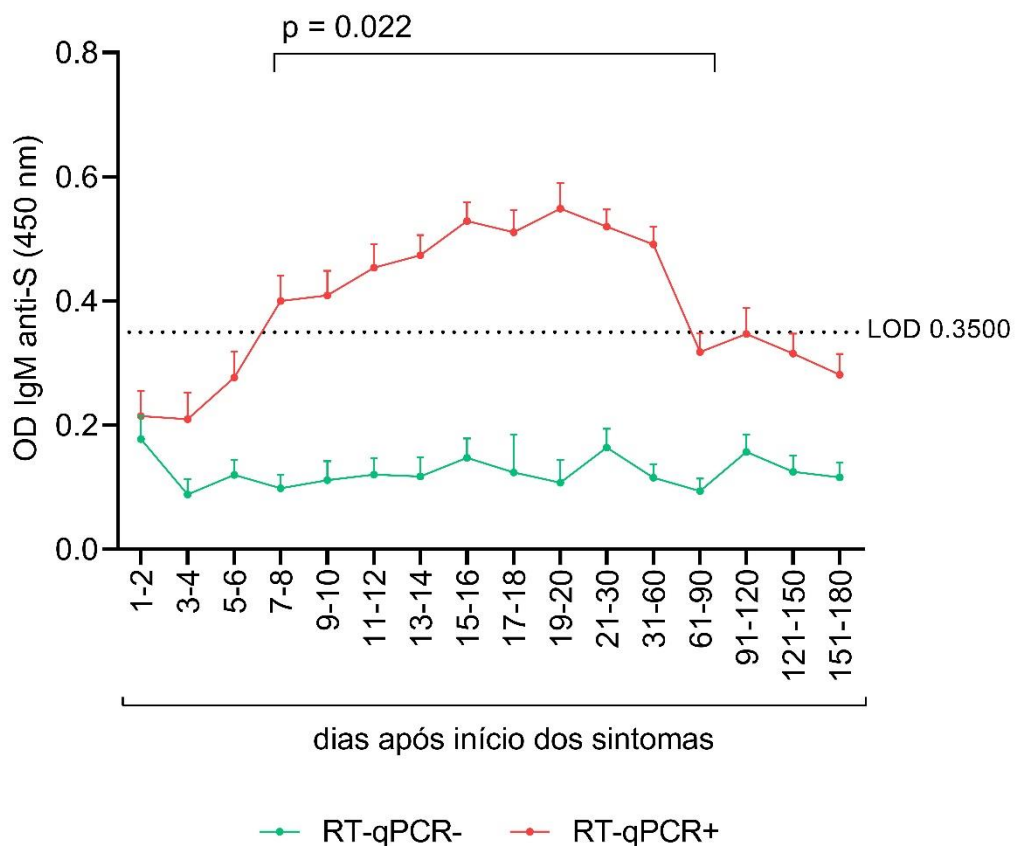


Para avaliar o perfil longitudinal dos anticorpos IgM e IgG entre os pacientes RT-qPCR negativos e positivos desta pesquisa, gráficos utilizando medianas das ODs

desde o primeiro dia até seis meses após o início de sintomas de COVID-19 foram construídos.

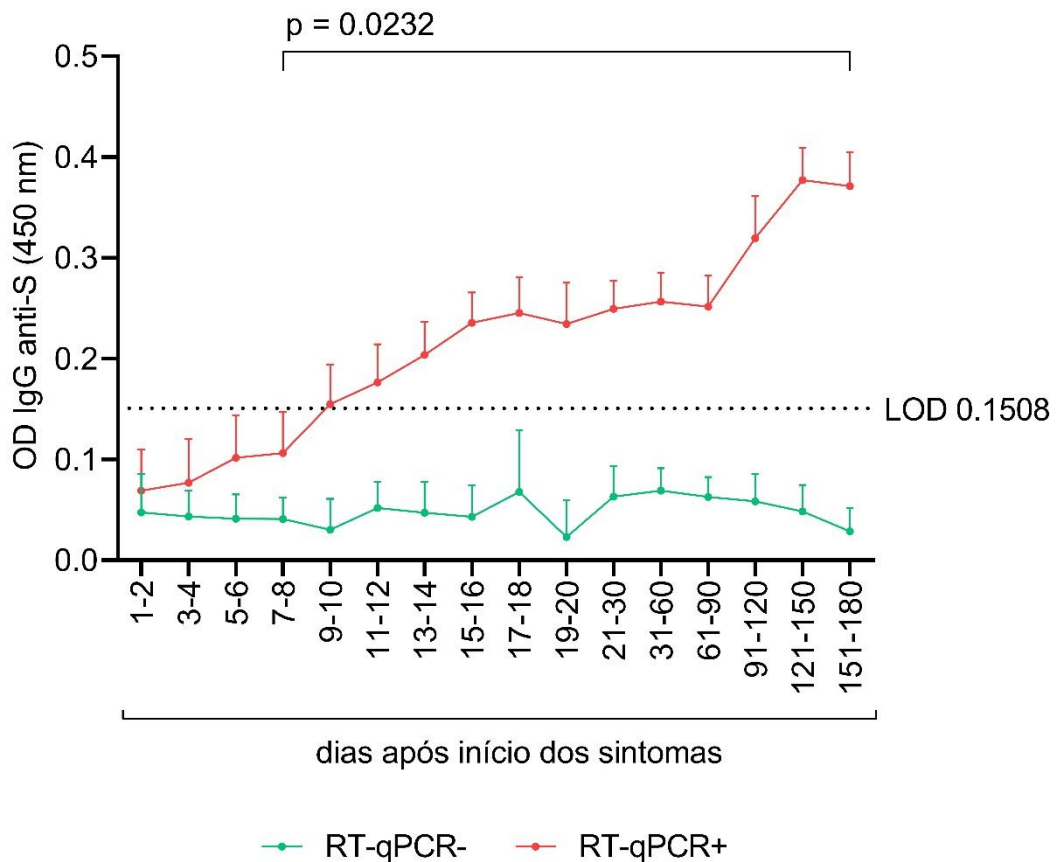
Houve diferença significativa ($p = 0.022$) no título de anticorpos do tipo IgM a partir de 7 dias até 90 dias após início de sintomas em comparação entre os pacientes RT-qPCR negativos e positivos (gráfico 9).

Gráfico 9: Perfil longitudinal geral de anticorpos do tipo IgM de pacientes RT-qPCR negativos e positivos para COVID-19 após internação hospitalar acompanhados durante seis meses após o início de sintomas. O traçado vermelho com pontos representa a mediana e o erro padrão médio da OD dos pacientes RT-qPCR positivos durante 180 dias de acompanhamento. O traçado verde com pontos representa a mediana e o erro padrão médio dos pacientes RT-qPCR negativos durante o mesmo período avaliado. O limite de detecção de 0,3500 é representado pela linha tracejada. A diferença estatística de Mann-Whitney e ANOVA com níveis de significância $p < 0,05$ é apresentada entre os grupos.



Em relação ao perfil longitudinal dos anticorpos do tipo IgG, houve diferença significativa ($p = 0.0232$) a partir de 7 dias após início de sintomas em comparação entre os pacientes RT-qPCR negativos e positivos e esta diferença permaneceu até o último período avaliado de 180 dias (gráfico 10).

Gráfico 10: Perfil longitudinal geral de anticorpos do tipo IgG de pacientes RT-qPCR negativos e positivos para COVID-19 após internação hospitalar acompanhados durante seis meses após o início de sintomas. O traçado vermelho com pontos representa a mediana e o erro padrão médio da OD dos pacientes RT-qPCR positivos durante 180 dias de acompanhamento. O traçado verde com pontos representa a mediana e o erro padrão médio dos pacientes RT-qPCR negativos durante o mesmo período avaliado. O limite de detecção de 0,1508 é representado pela linha tracejada. A diferença estatística de Mann-Whitney e ANOVA com níveis de significância $p < 0,05$ é apresentada entre os grupos.

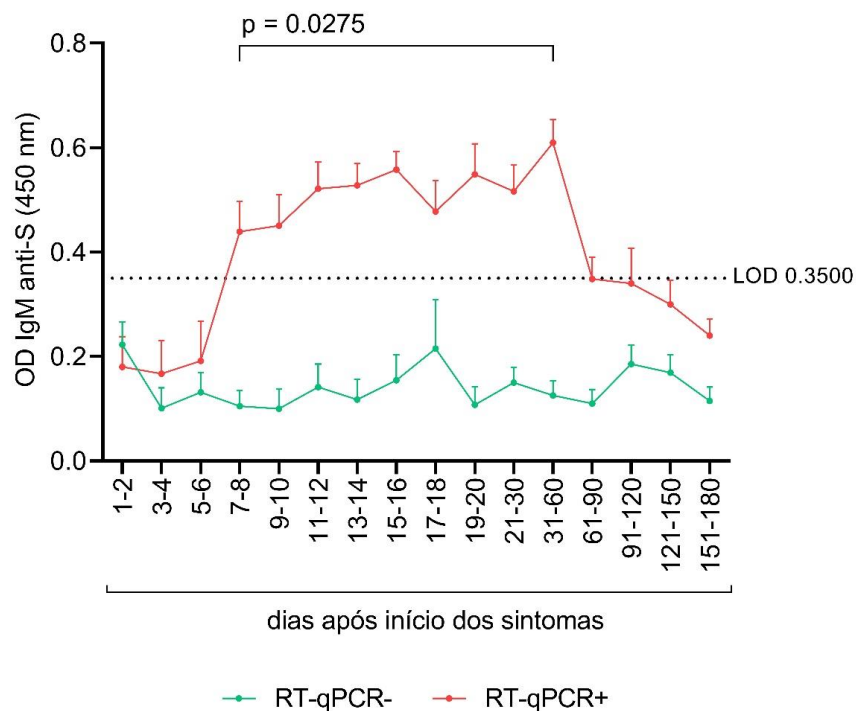


Ainda foram avaliadas as cronologias dos anticorpos IgM e IgG separadamente nas faixas etárias de 1-60 e 61-91 anos de idade, diferenças entre os gêneros, pacientes

que apresentaram algum tipo de neoplasia, além do grupo de pacientes que desenvolveram a forma grave da doença com a necessidade da internação em centros de tratamento intensivo.

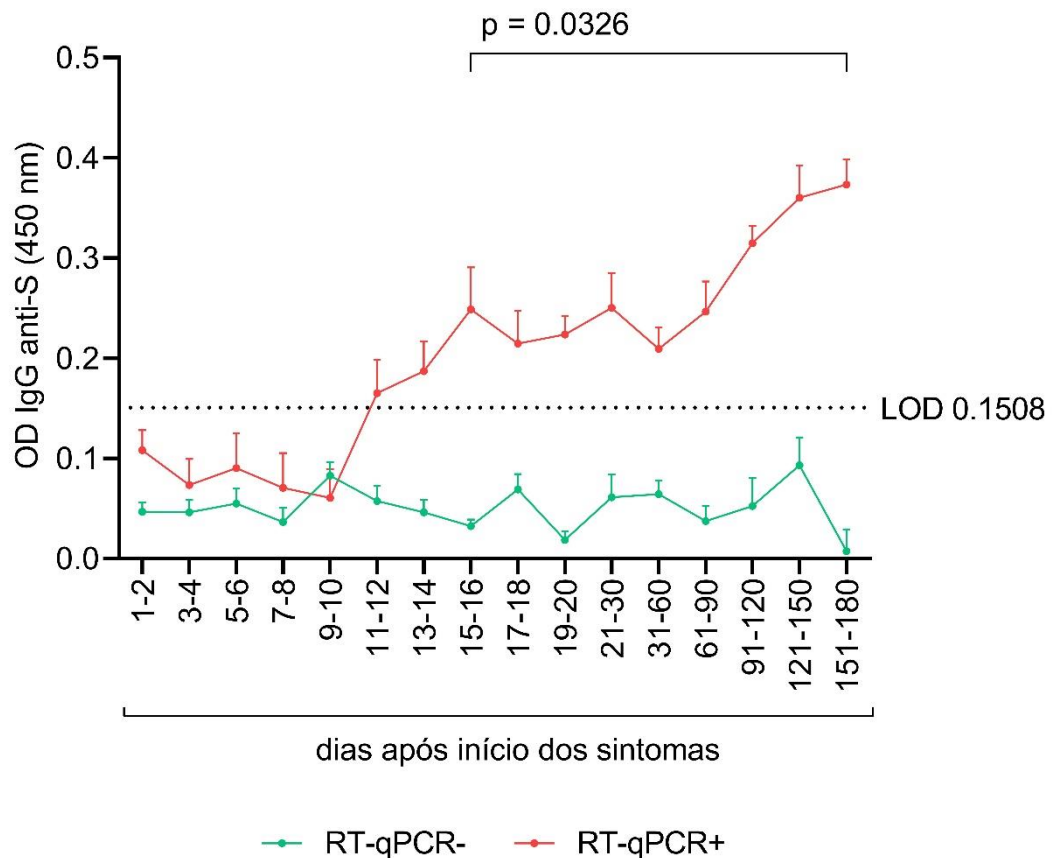
Em relação a idade, houve diferença significativa ($p = 0.0275$) no título de anticorpos do tipo IgM a partir de 7 dias até 60 dias após início de sintomas em comparação entre os pacientes RT-qPCR negativos e positivos dentro da faixa etária de 1-60 anos de idade (gráfico 11).

Gráfico 11: Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgM de pacientes na faixa etária de 1-60 anos de idade RT-qPCR negativos e positivos para COVID-19 após internação hospitalar acompanhados durante seis meses após o início de sintomas. O traçado vermelho com pontos representa a mediana e o erro padrão médio da OD dos pacientes RT-qPCR positivos durante 180 dias de acompanhamento. O traçado verde com pontos representa a mediana e o erro padrão médio dos pacientes RT-qPCR negativos durante o mesmo período avaliado. O limite de detecção de 0,3500 é representado pela linha tracejada. A diferença estatística de Mann-Whitney e ANOVA com níveis de significância $p < 0,05$ é apresentada entre os grupos.



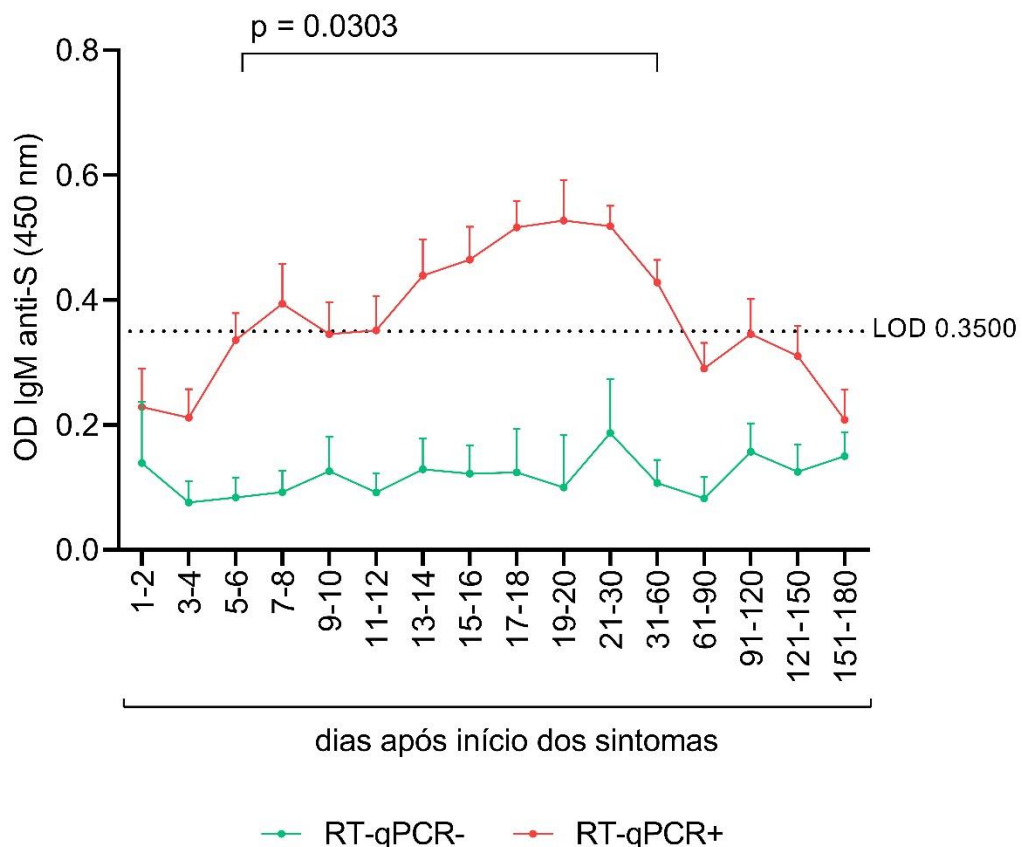
Ao avaliar anticorpos do tipo IgG nesta mesma faixa etária, foi detectada diferença significativa ($p = 0.0326$) a partir de 15 dias após início de sintomas em comparação entre os pacientes RT-qPCR negativos e positivos e esta diferença permaneceu até o último período avaliado de 180 dias (gráfico 12).

Gráfico 12: Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgG de pacientes na faixa etária de 1-60 anos de idade RT-qPCR negativos e positivos para COVID-19 após internação hospitalar acompanhados durante seis meses após o início de sintomas. O traçado vermelho com pontos representa a mediana e o erro padrão médio da OD dos pacientes RT-qPCR positivos durante 180 dias de acompanhamento. O traçado verde com pontos representa a mediana e o erro padrão médio dos pacientes RT-qPCR negativos durante o mesmo período avaliado. O limite de detecção de 0,1508 é representado pela linha tracejada. A diferença estatística de Mann-Whitney e ANOVA com níveis de significância $p < 0,05$ é apresentada entre os grupos.



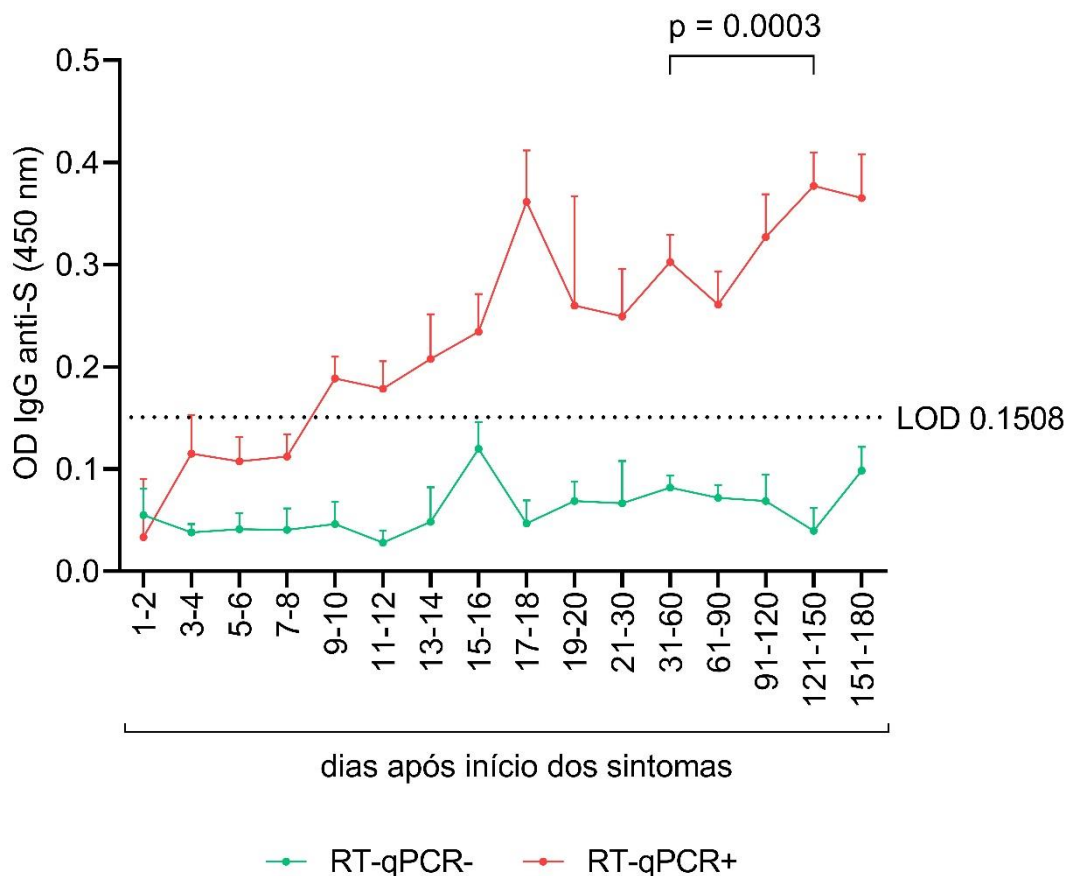
Ao avaliar a cronologia de anticorpos na faixa etária de 61 a 91 anos, observou-se que houve diferença significativa ($p = 0.0303$) nas medianas de IgM a partir de 5 dias até 60 dias após início de sintomas em comparação entre os pacientes RT-qPCR negativos e positivos (gráfico 13).

Gráfico 13 Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgM de pacientes na faixa etária de 61-91 anos de idade RT-qPCR negativos e positivos para COVID-19 após internação hospitalar acompanhados durante seis meses após o início de sintomas. O traçado vermelho com pontos representa a mediana e o erro padrão médio da OD dos pacientes RT-qPCR positivos durante 180 dias de acompanhamento. O traçado verde com pontos representa a mediana e o erro padrão médio dos pacientes RT-qPCR negativos durante o mesmo período avaliado. O limite de detecção de 0,3500 é representado pela linha tracejada. A diferença estatística de Mann-Whitney e ANOVA com níveis de significância $p < 0,05$ é apresentada entre os grupos.



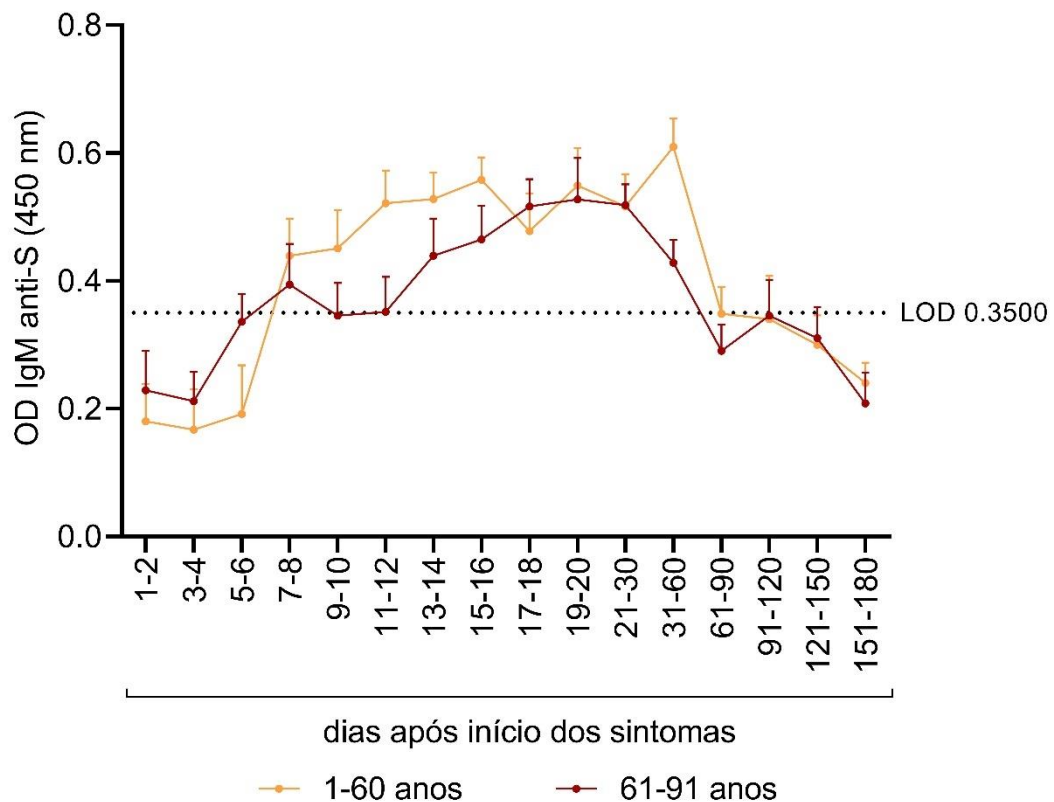
Ao avaliar anticorpos do tipo IgG, houve diferença significativa ($p = 0.0003$) a partir de 31 dias até 150 dias após início de sintomas em comparação entre os pacientes RT-qPCR negativos e positivos na faixa etária de 61 a 91 anos de idade (gráfico 14).

Gráfico 14: Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgG de pacientes na faixa etária de 61-91 anos de idade RT-qPCR negativos e positivos para COVID-19 após internação hospitalar acompanhados durante seis meses após o início de sintomas. O traçado vermelho com pontos representa a mediana e o erro padrão médio da OD dos pacientes RT-qPCR positivos durante 180 dias de acompanhamento. O traçado verde com pontos representa a mediana e o erro padrão médio dos pacientes RT-qPCR negativos durante o mesmo período avaliado. O limite de detecção de 0,1508 é representado pela linha tracejada. A diferença estatística de Mann-Whitney e ANOVA com níveis de significância $p < 0,05$ é apresentada entre os grupos.



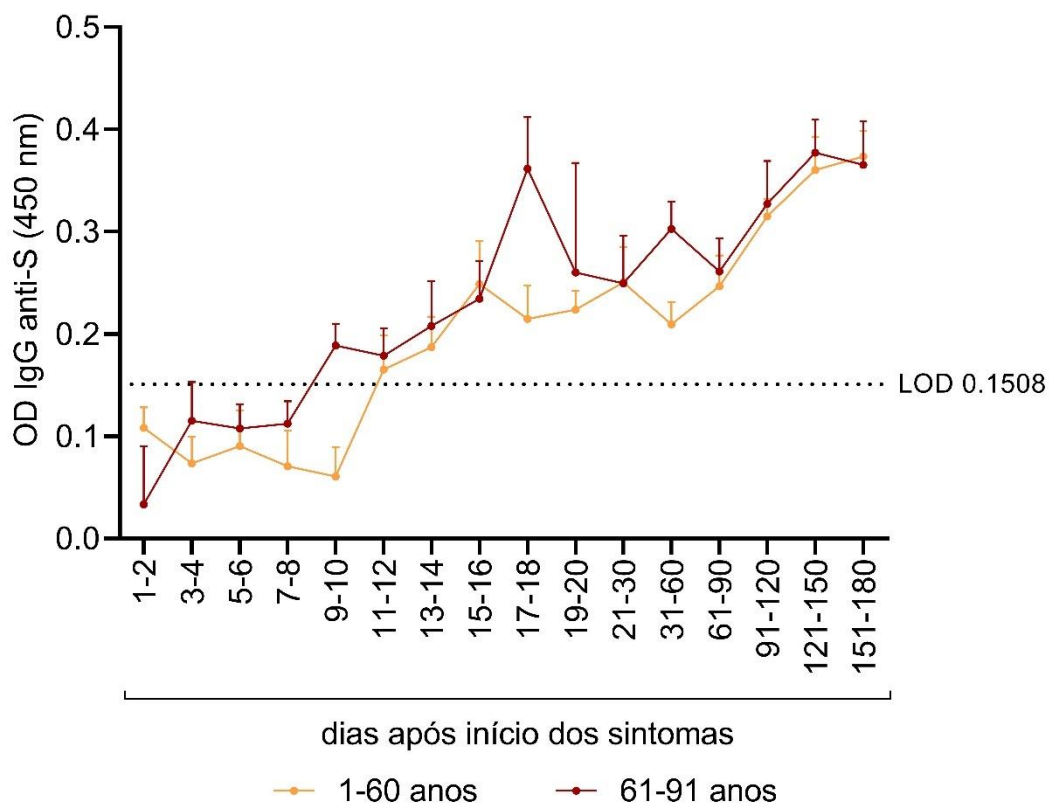
Não houve diferença estatística ao avaliar o título de anticorpos do tipo IgM entre os pacientes RT-qPCR positivos entre as faixas etárias de 1-60 e 61-91 anos de idade, conforme apresentado no gráfico 15.

Gráfico 15: Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgM de pacientes na faixa etária de 1-60 e 61-91 anos de idade RT-qPCR positivos acompanhados durante seis meses após o início de sintomas. O traçado alaranjado com pontos representa a mediana e o erro padrão médio da OD dos pacientes na faixa etária de 1-60 anos de idade durante 180 dias de acompanhamento. O traçado vermelho escuro com pontos representa a mediana e o erro padrão médio dos pacientes na faixa etária de 61-91 anos de idade durante o mesmo período avaliado. O limite de detecção de 0,3500 é representado pela linha tracejada.



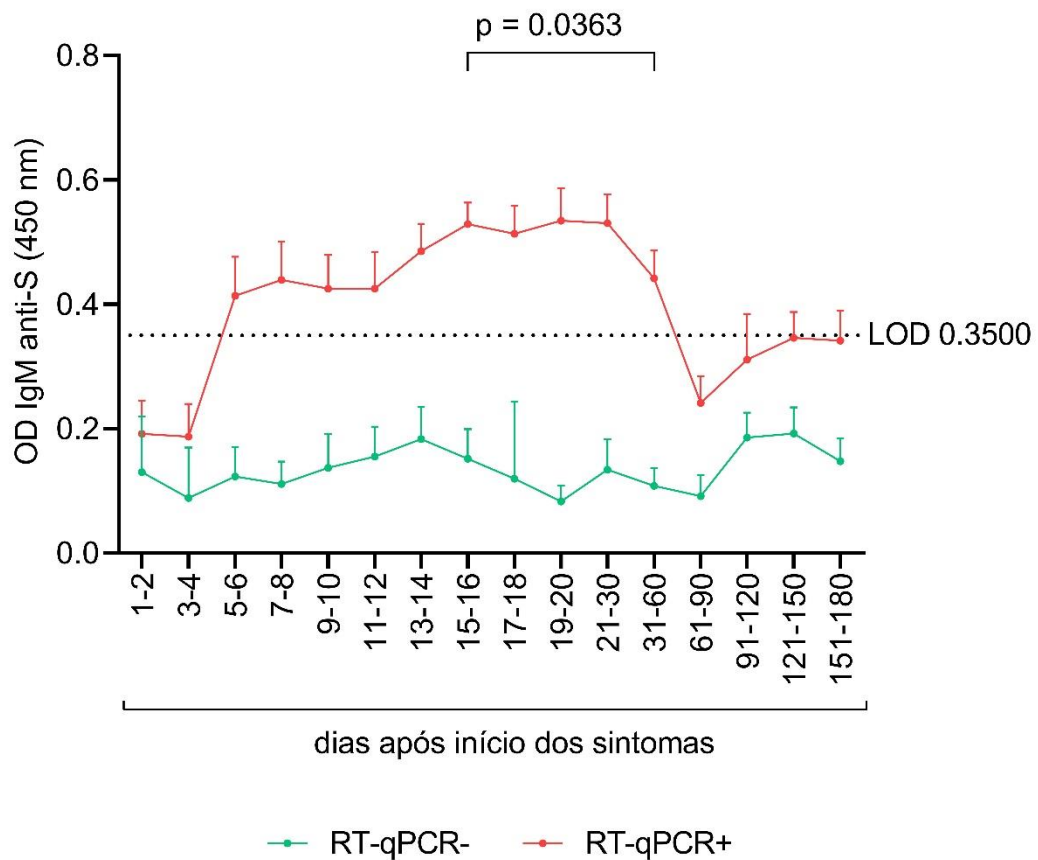
Também não houve diferença estatística ao avaliar o título de anticorpos do tipo IgG entre os pacientes RT-qPCR positivos entre as faixas etárias de 1-60 e 61-91 anos de idade, conforme apresentado no gráfico 16.

Gráfico 16: Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgG de pacientes na faixa etária de 1-60 e 61-91 anos de idade RT-qPCR positivos acompanhados durante seis meses após o início de sintomas. O traçado alaranjado com pontos representa a mediana e o erro padrão médio da OD dos pacientes na faixa etária de 1-60 anos de idade durante 180 dias de acompanhamento. O traçado vermelho escuro com pontos representa a mediana e o erro padrão médio dos pacientes na faixa etária de 61-91 anos de idade durante o mesmo período avaliado. O limite de detecção de 0,1508 é representado pela linha tracejada.



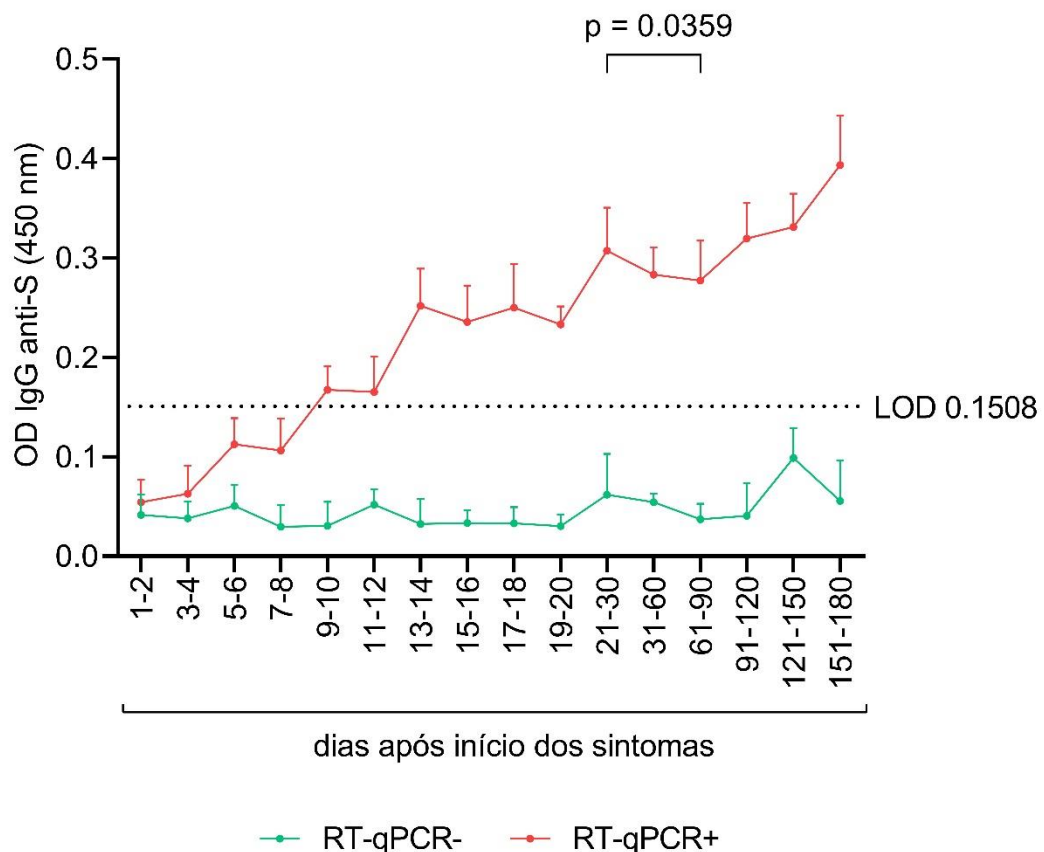
Ao determinar a cronologia de anticorpos do tipo IgM de pacientes do sexo masculino, observou-se uma diferença significativa ($p = 0.0363$) a partir de 15 dias até 60 dias após início de sintomas em comparação entre os pacientes RT-qPCR negativos e positivos (gráfico 17).

Gráfico 17: Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgM de pacientes do sexo masculino RT-qPCR negativos e positivos para COVID-19 após internação hospitalar acompanhados durante seis meses após o início de sintomas. O traçado vermelho com pontos representa a mediana e o erro padrão médio da OD dos pacientes RT-qPCR positivos durante 180 dias de acompanhamento. O traçado verde com pontos representa a mediana e o erro padrão médio dos pacientes RT-qPCR negativos durante o mesmo período avaliado. O limite de detecção de 0,3500 é representado pela linha tracejada. A diferença estatística de Mann-Whitney e ANOVA com níveis de significância $p < 0,05$ é apresentada entre os grupos.



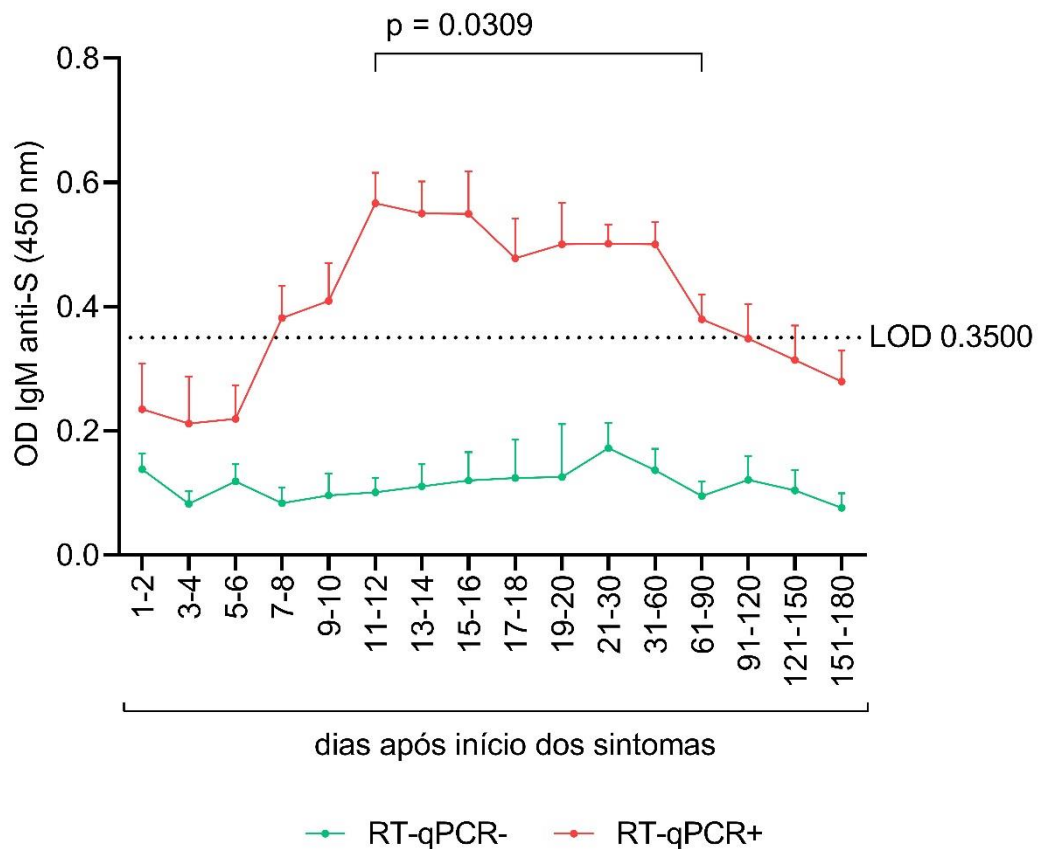
Houve diferença significativa ($p = 0.0359$) a partir de 21 dias até 90 dias após início de sintomas em comparação entre os pacientes RT-qPCR negativos e positivos nos anticorpos do tipo IgG dos pacientes do sexo masculino (gráfico 18).

Gráfico 18: Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgG de pacientes do sexo masculino RT-qPCR negativos e positivos para COVID-19 após internação hospitalar acompanhados durante seis meses após o início de sintomas. O traçado vermelho com pontos representa a mediana e o erro padrão médio da OD dos pacientes RT-qPCR positivos durante 180 dias de acompanhamento. O traçado verde com pontos representa a mediana e o erro padrão médio dos pacientes RT-qPCR negativos durante o mesmo período avaliado. O limite de detecção de 0,1508 é representado pela linha tracejada. A diferença estatística de Mann-Whitney e ANOVA com níveis de significância $p < 0,05$ é apresentada entre os grupos.



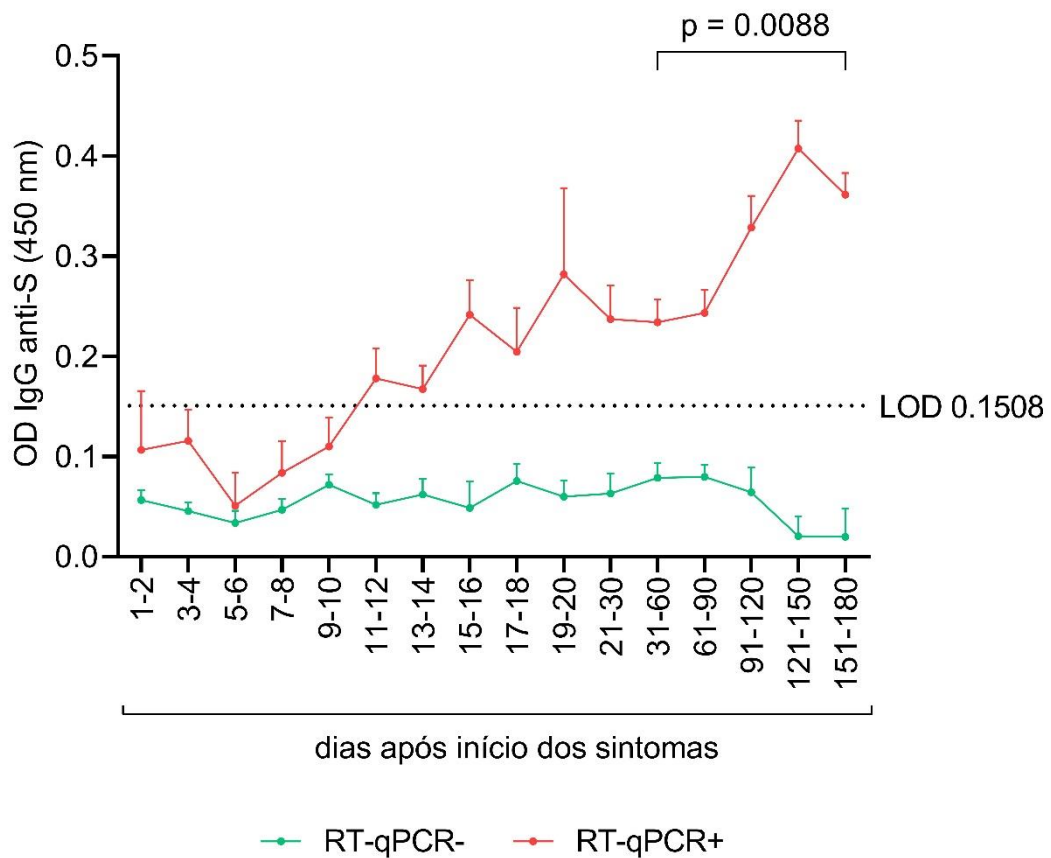
Em relação a cronologia de anticorpos do tipo IgM de pacientes do sexo feminino, houve diferença significativa ($p = 0.0309$) a partir de 11 dias até 90 dias após início de sintomas em comparação com os pacientes RT-qPCR negativos e positivos (gráfico 19).

Gráfico 19: Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgM de pacientes do sexo feminino RT-qPCR negativos e positivos para COVID-19 após internação hospitalar acompanhados durante seis meses após o início de sintomas. O traçado vermelho com pontos representa a mediana e o erro padrão médio da OD dos pacientes RT-qPCR positivos durante 180 dias de acompanhamento. O traçado verde com pontos representa a mediana e o erro padrão médio dos pacientes RT-qPCR negativos durante o mesmo período avaliado. O limite de detecção de 0,3500 é representado pela linha tracejada. A diferença estatística de Mann-Whitney e ANOVA com níveis de significância $p < 0,05$ é apresentada entre os grupos.



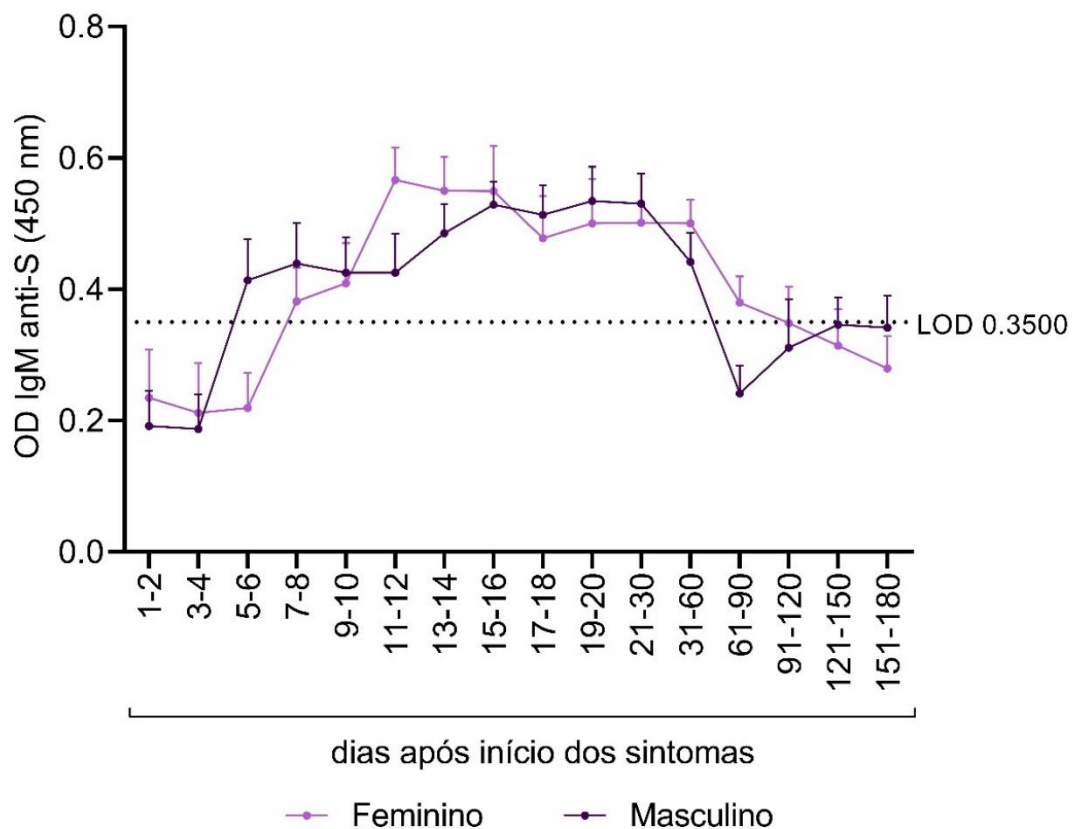
A cronologia de IgG em mulheres demonstrou uma diferença significativa ($p = 0.0088$) a partir de 31 dias após início de sintomas em comparação com os pacientes RT-qPCR negativos e positivos e permaneceu até o último período avaliado de 180 dias (gráfico 20).

Gráfico 20: Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgG de pacientes do sexo feminino RT-qPCR negativos e positivos para COVID-19 após internação hospitalar acompanhados durante seis meses após o início de sintomas. O traçado vermelho com pontos representa a mediana e o erro padrão médio da OD dos pacientes RT-qPCR positivos durante 180 dias de acompanhamento. O traçado verde com pontos representa a mediana e o erro padrão médio dos pacientes RT-qPCR negativos durante o mesmo período avaliado. O limite de detecção de 0,1508 é representado pela linha tracejada. A diferença estatística de Mann-Whitney e ANOVA com níveis de significância $p < 0,05$ é apresentada entre os grupos.



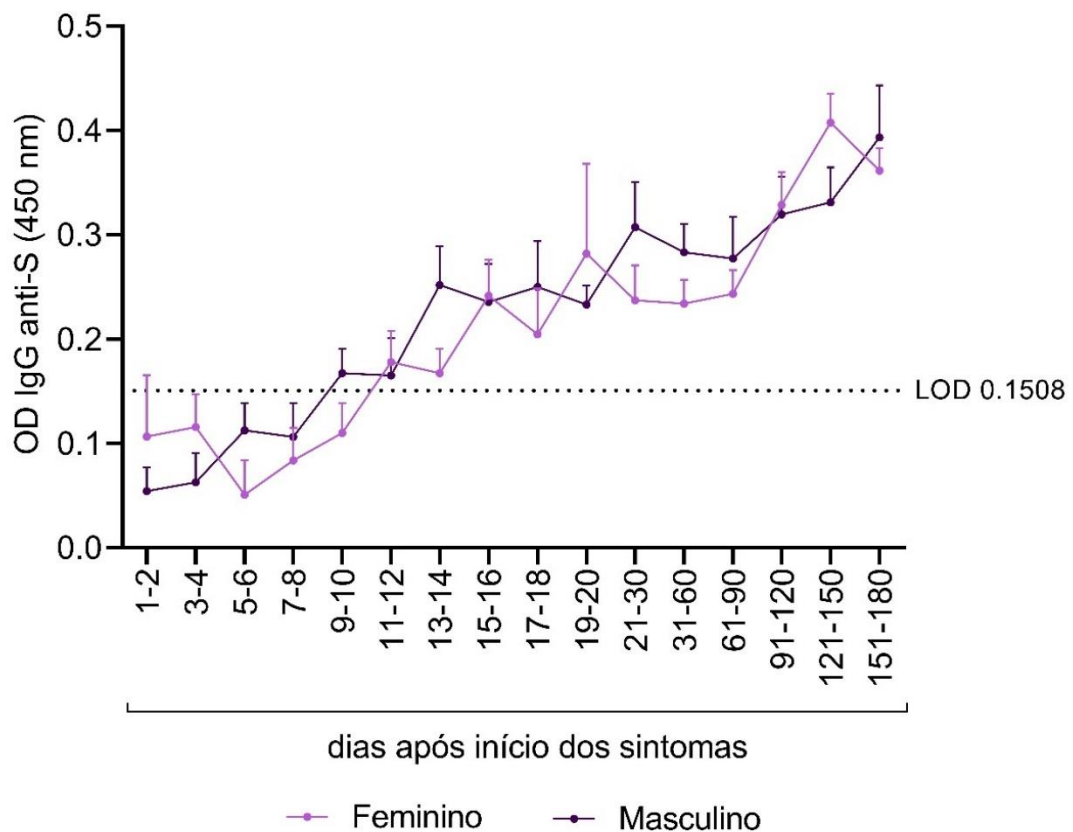
Não houve diferença estatística ao avaliar o título de anticorpos do tipo IgM entre os pacientes RT-qPCR positivos do sexo feminino e masculino, conforme apresentado no gráfico 21.

Gráfico 21: Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgM de pacientes RT-qPCR positivos do sexo feminino e masculino acompanhados durante seis meses após o início de sintomas. O traçado lilás com pontos representa a mediana e o erro padrão médio da OD dos pacientes do sexo feminino durante 180 dias de acompanhamento. O traçado roxo escuro com pontos representa a mediana e o erro padrão médio dos pacientes do sexo masculino durante o mesmo período avaliado. O limite de detecção de 0,3500 é representado pela linha tracejada.



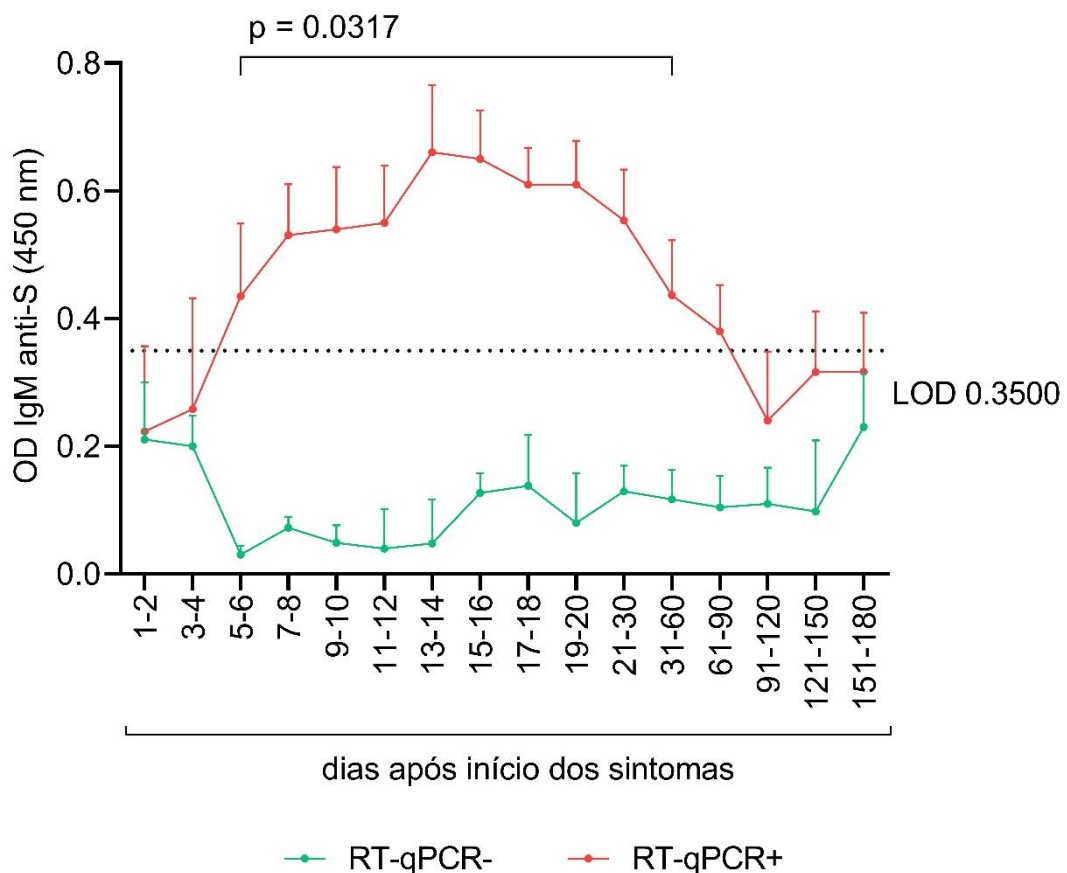
Também não houve diferença estatística ao avaliar o título de anticorpos do tipo IgG entre os pacientes RT-qPCR positivos do sexo feminino e masculino, conforme apresentado no gráfico 22.

Gráfico 22: Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgG de pacientes RT-qPCR positivos do sexo feminino e masculino acompanhados durante seis meses após o início de sintomas. O traçado lilás com pontos representa a mediana e o erro padrão médio da OD dos pacientes do sexo feminino durante 180 dias de acompanhamento. O traçado roxo escuro com pontos representa a mediana e o erro padrão médio dos pacientes do sexo masculino durante o mesmo período avaliado. O limite de detecção de 0,1508 é representado pela linha tracejada.



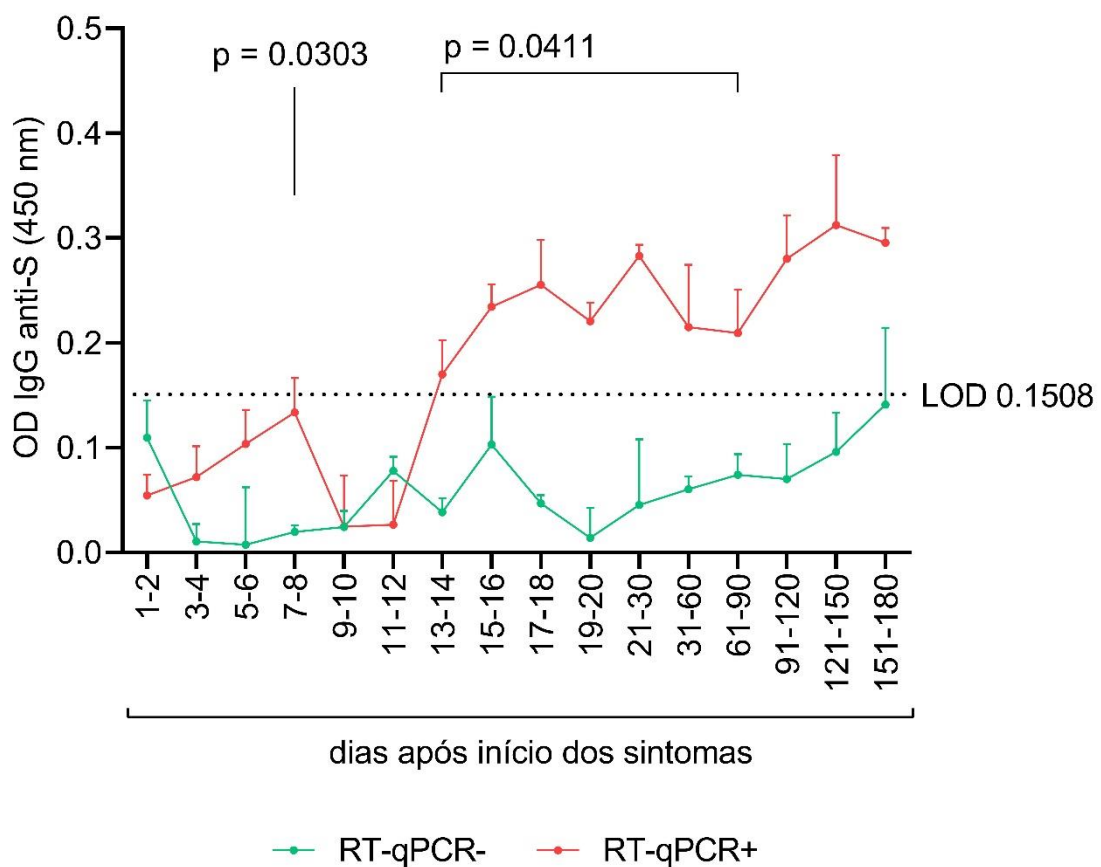
Sobre os pacientes que apresentaram algum tipo de neoplasia, houve diferença significativa ($p = 0.0317$) de anticorpos do tipo IgM a partir de 5 dias até 60 dias após início de sintomas em comparação com os pacientes RT-qPCR negativos e positivos (gráfico 23).

Gráfico 23: Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgM de pacientes que apresentaram algum tipo de neoplasia RT-qPCR negativos e positivos para COVID-19 após internação hospitalar acompanhados durante seis meses após o início de sintomas. O traçado vermelho com pontos representa a mediana e o erro padrão médio da OD dos pacientes RT-qPCR positivos durante 180 dias de acompanhamento. O traçado verde com pontos representa a mediana e o erro padrão médio dos pacientes RT-qPCR negativos durante o mesmo período avaliado. O limite de detecção de 0,3500 é representado pela linha tracejada. A diferença estatística de Mann-Whitney e ANOVA com níveis de significância $p < 0,05$ é apresentada entre os grupos.



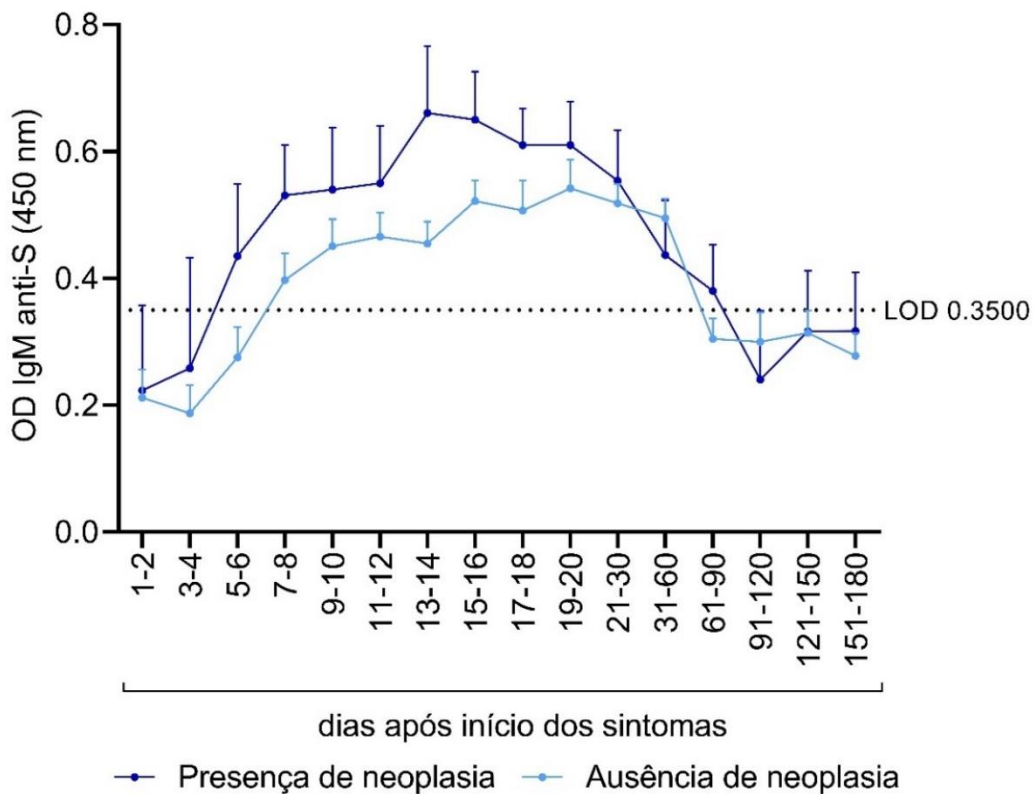
Ao avaliar anticorpos do tipo IgG destes mesmos pacientes que apresentaram algum tipo de neoplasia, observou-se uma diferença significativa ($p = 0.0303$) a partir de 7 dias após início de sintomas e entre 13 e 90 dias em comparação com os pacientes RT-qPCR negativos e positivos ($p = 0.0411$) (gráfico 24).

Gráfico 24: Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgG de pacientes que apresentaram algum tipo de neoplasia RT-qPCR negativos e positivos para COVID-19 após internação hospitalar acompanhados durante seis meses após o início de sintomas. O traçado vermelho com pontos representa a mediana e o erro padrão médio da OD dos pacientes RT-qPCR positivos durante 180 dias de acompanhamento. O traçado verde com pontos representa a mediana e o erro padrão médio dos pacientes RT-qPCR negativos durante o mesmo período avaliado. O limite de detecção de 0,1508 é representado pela linha tracejada. A diferença estatística de Mann-Whitney e ANOVA com níveis de significância $p < 0,05$ é apresentada entre os grupos.



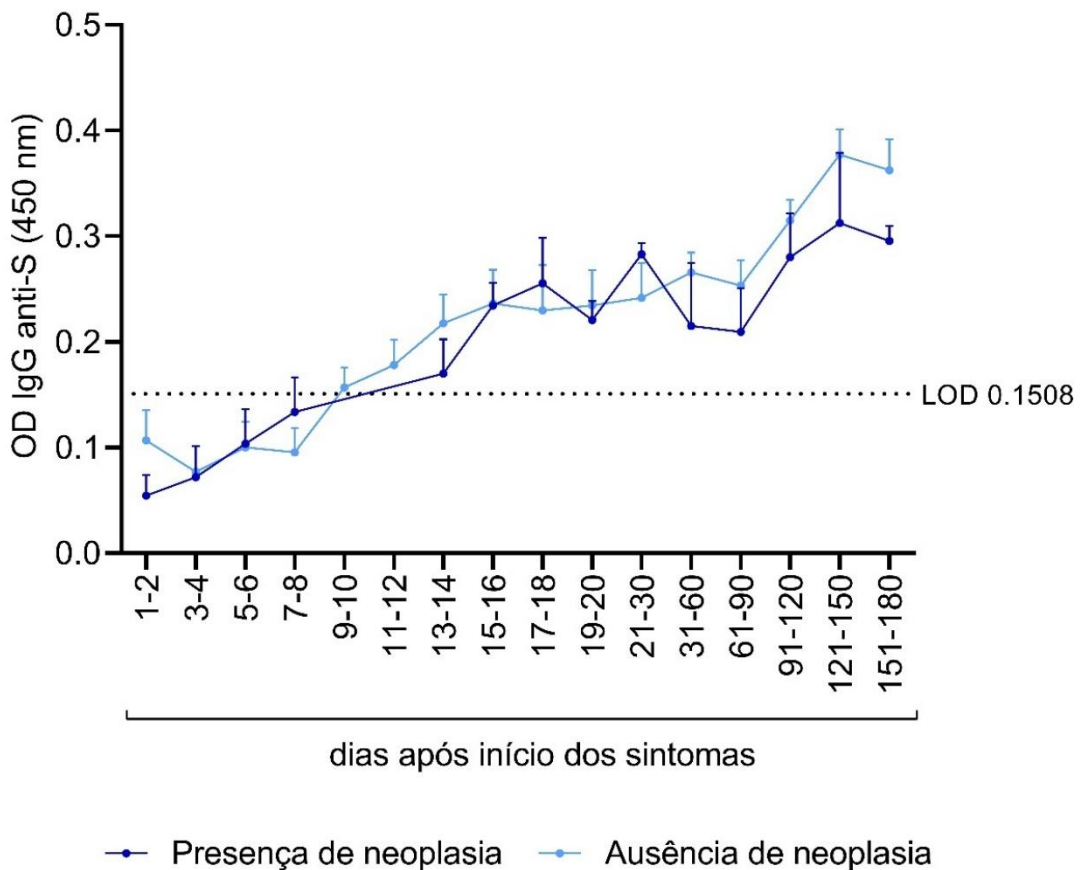
Não houve diferença estatística ao avaliar o título de anticorpos do tipo IgM entre os pacientes RT-qPCR positivos neoplásicos e não neoplásicos, conforme apresentado no gráfico 25.

Gráfico 25: Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgM de pacientes RT-qPCR positivos neoplásicos e não neoplásicos acompanhados durante seis meses após o início de sintomas. O traçado azul escuro com pontos representa a mediana e o erro padrão médio da OD dos pacientes neoplásicos durante 180 dias de acompanhamento. O traçado azul claro com pontos representa a mediana e o erro padrão médio dos pacientes não neoplásicos durante o mesmo período avaliado. O limite de detecção de 0,3500 é representado pela linha tracejada.



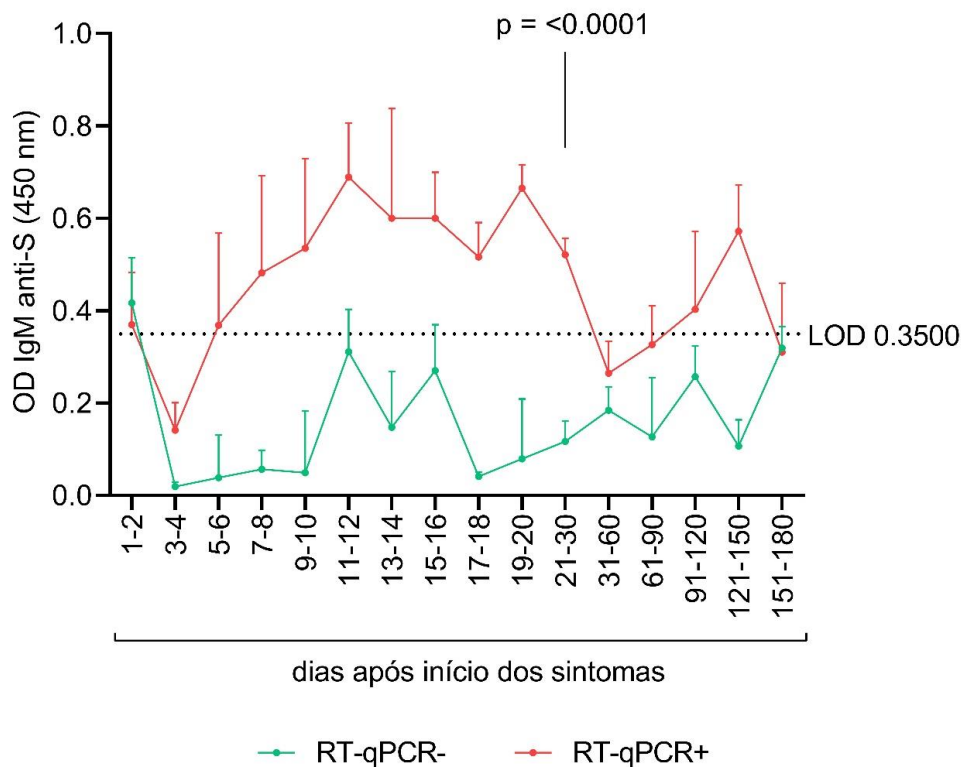
Também não houve diferença estatística ao avaliar o título de anticorpos do tipo IgG entre os pacientes RT-qPCR positivos neoplásicos e não neoplásicos, conforme apresentado no gráfico 26.

Gráfico 26: Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgG de pacientes RT-qPCR positivos neoplásicos e não neoplásicos acompanhados durante seis meses após o início de sintomas. O traçado azul escuro com pontos representa a mediana e o erro padrão médio da OD dos pacientes neoplásicos durante 180 dias de acompanhamento. O traçado azul claro com pontos representa a mediana e o erro padrão médio dos pacientes não neoplásicos durante o mesmo período avaliado. O limite de detecção de 0,1508 é representado pela linha tracejada.



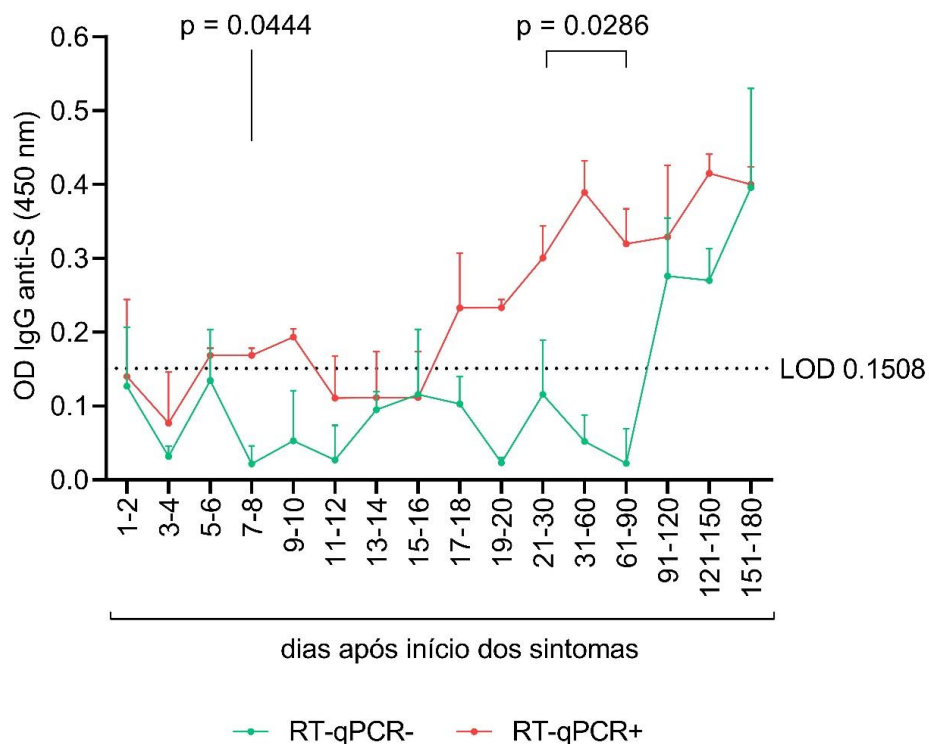
Ao avaliar a cronologia de anticorpos do tipo IgM dos pacientes que apresentaram COVID-19 grave com a necessidade de uma internação em centro de tratamento intensivo, foi possível observar uma diferença significativa ($p = <0.0001$) apenas no período de 21 a 30 dias após início de sintomas em comparação com os pacientes RT-qPCR negativos e positivos (gráfico 27).

Gráfico 27: Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgM de pacientes que apresentaram a forma grave da doença RT-qPCR negativos e positivos para COVID-19 após internação hospitalar em centros de tratamento intensivo acompanhados durante seis meses após o início dos sintomas. O traçado vermelho com pontos representa a mediana e o erro padrão médio da OD dos pacientes RT-qPCR positivos durante 180 dias de acompanhamento. O traçado verde com pontos representa a mediana e o erro padrão médio dos pacientes RT-qPCR negativos durante o mesmo período avaliado. O limite de detecção de 0,3500 é representado pela linha tracejada. A diferença estatística de Mann-Whitney e ANOVA com níveis de significância $p < 0,05$ é apresentada entre os grupos.



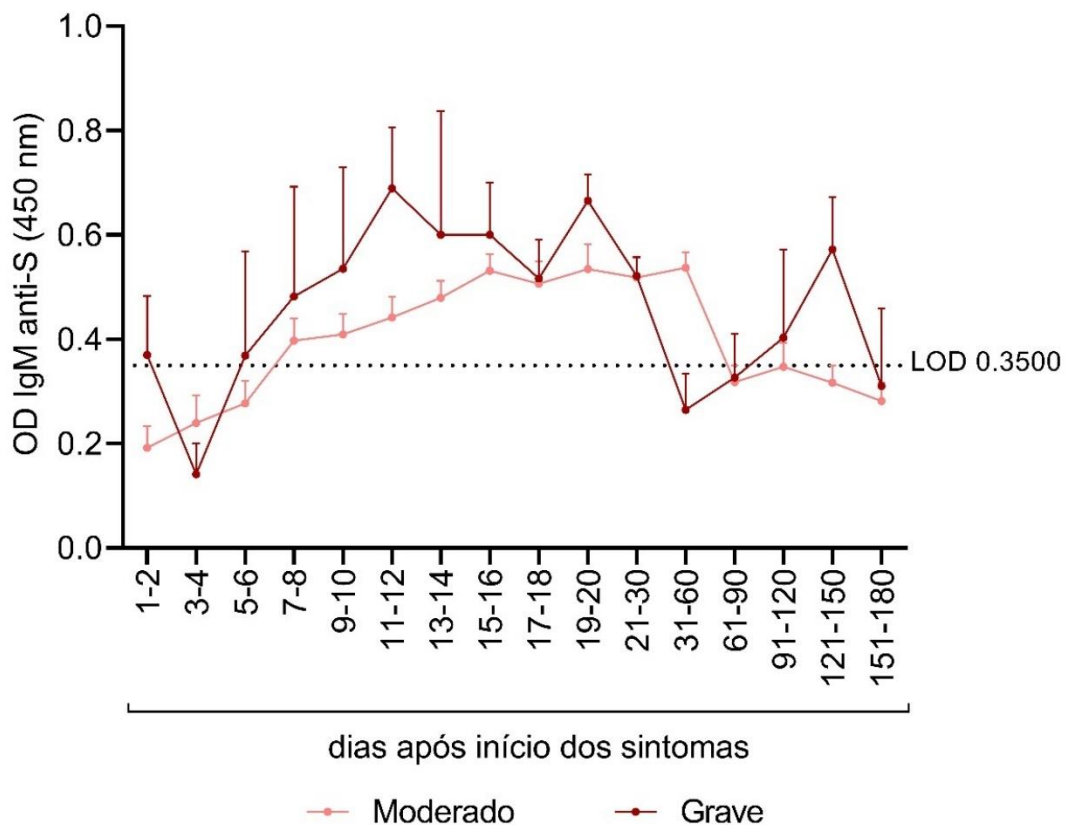
Sobre a avaliação de anticorpos do tipo IgG de pacientes que desenvolveram a forma grave da doença, observou-se uma diferença significativa ($p = 0.0444$) a partir de 7 dias após início de sintomas e entre 21 e 90 dias em comparação com os pacientes RT-qPCR negativos e positivos ($p = 0.0286$) (gráfico 28).

Gráfico 28: Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgG de pacientes que apresentaram a forma grave da doença RT-qPCR negativos e positivos para COVID-19 após internação hospitalar em centros de tratamento intensivo acompanhados durante seis meses após o início de sintomas. O traçado vermelho com pontos representa a mediana e o erro padrão médio dos pacientes RT-qPCR positivos durante 180 dias de acompanhamento. O traçado verde com pontos representa a mediana e o erro padrão médio dos pacientes RT-qPCR negativos durante o mesmo período avaliado. O limite de detecção de 0,1508 é representado pela linha tracejada. A diferença estatística de Mann-Whitney e ANOVA com níveis de significância $p < 0,05$ é apresentada entre os grupos.



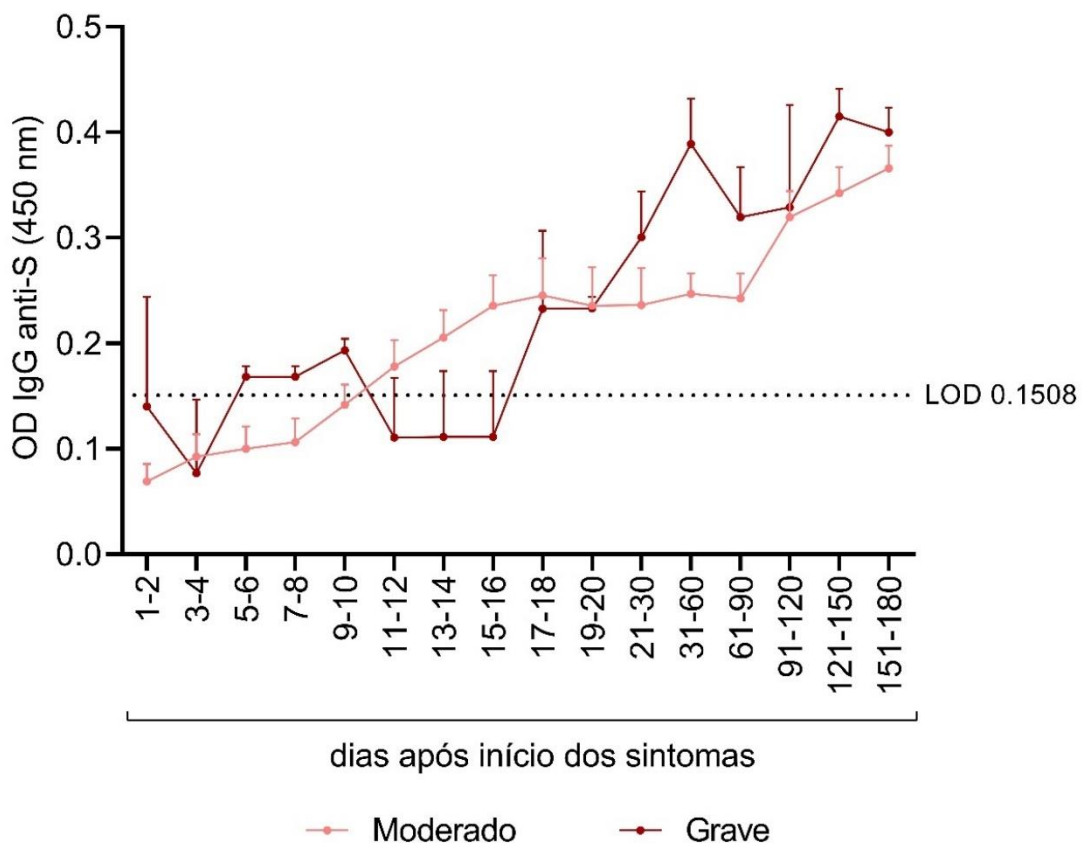
Não houve diferença estatística ao avaliar o título de anticorpos do tipo IgM entre os pacientes RT-qPCR positivos que apresentaram a forma moderada e grave de COVID-19, conforme apresentado no gráfico 29.

Gráfico 29: Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgM de pacientes RT-qPCR positivos que apresentaram a forma moderada e grave de COVID-19 acompanhados durante seis meses após o início de sintomas. O traçado bege com pontos representa a mediana e o erro padrão médio da OD dos pacientes que apresentaram a forma moderada da doença durante 180 dias de acompanhamento. O traçado vermelho com pontos representa a mediana e o erro padrão médio dos pacientes que desenvolveram a forma grave de COVID-19 durante o mesmo período avaliado. O limite de detecção de 0,3500 é representado pela linha tracejada.



Também não houve diferença estatística ao avaliar o título de anticorpos do tipo IgG entre os pacientes RT-qPCR positivos que apresentaram a forma moderada e grave de COVID-19, conforme apresentado no gráfico 30.

Gráfico 30: Perfil longitudinal de anticorpos do tipo IgG de pacientes RT-qPCR positivos que apresentaram a forma moderada e grave de COVID-19 acompanhados durante seis meses após o início de sintomas. O traçado bege com pontos representa a mediana e o erro padrão médio da OD dos pacientes que apresentaram a forma moderada da doença durante 180 dias de acompanhamento. O traçado vermelho com pontos representa a mediana e o erro padrão médio dos pacientes que desenvolveram a forma grave de COVID-19 durante o mesmo período avaliado. O limite de detecção de 0,1508 é representado pela linha tracejada.



5.5 Anticorpos neutralizantes (nAbs) contra SARS-CoV-2

Para a análise de anticorpos neutralizantes contra SARS-CoV-2 utilizou-se o kit comercial ECO F COVID nAb (ECO Diagnóstica), na identificação de nAbs para a cepa de referência identificada em Wuhan e as variantes Alpha, Gamma e Beta.

A detecção ocorreu em dois grupos: O grupo “V1” detectou nAbs para cepas de Wuhan (cepa de referência) e para a variante Alpha. O grupo “V2” detectou nAbs para as variantes Gamma e Beta.

Verificou-se que dentre os pacientes RT-qPCR detectáveis, conforme apresentado no gráfico 31 e tabela 4, grande maioria dos pacientes (65,5%) apresentaram anticorpos neutralizantes tanto para o grupo V1 quanto para V2. Entretanto, vinte e três dos pacientes RT-qPCR positivos não apresentaram anticorpos neutralizantes para nenhuma variante avaliada.

Sobre os pacientes RT-qPCR negativos, grande maioria não apresentou anticorpos neutralizantes (95,8%). Entretanto, um paciente (2%) foi reagente apenas para o grupo V1 e um paciente apresentou reatividade para os dois grupos de variantes avaliados (2%).

A diferença dos anticorpos neutralizantes entre os grupos V1 e V2 entre os pacientes positivos e negativos para a RT-qPCR, foi significativamente estatística ($p < 0,0001$).

Ainda, ao realizar a correlação de Spearman, verificou-se que indivíduos RT-qPCR positivos que apresentaram altos níveis de anticorpos IgG pelo ELISA, também apresentaram altos níveis de anticorpos neutralizantes para a cepa de referência (Wuhan) e a variante Alpha com uma diferença significativamente estatística ($p < 0,0001$) (gráfico 32). A correlação entre altos níveis de anticorpos IgG detectados pelo ELISA e a presença de nAbs frente as variantes Gamma e Beta também foi observada entre os pacientes RT-qPCR positivos, com uma diferença significativamente estatística ($p < 0,0001$) (gráfico 33).

Gráfico 31: Anticorpos neutralizantes (nAbs) contra SARS-CoV-2 de pacientes RT-qPCR detectável e não detectável. Anticorpos neutralizantes de variantes do grupo V1: Wuhan (Cepa de referência) e Alpha; Anticorpos neutralizantes de variantes do grupo V2: Gamma e Beta. Kit comercial ECO F COVID nAb (ECO Diagnóstica). A mediana da porcentagem de nAbs de pacientes RT-qPCR positivos é representada pelas barras vermelhas. Os pontos representam as amostras individuais de cada paciente avaliado. O limite de detecção de 20 é representado pela linha tracejada. A diferença estatística de Mann-Whitney e ANOVA com níveis de significância $p < 0,05$ é apresentada entre os grupos.

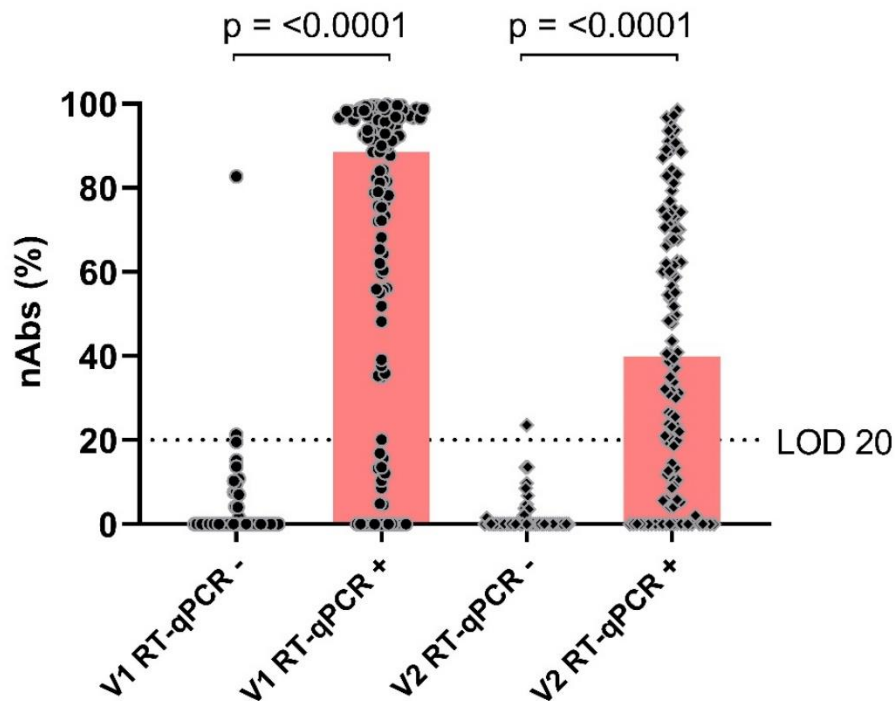


Tabela 4: Tabela complementar de anticorpos neutralizantes (nAbs) contra SARS-CoV-2 de pacientes RT-qPCR detectável e não detectável. Anticorpos neutralizantes de variantes do grupo V1: Wuhan (Cepa de referência) e Alpha; Anticorpos neutralizantes de variantes do grupo V2: Gamma e Beta. Kit comercial ECO F COVID nAb (ECO Diagnóstica).

Pacientes	Nº de pacientes analisados	Dias pós início de sintomas	nAbs (V1) n (%)	nAbs (V2) n (%)	nAbs V1 e V2 n (%)	nAbs não detectáveis n (%)
RT-qPCR DETECTÁVEL	122		18 (14,7)	1 (0,8)	80 (65,5)	23 (18,8)
RT-qPCR NÃO DETECTÁVEL	48	>15 dias	1 (2,0)	0	1 (2,0)	46 (95,8)

Gráfico 32: Correlação de Spearman entre o título de anticorpos IgG anti-S de pacientes RT-qPCR positivos detectados por ELISA e anticorpos neutralizantes frente a cepa de Wuhan (referência) e variante Alpha. Os pontos representam as amostras individuais de cada paciente avaliado. O limite de detecção do ELISA IgG anti-S de 0,1508 é representado pela linha tracejada no eixo x. O limite de detecção do teste nAbs (ECO Diagnóstica) de 20 é representado pela linha tracejada no eixo y.

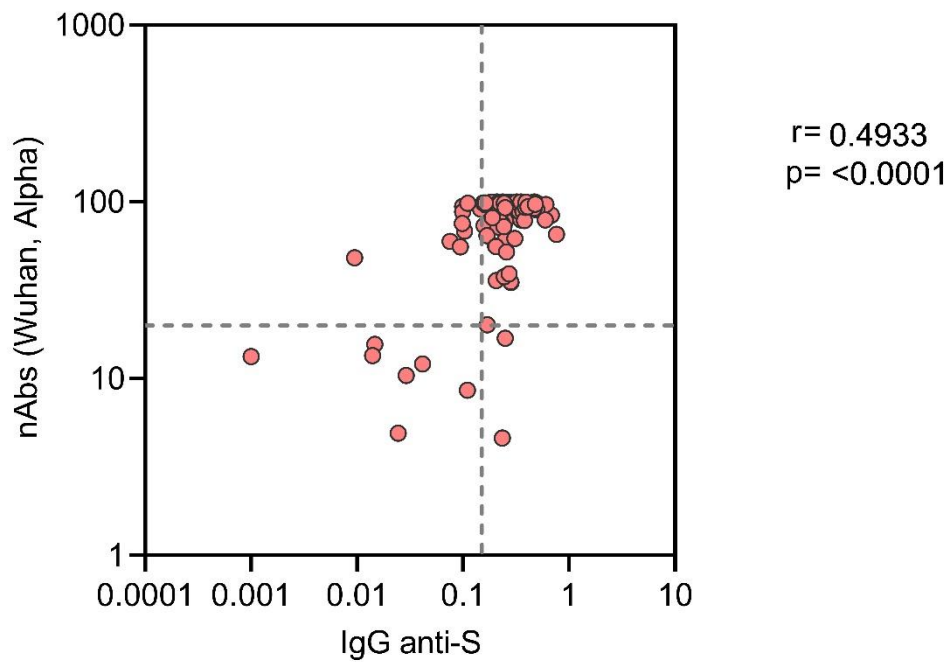
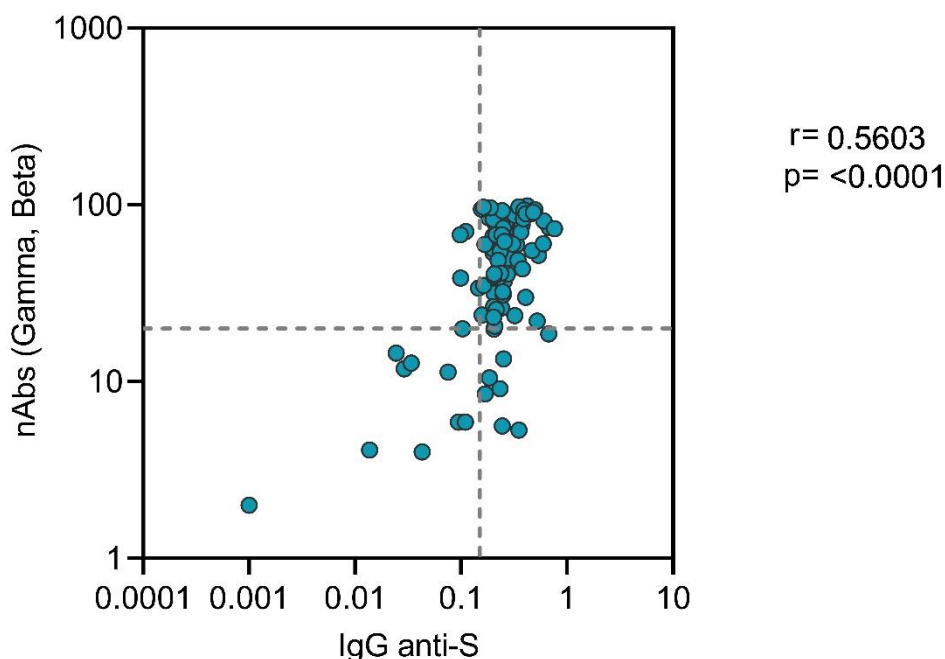


Gráfico 33: Correlação de Spearman entre o título de anticorpos IgG anti-S de pacientes RT-qPCR positivos detectados por ELISA e anticorpos neutralizantes frente as variantes Gamma e Beta. Os pontos representam as amostras individuais de cada paciente avaliado. O limite de detecção do ELISA IgG anti-S de 0,1508 é representado pela linha tracejada no eixo x. O limite de detecção do teste nAbs (ECO Diagnóstica) de 20 é representado pela linha tracejada no eixo y.



5.6 Avaliação do desempenho de testes rápidos IgM/IgG anti-SARS-CoV-2 disponíveis para uso no Brasil

Avaliou-se a acurácia diagnóstica dos seguintes testes rápidos imunocromatográficos indiretos disponíveis para uso no Brasil: COVID-19 Ab Plus ECO Teste IgM/IgG, ECO Diagnóstica; TR DPP® COVID-19 IgM/IgG, Bio-Manguinhos; Celer Finecare SARS-CoV-2 Anticorpo RBD Test e Wondfo 2019-nCoV RBD Antibody Rapid Test.

A acurácia foi determinada de forma geral, dias de sintomas (para COVID-19 Ab Plus ECO Teste IgM/IgG, ECO Diagnóstica) e também em relação a faixas etárias (1-30, 31-60, 61-80 e acima de 81 anos de idade), conforme apresentado na tabela 5.

Para COVID-19 Ab Plus ECO Teste IgM/IgG, ECO Diagnóstica, ao avaliar a acurácia diagnóstica geral com amostras de soro coletadas entre 5 e 15 e acima de 15 dias pós início de sintomas, observou-se uma melhor sensibilidade (84,06% (76,86-89,73)), especificidade (90,12% (81,46-95,64)) e acurácia (86,30% (81,03-90,56)) do teste com amostras coletadas acima de 15 dias do aparecimento dos sintomas. Em relação acurácia dentre as faixas etárias avaliadas, o grupo de 1-30 anos, tanto com amostras de 5-15 dias quanto >15 dias, apresentou uma melhor acurácia diagnóstica e concordância Kappa quase perfeita.

Para TR DPP® COVID-19 IgM/IgG, Bio-Manguinhos ao avaliar amostras coletadas a partir de 15 dias pós início de sintomas, o teste apresentou uma concordância Kappa moderada, apresentando uma acurácia de 76,36% (71,40-80,84). Em relação a faixa etária, mais uma vez a avaliação de amostras do grupo de 1-30 anos apresentou uma maior acurácia diagnóstica (92,31% (63,97-99,81)) e concordância Kappa substancial.

Na avaliação do teste Celer Finecare SARS-CoV-2 Anticorpo RBD Test, em relação aos outros testes avaliados, ele obteve uma baixa sensibilidade (31,25% (22,18-41,52)) na detecção de anticorpos anti SARS-CoV-2 e consequentemente uma baixa acurácia diagnóstica geral (53,79% (45,33-62,10)). Em relação as faixas etárias, apesar da faixa de 1-30 ter apresentado uma concordância Kappa quase perfeita, as faixas etárias de 31-60 e >81 anos apresentaram baixa sensibilidade no teste (35,85% (23,14-50,2) e 18,18% (2,28-51,78) respectivamente) e uma concordância Kappa ruim.

Sobre o teste rápido Wondfo 2019-nCoV RBD Antibody Rapid Test., em comparação aos demais ensaios avaliados, apresentou uma maior sensibilidade (96% (79,65-99,9)), especificidade (100% (86,28-100)) e acurácia diagnóstica geral (98% (89,35-99,95)), apresentando uma concordância Kappa quase perfeita, tanto quanto em relação as faixas etárias avaliadas.

Tabela 5: Avaliação do desempenho de testes rápidos IgM/IgG anti-SARS-CoV-2 disponíveis para uso no Brasil.

COVID-19 Ab Plus ECO Teste IgM/IgG	n	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	Acurácia	Índice Kappa	Concordância Kappa
Dias pós início de sintomas (5-15)	110							
Geral		77,78 (57,74-91,38)	65,48 (54,31-75,52)	42 (33,63-50,85)	90,16 (81,65-94,97)	68,47 (58,96-76,96)	0,336	Razoável
Idade								
1-30 anos	4	100 (2,50-100)	100 (29,24-100)	100	100	100 (39,76-100)	1	Quase perfeita
31-60 anos	57	84,62 (54,55-98,08)	61,36 (45,50-75,64)	39,29 (29,44-50,08)	93,1 (78,69-98,01)	66,67 (52,94-78,6)	0,327	Razoável
61-80 anos	44	75 (42,81-94,51)	71,88 (53,25-86,25)	50 (34,46-65,54)	88,46 (73,75-95,44)	72,73 (57,21-85,04)	0,405	Razoável
>81 anos	5	100 (2,50-100)	50 (6,76-93,24)	33,33 (15,80-57,12)	100	60 (14,66-94,73)	0,286	Razoável
Dias pós início de sintomas (>15)	n							
Geral		84,06 (76,86-89,73)	90,12 (81,46-95,64)	93,55 (88,21-96,56)	76,84 (69,20-83,05)	86,30 (81,03-90,56)	0,716	Substancial
Idade	219							
1-30 anos	9	100 (2,50-100)	100 (63,06-100)	100	100	100 (66,37-100)	1	Quase perfeita
31-60 anos	109	84,72 (74,31-92,12)	83,78 (67,99-93,81)	91,04 (82,92-95,51)	73,81 (61,63-83,18)	84,4 (76,21-90,64)	0,663	Substancial
61-80 anos	81	82,69 (69,67-91,77)	96,55 (82,24-99,91)	97,73 (86,19-99,66)	75,68 (63,11-84,98)	87,65 (78,47-93,92)	0,747	Substancial
>81 anos	20	84,62 (54,55-98,08)	85,71 (42,13-99,64)	91,67 (63,84-98,56)	75 (44,73-91,75)	85 (62,11-96,79)	0,681	Substancial
TR DPP® COVID-19 IgM/IgG Bio-Manguinhos	n	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	Acurácia	Índice Kappa	Concordância Kappa
Dias pós início de sintomas (>15)	329							
Geral		80,61 (73,74-86,34)	72,12 (64,62-78,81)	74,3 (69,11-78,89)	78,81 (72,87-83,73)	76,36 (71,40-80,84)	0,527	Moderada
Idade								
1-30 anos	13	50 (1,26-98,74)	100 (71,51-100)	100	91,67 (73,34-97,78)	92,31 (63,97-99,81)	0,629	Substancial
31-60 anos	166	83,53 (73,91-90,69)	67,9 (56,6-77,85)	73,2 (66,24-79,17)	79,71 (70,4-86,64)	75,9 (68,67-82,19)	0,516	Moderada
61-80 anos	125	76,56 (64,31-86,25)	72,13 (59,17-82,85)	74,24 (65,31-81,52)	74,58 (64,72-82,43)	74,4 (65,82-81,78)	0,487	Moderada
>81 anos	25	85,71 (57,19-98,22)	72,73 (39,03-93,98)	80 (59,82-91,49)	80 (1,33-93,82)	80 (59,30-93,17)	0,59	Moderada

Celer Finecare SARS-CoV-2 Anticorpo RBD Test		n	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	Acurácia	Índice Kappa	Concordância Kappa
Dias pós início de sintomas (>15)		131							
Geral			31,25 (22,18-41,52)	97,96 (89,15-99,95)	96,77 (80,83-99,53)	42,11 (38,72-45,57)	53,79 (45,33-62,10)	0,22	Razoável
Idade									
	1-30 anos	5	100 (2,50-100)	100 (39,76-100)	100	100	100 (47,82-100)	1	Quase perfeita
	31-60 anos	61	35,85 (23,14-50,2)	100 (63,06-100)	100	19,05 (16,14-22,35)	44,26 (31,55-57,55)	0,128	Ruim
	61-80 anos	51	25,81 (11,86-44,61)	100 (83,16-100)	100	46,51 (41,40-51,7)	54,9 (40,34-68,87)	0,214	Razoável
	>81 anos	14	18,18 (2,28-51,78)	100 (29,24-100)	100	25 (20,15-30,58)	35,71 (12,76-64,86)	0,087	Ruim
Wondfo 2019-nCoV RBD Antibody Rapid Test		n	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	Acurácia	Índice Kappa	Concordância Kappa
Dias pós início de sintomas (>15)		49							
Geral			96 (79,65-99,9)	100 (86,28-100)	100	96,15 (78,56-99,42)	98 (89,35-99,95)	0,96	Quase perfeita
Idade									
	1-30 anos	3	100 (2,50-100)	100 (15,81-100)	100	100	100 (29,24-100)	1	Quase perfeita
	31-60 anos	25	94,12 (71,31-99,85)	100 (63,06-100)	100	88,89 (54,44-98,17)	96 (79,65-99,9)	0,911	Quase perfeita
	61-80 anos	21	100 (59,04-100)	100 (76,84-100)	100	100	100 (83,89-100)	1	Quase perfeita

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

5.7 Avaliação da resposta celular desenvolvida

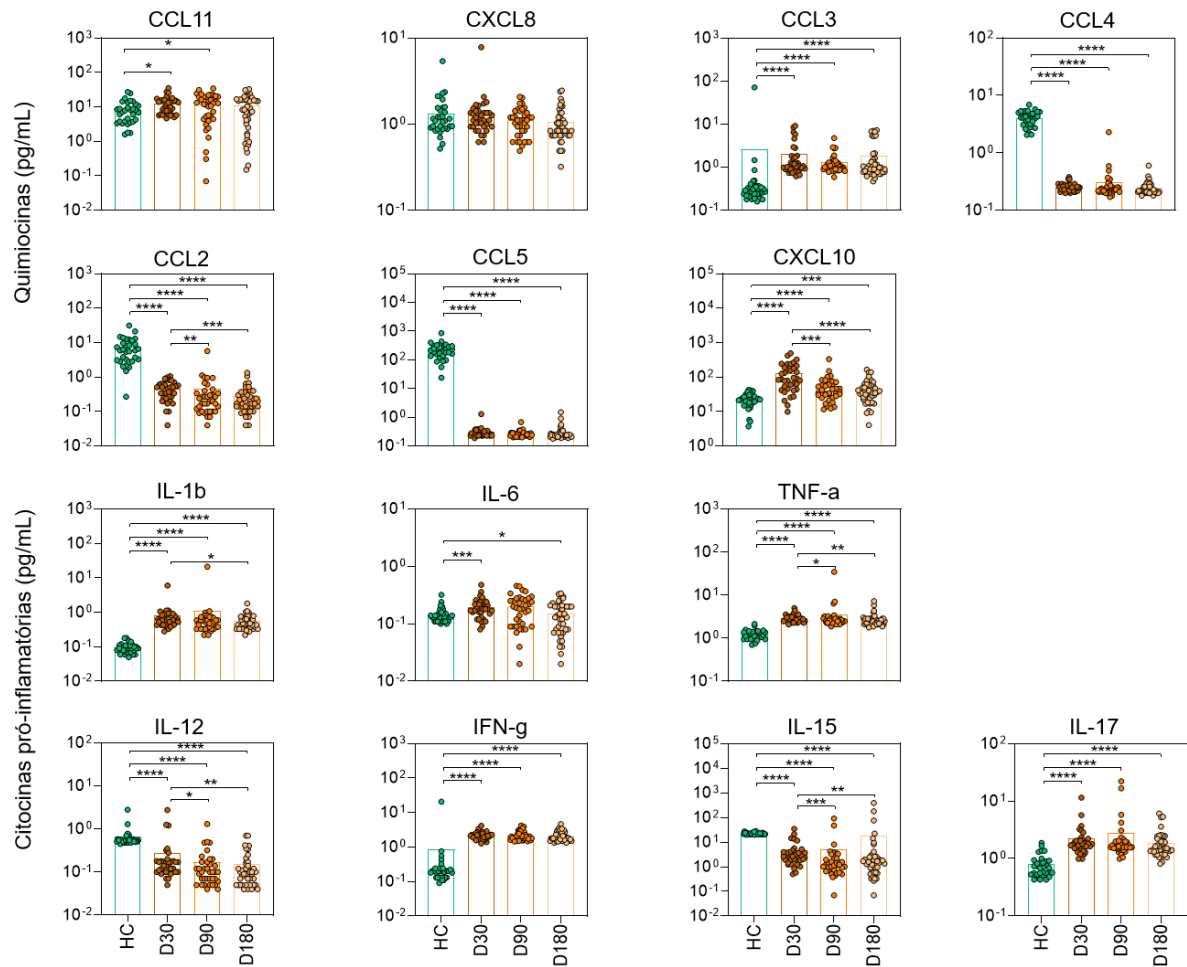
Ao realizar a quantificação dos biomarcadores solúveis sistêmicos através do Luminex Bio-Plex Pro™ human cytokines em amostras de soro de pacientes COVID-19 positivos nos tempos 30, 90 e 180 dias após o início dos sintomas, verificou-se que dentre os biomarcadores avaliados de uma maneira geral, pode-se observar uma diferença importante entre o grupo controle e os pacientes COVID-19 positivos, sendo que os mediadores CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, IL-12, IL-15, IL-1Ra e PDGF encontraram-se mais elevados nos pacientes saudáveis, ao passo que os mediadores CCL11, CXCL10, IL-1b, IL-6, TNF-a, IFN-g, IL-17, IL-9, IL-10, IL-13, FGF-basic, G-CSF, GM-CSF, IL-7 e IL-2 estiveram aumentados nos pacientes COVID-19 positivos, como demonstrado na figura 16.

Em relação a cinética dos biomarcadores avaliados dentre os pacientes COVID-19 positivos, foi observada a redução da grande maioria dos mediadores solúveis desde o primeiro tempo avaliado após a infecção aguda pelo SARS-CoV-2 até 180 dias após o início de sintomas, com exceção de CCL11, CXCL8, CCL3, CCL4, CCL5, IL-6, IFN-g, IL-17, IL-5, FGF-basic, PDGF, VEGF, G-CSF e GM-CSF.

Ao determinar o perfil dos mediadores solúveis nos tempos avaliados dentre os pacientes COVID-19 positivos que foram admitidos no hospital na primeira e após uma semana do início de sintomas, verificou-se que não houve diferença estatística significativa tendo como referência os dias de sintomas no momento da internação em nenhum dos três tempos avaliados. A figura 17 representa o tempo de 30 dias após o início de sintomas.

Ao estabelecer a assinatura geral de mediadores solúveis séricos após infecção aguda por SARS-CoV-2, verificou-se que a grande maioria dos pacientes apresentaram níveis de biomarcadores acima da mediana global após 30 dias do início de sintomas, ao passo que esses níveis se mostraram reduzidos em relação a mediana global após seis meses da infecção e início de sintomas e internação hospitalar, como demonstrado na figura 18.

Figura 16: Cinética de mediadores solúveis séricos após infecção aguda por SARS-CoV-2 entre os tempos 30 (D30), 90 (D90) e 180 dias (D180) após o início de sintomas em comparação ao grupo controle de indivíduos saudáveis (HC). A diferença estatística de Mann-Whitney e ANOVA com níveis de significância $p < 0,05$ é apresentada entre os grupos.



Continuação da figura 16: Cinética de mediadores solúveis séricos após infecção aguda por SARS-CoV-2 entre os tempos 30 (D30), 90 (D90) e 180 dias (D180) após o início de sintomas em comparação ao grupo controle de indivíduos saudáveis (HC). A diferença estatística de Mann-Whitney e ANOVA com níveis de significância $p < 0,05$ é apresentada entre os grupos.

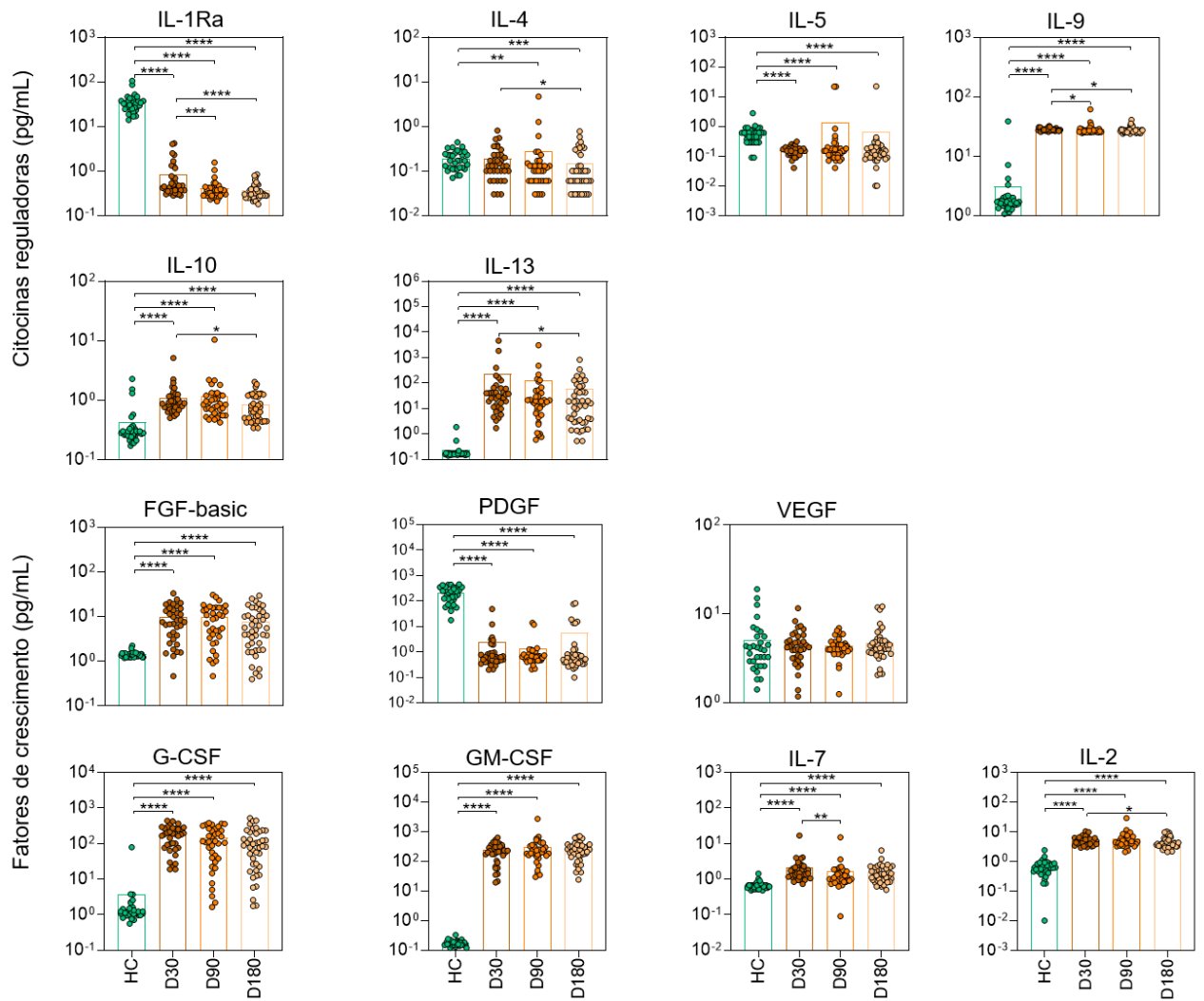
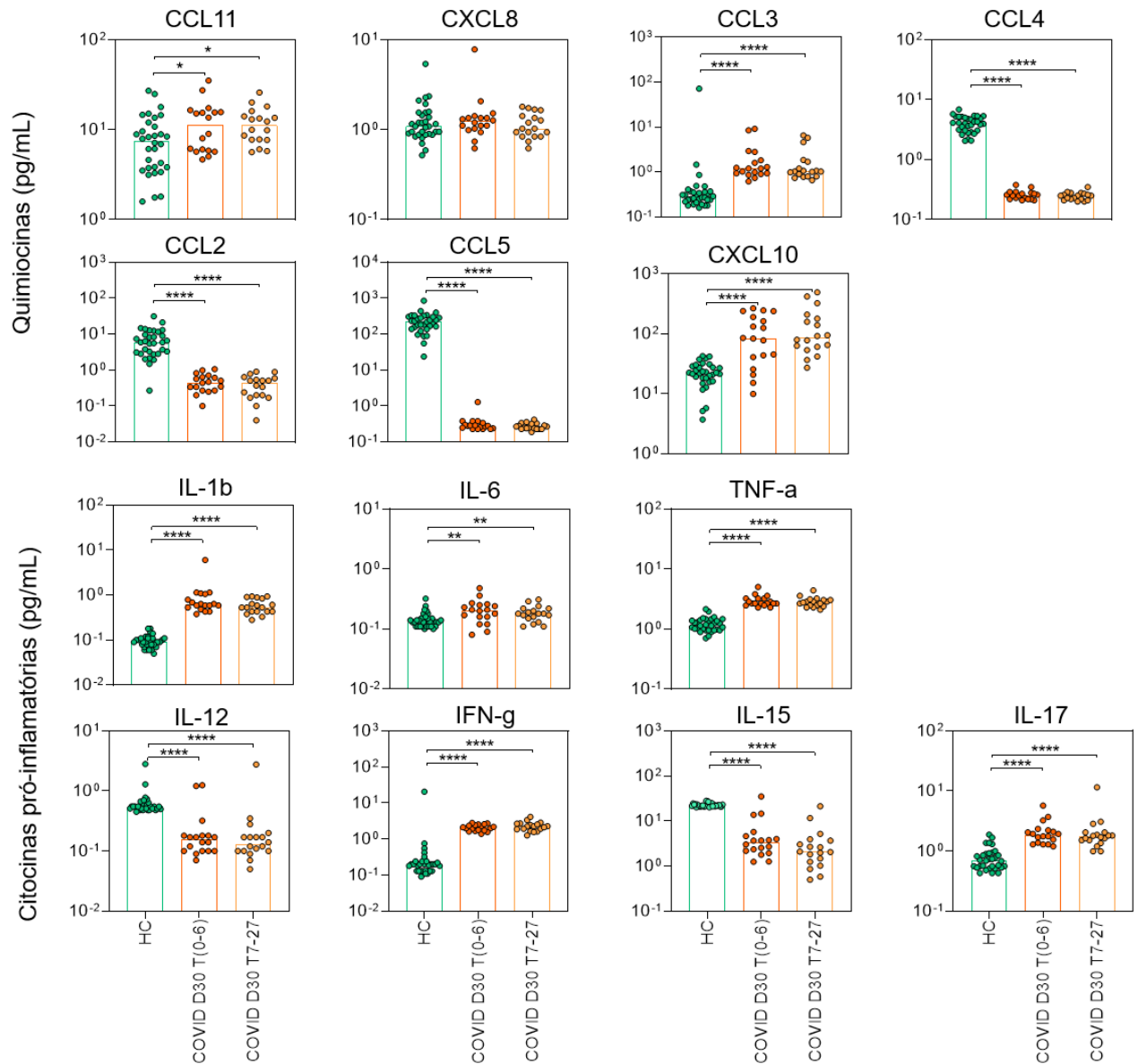


Figura 17: Perfil de mediadores solúveis séricos após infecção aguda por SARS-CoV-2 entre indivíduos que foram admitidos e internados no hospital até a primeira semana (COVID D30 T(0-6)) e entre 7 e 27 dias após o início dos sintomas (COVID D30 T7-27), com amostras coletadas após 30 dias após a infecção em comparação com indivíduos saudáveis (HC). A diferença estatística de Mann-Whitney e ANOVA com níveis de significância $p < 0,05$ é apresentada entre os grupos.



Continuação da figura 17: Perfil de mediadores solúveis séricos após infecção aguda por SARS-CoV-2 entre indivíduos que foram admitidos e internados no hospital até a primeira semana (COVID D30 T(0-6)) e entre 7 e 27 dias após o início dos sintomas (COVID D30 T7-27), com amostras coletadas após 30 dias após a infecção em comparação com indivíduos saudáveis (HC). A diferença estatística de Mann-Whitney e ANOVA com níveis de significância $p < 0,05$ é apresentada entre os grupos.

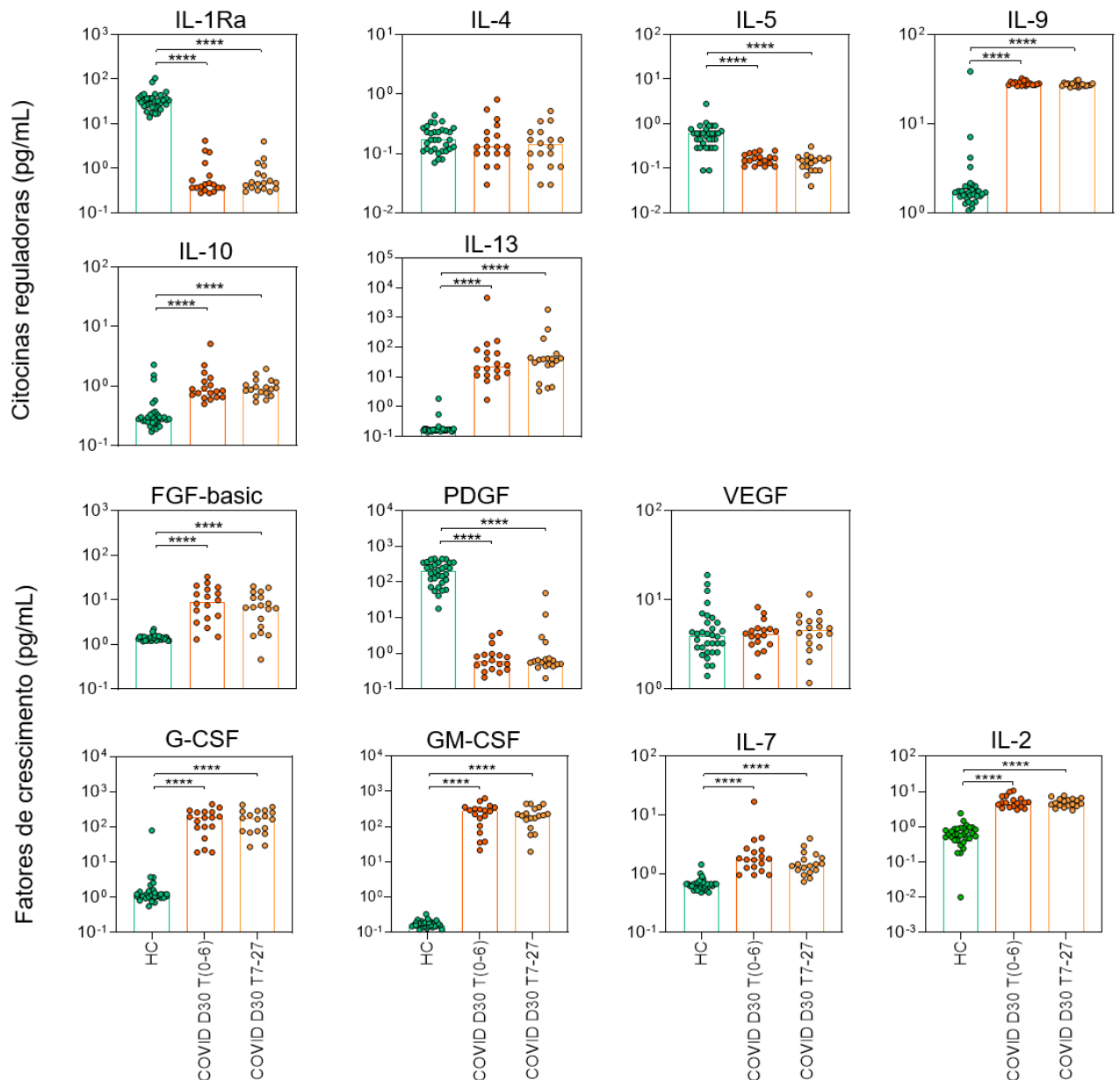
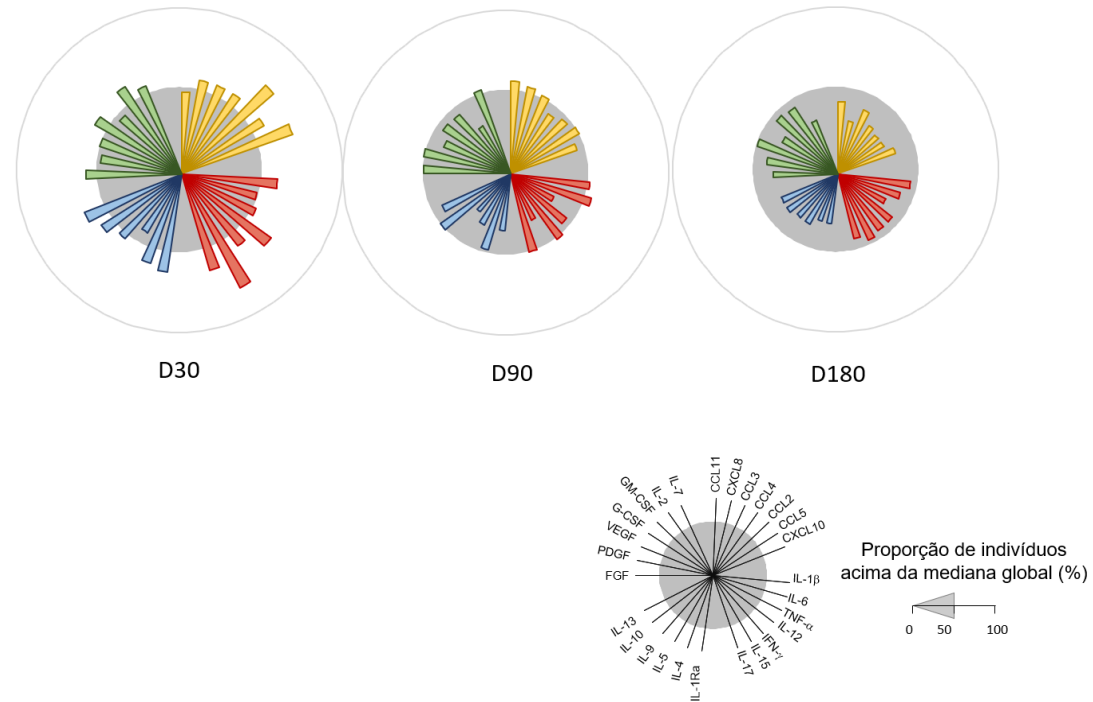


Figura 18: Assinatura geral de mediadores solúveis séricos após infecção aguda por SARS-CoV-2 entre os tempos 30, 90 e 180 dias após o início de sintomas em relação a mediana global.



Fonte: O autor.

6 DISCUSSÃO

Os pacientes deste estudo apresentaram um total de 18 comorbidades, sendo a hipertensão, doença renal crônica, diabetes e câncer as mais comuns.

Desde o início da pandemia de COVID-19 em 2020, percebeu-se que algumas comorbidades pré-existente em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 estavam envolvidas em um maior risco e pior prognóstico da doença, como a hipertensão, diabetes, doença renal crônica e doenças cardiovasculares (FANG et al., 2020).

Cinquenta e sete por cento dos pacientes infectados deste estudo eram hipertensos, sendo a comorbidade mais prevalente observada neste grupo. Sabe-se que a prevalência desta comorbidade entre os indivíduos infectados é maior, inclusive nos pacientes que apresentam sintomas mais severos no percurso da doença.

A relação entre a hipertensão e a COVID-19 pode ser explicada pelo uso da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) como receptor para a entrada do SARS-CoV-2 na célula hospedeira (HOFFMANN et al., 2020; ZHOU et al., 2020). A ACE2 faz parte do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e regula a vasodilatação e vasoconstrição, desempenhando, portanto, um papel essencial na patogênese da hipertensão. Em formas graves de COVID-19 em pacientes com esta comorbidade, os níveis sanguíneos de angiotensina II são elevados e correlacionados com a pressão arterial diastólica (CATT, et al., 1971). A angiotensina II é um mediador essencial da inflamação tecidual por permitir o aumento da permeabilidade vascular, recrutamento de células inflamatórias e estresse oxidativo (SUZUKI et al., 2003; BENIGNI et al., 2010). Além disso, a angiotensina II pode acarretar uma função pulmonar prejudicada (IMAI et al., 2005).

No início da pandemia, após a realização de alguns estudos, sugeriu-se que o uso de inibidores do sistema renina-angiotensina-aldosterona, como inibidores da enzima conversora de angiotensina e bloqueadores dos receptores da angiotensina II, poderiam ser prejudiciais nos pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, sugerindo um aumento compensatório do ACE2 (SUN et al., 2020; FERRARIO et al., 2005; OCARANZA et al., 2006). No entanto, estudos realizados posteriormente não sugeriram um efeito significativo sobre a enzima conversora de angiotensina 2 por

estes inibidores associados a gravidade da COVID-19 (VADUGANATHAN et al., 2020; DANSER et al., 2020).

Embora teoricamente a alta expressão de ACE2 possa sugerir altas chances de infecção pelo vírus, também é importante ressaltar que a entrada viral requer também a degradação proteolítica por TMPRSS2 (HOFFMANN et al., 2020). Além disso, é importante evidenciar que, geralmente, pacientes que apresentam hipertensão são idosos, sedentários e podem apresentar outras comorbidades, como diabetes e obesidade. Portanto, a hipertensão propriamente dita pode não estar correlacionada com a COVID-19 grave, mas sim, associada a vários outros fatores que podem levar a um estágio crítico da doença (SANTOS et al., 2021).

Trinta e oito (23%) dos pacientes desta pesquisa com diagnóstico confirmado de COVID-19 apresentaram doença renal crônica. Pacientes com essa comorbidade possuem um maior risco de morte em relação aos outros pacientes, uma vez que níveis elevados de creatinina sérica basal ou nitrogênio ureico no sangue, estágio de lesão renal aguda, proteinúria ou hematúria são fatores de risco para mortalidade intra-hospitalar (CHENG et al., 2020). Portanto, em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, a lesão renal aguda é um preditor clínico grave e está associada a uma alta mortalidade (ALI et al., 2020; LIM et al., 2020). Com isso, a realização da diálise é uma ferramenta importante para o manejo desses pacientes (DIVISION OF NEPHROLOGY, 2020; ALBERICI et al., 2020).

Noventa e nove do total de pacientes deste estudo (30%), possuíam diabetes, sendo 53 pacientes RT-qPCR detectáveis e 46 não detectáveis. Além dos hipertensos, pacientes diabéticos também possuem um alto risco no desenvolvimento de sintomas mais severos de COVID-19 (WANG et al., 2020; GUO et al., 2020).

A diabetes é uma doença inflamatória crônica com múltiplas alterações metabólicas e vasculares que podem afetar a resposta do organismo de diversas formas. A hiperglicemia ocasionada e a resistência à insulina promovem uma maior síntese de produtos finais de glicação, citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo, além de estimularem uma maior produção de moléculas de adesão que medeiam a inflamação, o que implica em um maior risco no desenvolvimento de infecções, sendo, portanto, fato preocupante durante o percurso da COVID-19 (TORRES-TAMAYO, 2020).

Um total de 56 indivíduos (17%) deste estudo apresentaram algum tipo de neoplasia. Pacientes oncológicos também possuem um maior risco de complicações durante a COVID-19, o que pode estar relacionado com os tratamentos imunossupressores, que juntamente com outras características médicas coexistentes e fatores da patologia propriamente dita, deixam tais indivíduos mais fragilizados perante uma infecção pelo SARS-CoV-2 (ZHANG et al., 2020; CHAKRAVARTY et al., 2020). Sendo assim, estes pacientes podem apresentar sintomas mais severos durante o percurso da COVID-19, tendo conseqüentemente piores desfechos associados e uma maior mortalidade (DAI et al., 2020; MIYASHITA et al., 2020).

A interação entre o câncer e o sistema imunológico é complexa. A remodelação imune durante o crescimento tumoral compreende mudanças progressivas ocasionando um comprometimento de respostas das células T, disfunção e redução da capacidade de apresentação de antígenos das células dendríticas e conseqüentemente, enfraquecimento das respostas imunes perante a infecções bacterianas e virais (ALLEN et al., 2020). Dentre os piores resultados relatados entre pacientes oncológicos infectados pelo SARS-CoV-2, estão pacientes com uma maior carga tumoral, malignidades hematológicas, metastáticas, como também a presença de tumores pulmonares (DAI et al., 2020).

A patogênese da infecção pelo SARS-CoV-2 está intimamente ligada à apresentação clínica da doença. Os pacientes com diagnóstico confirmado de COVID-19 deste estudo apresentaram um perfil heterogêneo no desenvolvimento dos primeiros sintomas, sendo um total de 19 sintomas distintos relatados, sendo dispnéia, febre e tosse seca os mais observados.

Em um grande estudo realizado em 2020, em Wuhan, China, os sintomas mais prevalentes pós infecção relatados foram febre e tosse. Ainda, achados radiográficos como opacidade em vidro fosco e sombras irregulares bilaterais nos pulmões foram relatados em um número considerável de pacientes hospitalizados, com a maioria desses indivíduos com COVID-19 apresentando linfocitopenia (GUAN et al., 2020). Outro estudo também realizado na China, descreveu as principais apresentações clínicas de pacientes positivos, incluindo infecção do trato respiratório inferior com febre, tosse seca e dispnéia (ZHOU et al., 2020).

Dezoito por cento dos pacientes infectados do presente estudo relataram mialgia, 15,2% diarreia, 10,3% perda de olfato (anosmia), 9,7% cefaleia e 8,5% fadiga, sintomas os quais corroboram com estudos anteriores como o de BURKE e colaboradores (2020). Náuseas e vômitos, além de congestão e coriza também foram observados no grupo de estudo dos pacientes infectados por SARS-CoV-2, sendo estes presentes na lista de sintomas consistentes da COVID-19 descrita pelo CDC em 2021.

Ainda, em uma pesquisa realizada nos Estados Unidos com um total de 500.000 indivíduos através de uma plataforma online, perda de paladar ou olfato, febre e tosse foram preditores significativos de um resultado positivo de COVID-19 (ALLEN et al., 2020). Outro estudo o qual avaliou manifestações clínicas durante a COVID-19 em adultos, os sintomas mais prevalentes registrados nas consultas de atenção primária foram tosse (11,6%), febre (10,3%), mialgia (7,7%) e fadiga (5,9%). Distúrbios emocionais também foram avaliados, sendo ansiedade e depressão os mais comuns dentre a população estudada (15,9%) (MIZRAHI et al., 2020).

Consistente com a ampla gama de sintomas observados nos pacientes com diagnóstico confirmado de COVID-19 deste estudo, assim como em outras pesquisas realizadas, esta doença infecciosa pode afetar uma variedade de sistemas do corpo humano, além de causar problemas respiratórios (GUPTA et al., 2020). A título de exemplo, a COVID-19 pode levar a lesão renal aguda, principalmente em pacientes com sintomas respiratórios graves ou certas condições preexistentes, como a presença de comorbidades, aumentando o risco do desenvolvimento de uma glomerulopatia colapsante (VELEZ et al., 2020; HIRSCH et al., 2020).

A doença também pode causar complicações neurológicas, incluindo acidente vascular cerebral, convulsões e meningite (WU et al., 2020) além da ocorrência de outros eventos trombóticos, como embolia pulmonar e trombose venosa profunda (KLOK et al., 2020). O desenvolvimento dessas complicações durante o percurso da doença tem sido relacionado à coagulopatia, presença de anticorpos antifosfolípidos, níveis elevados de Dímero-D e produtos de degradação do fibrinogênio em pacientes falecidos (ZHANG et al., 2020; TANG et al., 2020).

Setenta (42,4%) dos pacientes com COVID-19 deste estudo durante o protocolo de tratamento, utilizaram oxigênio através de cânula nasal e 12 (7,3%) ventilação mecânica. Durante o percurso da COVID-19 nos pacientes que desenvolvem uma hipoxemia grave induzida pela síndrome do desconforto respiratório agudo, recomenda-se a oxigenoterapia suave, como cânula nasal de alto fluxo, pressão positiva contínua nas vias aéreas ou ventilação não invasiva (GATTINONI et al., 2020). Durante esta fase, a condição clínica desses pacientes pode permanecer a mesma por um período e melhorar com o decorrer do tempo, ou pode piorar repentinamente para um estágio mais grave da doença. Neste último caso, o resultado da síndrome do desconforto respiratório agudo é semelhante ao da pneumonia fibrinosa aguda e o paciente é encaminhado para um centro de terapia intensiva para a realização da ventilação mecânica, podendo acarretar sérios riscos de lesão pulmonar grave (COPIN et al., 2020).

Uma importante parcela dos indivíduos deste estudo apresentaram gravidade clínica e precisaram de um tratamento intensivo (em centros de tratamento intensivo, CTI), sendo 10,9% dos pacientes RT-qPCR não detectável e 19,4% dos pacientes RT-qPCR detectável. Sabe-se que internações em centros de tratamento intensivo por qualquer motivo médico estão associados a problemas de recuperação a longo prazo, incluindo deficiências físicas, problemas psicológicos e deficiências cognitivas (HERRIDGE et al., 2011; PANDHARIPANDE et al., 2013). Entretanto, é importante ressaltar que as sequelas pós COVID-19 não se restringem aos casos graves desta doença, pois sequelas pós infecção pelo SARS-CoV-2 são observadas em muitos casos sintomáticos de COVID-19 (NALBANDIAN et al., 2021).

Até o momento estudos estão sendo realizados para verificar se estes indivíduos que apresentam sequelas pós infecção apresentaram uma replicação viral mais longa em certos tecidos ou tinham condições clínicas pré-existentes que dificultaram sua recuperação pós COVID-19. Ainda, esses indivíduos podem apresentar um perfil de resposta imune adaptativa diferente anti-SARS-CoV-2, sendo esses questionamentos extremamente importantes em futuras pesquisas biomédicas (NALBANDIAN et al., 2021).

Estudos sobre a resposta imune frente a infecção por SARS-CoV e MERS-CoV, demonstraram que anticorpos específicos contra os vírus foram detectáveis em 80-

100% dos pacientes duas semanas após o início dos sintomas (CORMAN et al., 2016; LI et al., 2003; PARK et al., 2015).

Em um estudo realizado por HSUEH e colaboradores (2004) na avaliação da evolução cronológica de anticorpos IgM, IgA e IgG pós infecção por SARS-CoV a partir de ensaios de anticorpos imunofluorescentes, verificaram que a soroconversão para IgG ocorreu em uma média de 10 dias, simultaneamente ou um dia antes que IgM e IgA, que obtiveram uma média de soroconversão de 11 dias. Ainda, anticorpos do tipo IgG foram detectados a partir de 4 dias pós início de sintomas e persistiram em um alto nível por mais de três meses pós infecção. Entretanto, foi observado uma presença de níveis baixos de IgM e IgA em 100 dias após o início da doença, embora um estudo anterior tenha mostrado o desaparecimento de IgM após 12 semanas (PEIRIS et al., 2003). Pacientes deste estudo fizeram o tratamento com a utilização de alguns medicamentos, como a ribavirina, metilprednisolona e imunoglobulina intravenosa, além da ventilação mecânica após insuficiência respiratória. Entretanto, não houve diferenças significativas na cinética da resposta de IgM, IgA e IgG nestes pacientes em relação aos demais indivíduos quanto ao uso desses medicamentos.

Observações anteriores pós infecção por SARS-CoV sugeriram que o aumento de anticorpos IgG específicos contra o vírus se correlacionam com o agravamento clínico da doença no desenvolvimento da pneumonia (HSUEH et al., 2003; WANG et al., 2004; PEIRIS et al., 2003). No entanto, no estudo de HSUEH e colaboradores (2004), pacientes cuja condição pulmonar não era grave, tinham perfis de IgG semelhantes aos pacientes que posteriormente desenvolveram insuficiência respiratória grave necessitando da realização de um suporte ventilatório.

Diante do contexto pandêmico, é essencial um maior entendimento sobre os perfis de anticorpos pós infecção pelo SARS-CoV-2, visando compreender a gravidade da doença e avaliar a função imunológica a longo prazo.

No presente estudo, os pacientes RT-qPCR+ passaram a ter IgM detectáveis por ELISA a partir de 7 dias de sintomas, os quais apresentaram-se elevados com uma diferença significativa a partir de 13 dias ($p = 0.0274$), tendo seu título reduzido em até oito semanas ($p = 0.0148$).

Pacientes RT-qPCR+ passaram a ter IgG detectáveis por ELISA a partir de 9 dias do início de sintomas, apresentando títulos elevados a partir de 15 dias com uma diferença significativa ($p < 0.0152$) em comparação aos primeiros dias de infecção, e este anticorpo permaneceu detectável com uma diferença significativa ($p < 0.0001$) durante os seis meses de acompanhamento.

Ao avaliar separadamente a cronologia dos anticorpos IgM e IgG entre os pacientes RT-qPCR positivos por idade, gênero, presença ou não de neoplasia e por gravidade clínica da doença, foi observado perfis de anticorpos semelhantes entre estes grupos, não tendo diferença estatística significativa.

LONG e colaboradores (2020) validaram um imunoenensaio enzimático de quimioluminescência magnética para detecção de anticorpos específicos anti-SARS-CoV-2 em 285 pacientes infectados. A proporção de pacientes com IgG específico contra o vírus atingiu 100% cerca de 17 a 19 dias após o início dos sintomas, enquanto a proporção de IgM atingiu um pico de 94,1% cerca de 20 a 22 dias, sendo que todos os pacientes deste estudo alcançaram a soroconversão de IgG ou IgM dentro de 20 dias após o início dos sintomas. Ainda, foi avaliado que os níveis de anticorpos do tipo IgM variaram amplamente entre os pacientes, assim como o IgG, o qual também apresentou um perfil semelhante de mudanças dinâmicas. Foi observado que os títulos de anticorpos de um modo geral no grupo de pacientes com COVID-19 grave foram maiores do que os do grupo que não apresentaram gravidade clínica da doença. Em contraste, os pacientes que apresentaram a forma grave da doença no presente estudo, não apresentaram tal diferença durante a cronologia de anticorpos avaliada.

Dados de dois grandes estudos com mais de mil indivíduos participantes observaram que os títulos de IgG anti-SARS-CoV-2 são bem mantidos até 4 meses pós início de sintomas (GUDBJARTSSON et al., 2020; WAJNBERG et al., 2020), assim como observado no presente estudo. Além disso, anticorpos neutralizantes podem ser detectados na maioria dos pacientes infectados a partir de 4 dias pós início de sintomas, exceto em pacientes graves, os quais podem apresentar estes anticorpos em até 3 semanas (GUO et al., 2020; WANG et al., 2020).

No geral, uma carga de antígeno mais alta leva a títulos de anticorpos mais altos, o que corrobora em estudos onde verificou-se que pacientes com COVID-19 grave

com alta carga viral tinham maiores títulos de anticorpos neutralizantes e anticorpos totais (PICCOLI et al., 2020; ROBBIANI et al., 2020). Estas situações também foram observadas durante infecções por SARS-CoV quanto MERS-CoV (SARIOL, 2020).

No presente estudo, verificou-se que indivíduos RT-qPCR positivos que apresentaram altos níveis de anticorpos IgG pelo ELISA, também apresentaram altos níveis de anticorpos neutralizantes para a cepa de referência de Wuhan e para as variantes Alpha, Gamma e Beta.

A variação genética do SARS-CoV-2 tem gerado grande preocupação, sendo que ainda não está claro se o vírus será capaz de apresentar uma flexibilidade genética suficiente para escapar das respostas imunes adaptativas em um curto período de tempo. Entretanto, acredita-se que é improvável que as mutações do SARS-CoV-2 escapem completamente da imunidade de células T, uma vez que durante uma infecção, vários epítomos deste vírus são reconhecidos em humanos com COVID-19 (GRIFONI et al., 2020).

Em relação a resposta imune celular, uma coorte de 188 casos de COVID-19, as células B de memória específicas anti-Spike (RBD) e proteína do nucleocapsídeo foram detectáveis em 100% dos indivíduos com mais de seis meses pós infecção, sendo que estas células apresentaram um aumento ao longo do tempo, com mais células B anti-RBD em 6 meses pós início de sintomas em relação ao estágio agudo da doença (DAN et al., 2021). Estudos de memória celular pós infecção por SARS-CoV, o coronavírus mais semelhante ao SARS-Cov-2, detectaram células T de memória por 17 anos (LE BERT et al., 2020) e células B por até 6 anos (TANG et al., 2011).

A imunidade inata ineficaz com respostas de IFN tipo I e tipo III prejudicadas e atrasadas, estão associadas à falha no controle de uma infecção primária por SARS-CoV-2 e a um alto risco do desenvolvimento de COVID-19 grave e fatal (KURICERVANTES et al., 2020; LI et al., 2020; LUCAS et al., 2020; DEL VALLE et al., 2020).

Se este atraso da resposta imune inata for longo, o vírus pode obter uma grande vantagem em sua replicação no trato respiratório superior e pulmões, acarretando uma falha ao iniciar uma resposta imune adaptativa, resultando em condições que

levam a uma doença pulmonar grave o suficiente para hospitalização. Este tipo de ocorrência pode ser maior em pacientes mais idosos, uma vez que estes indivíduos possuem um pool de células T virgens menor, o que provavelmente resulta em respostas de anticorpos neutralizantes dificultadas, sendo que as respostas de anticorpos neutralizantes são geralmente dependentes de células T (MODERBACHER et al., 2020).

Diante disso, na ausência de uma resposta imune adaptativa substantiva durante a infecção pelo SARS-CoV-2, o sistema imunológico inato tende a preencher a ausência de uma resposta das células T, tentando controlar o vírus com uma resposta imune inata exacerbada com uma grande produção de citocinas e quimiocinas, resultando em uma imunopatologia pulmonar excessiva (MAGLEBY et al., 2020).

Ao realizar a quantificação dos biomarcadores solúveis sistêmicos de pacientes COVID-19 positivos sobreviventes, observou-se que de um modo geral, as quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, citocinas reguladoras e fatores de crescimento, apresentaram uma queda durante os seis meses de acompanhamento pós internação, com exceção de CCL11, CXCL8, CCL3, CCL4, CCL5, IL-6, IFN-g, IL-17, IL-5, FGF-basic, PDGF, VEGF, G-CSF e GM-CSF.

É fato que uma resposta imune eficaz contra o SARS-CoV-2 requer o envolvimento de células do sistema imunológico inato quanto adaptativo. Entretanto, ao contrário do que se observa na maioria das respostas antivirais, os pacientes com COVID-19 apresentam algumas variações em sua resposta imune, como por exemplo a redução na contagem de linfócitos (linfopenia) e aumento da relação neutrófilos/linfócitos, que são considerados marcadores da doença (CHEN et al., 2020; DIAO et al., 2020; LIU et al., 2020; SCHULTE-SCHREPPING et al., 2020).

A fim de esclarecer melhor a relação entre as alterações do sistema imunológico periférico e a gravidade da COVID-19, WALTER e colaboradores (2022) quantificaram os níveis de mediadores inflamatórios durante o percurso da COVID-19 aguda e observaram que os pacientes infectados apresentaram aumento de mieloperoxidase, interleucinas IL-12, IL-6, IL-10 e IL-8, acompanhado de redução de IL-17A e níveis de óxido nítrico. Níveis de IL-10 ≥ 14 pg/ml foram fortemente

relacionados ao pior desfecho da doença, com sensibilidade de 78,3% e especificidade de 79,1%.

Observou-se ainda que dentre as citocinas avaliadas, a que estava mais relacionada a um pior prognóstico em pacientes com COVID-19 foi a IL-6, que estava aumentada na maioria dos pacientes, principalmente naqueles com doença mais grave (WALTER et al., 2022). Respostas exacerbadas de IL-6 podem acarretar uma resposta pró-inflamatória sistêmica, uma vez que esta interleucina está envolvida em vários mecanismos, como a resposta de fase aguda, inflamação, proliferação de células B e T, hematopoiese e quimiotaxia de neutrófilos (COVARRUBIAS et al., 2014; ROSE-JOHN et al., 2017). Além disso, o aumento dos níveis de IL-6 está correlacionado com um aumento de IL-10, que também demonstrou estar aumentado em pacientes com COVID-19 moderado a crítico (WALTER et al., 2022).

Ainda, WALTER e colaboradores (2022) observaram que os níveis de IL-10 também foram um importante parâmetro relacionado à redução da sobrevida dos pacientes com COVID-19, com níveis de IL-10 ≥ 14 pg/ml indicando pior prognóstico, sendo um resultado interessante a ser discutido, uma vez que a IL-10 está frequentemente associada à imunossupressão e atividade anti-inflamatória. No entanto, a IL-10 também pode ser uma citocina imunoativadora e pró-inflamatória como demonstrado em outros estudos, o que significa que em alguns pacientes com COVID-19, a IL-10 pode falhar em suprimir a inflamação ou agir de maneira pró-inflamatória. Assim, a IL-10 pode desempenhar um papel importante na fisiopatologia da doença, o que torna esta citocina um possível biomarcador prognóstico (LU et al., 2021; ISLAM et al., 2021). Porém, mais estudos clínicos com foco nesta interleucina e sua correlação com a sobrevida dos pacientes com COVID-19 devem ser realizados.

WALTER e colaboradores (2022) encontrou níveis plasmáticos aumentados de IL-8 em pacientes com COVID-19 grave e crítico. Esta interleucina atua como quimioatraente e pode ativar monócitos, células T, neutrófilos e outras células imunes, além de seu papel na formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), que produz um fenótipo pró-trombótico (CHEN et al., 2020; KAISER et al., 2021).

Outros estudos relataram a importância da IL-8 na síndrome de liberação de citocinas e encontraram uma associação dos níveis de IL-8 com a duração da

doença (BORGES et al., 2020; MA et al., 2021). Todos esses achados clínicos corroboram com estudos na literatura que constataram que essas citocinas estão aumentadas em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 (MEHTA et al., 2020; VANDERBEKE et al., 2021). No entanto, ao contrário de outros estudos realizados, WALTER e colaboradores (2022) observou uma redução da IL-17A em pacientes com COVID-19 moderado a crítico. Entretanto, esse resultado não é tão discrepante, uma vez que o SARS-CoV-2 também parece estimular a produção de citocinas Th-2 e suprimir a inflamação mediada por Th17 (MEHTA et al., 2020; MEGNA et al., 2020).

DEL VALLE e colaboradores (2020), acompanharam 1.484 pacientes hospitalizados com suspeita ou confirmação de COVID-19 desde o dia primeiro dia de internação até o dia da alta ou óbito e avaliaram níveis séricos de IL-6, IL-8, TNF- α e IL-1 β durante a admissão e correlacionaram esses resultados com marcadores clínicos e laboratoriais de gravidade da doença e com desfecho dos pacientes avaliados. Foi observado que níveis séricos elevados de IL-6 e TNF- α durante a admissão foram fortes preditores de gravidade e sobrevida da doença, independentemente da medida de outros biomarcadores.

Estudos epidemiológicos confiáveis exigem testes diagnósticos com uma alta sensibilidade e especificidade. Uma revisão sistemática e metanálise sobre testes sorológicos no diagnóstico da COVID-19 realizado por BASTOS e colaboradores (2020) mostrou evidências de que a precisão de testes rápidos indiretos de fluxo lateral existentes são particularmente fracas. Entretanto, testes tradicionais como o ELISA e os ensaios quimioluminescentes apresentaram uma melhor acurácia e desempenho, porém, dependem de coleta de sangue venoso para obtenção das amostras de soro ou plasma, além do uso de equipamentos dispendiosos e um maior tempo para a realização e liberação dos resultados destes ensaios (BASTOS et al., 2020).

Apesar disso, no presente estudo, ao padronizar os ELISAs para detecção de IgM e IgG anti-SARS-CoV-2 e analisar os testes rápidos imunocromatográficos disponíveis no Brasil, resultados de ambos ensaios sorológicos apresentaram uma relevante sensibilidade e especificidade na detecção destes anticorpos, principalmente os testes das marcas Wondfo 2019-nCoV RBD Antibody Rapid Test, COVID-19 Ab Plus

ECO Teste IgM/IgG, ECO Diagnóstica e TR DPP® COVID-19 IgM/IgG, Bio-Manguinhos que apresentaram boa acurácia diagnóstica pós 15 dias do início de sintomas quando comparados com o diagnóstico molecular.

COTA e colaboradores (2020), avaliaram a acurácia de testes sorológicos, kits de ELISAs e imunoenaios de fluxo lateral, para COVID-19 registrados no Brasil, comparando o desempenho dos testes em relação ao tipo de amostra utilizada, sangue total ou soro, manifestações clínicas dos pacientes (COVID-19 grave e leve) e dias de sintomas (<7 dias, 7-14 dias e >14 dias). Para ambos os métodos, a sensibilidade aumentou com a gravidade clínica dos pacientes e dias de sintomas. As taxas de sensibilidade dos testes atingiram cerca de 80-90% após 14 dias do início dos sintomas, confirmando que os imunoenaios não são ferramentas adequadas para o rastreamento da infecção pelo vírus SARS-CoV-2 na população em geral, mas são importantes ferramentas para um controle e estudos epidemiológicos. A concordância entre os imunoenaios de fluxo lateral utilizando amostras de sangue total e soro foi moderada, sendo que a especificidade destes testes foi em geral maior em relação aos testes de ELISA. Dentre os testes avaliados por COTA e colaboradores (2020), o teste COVID-19 ECO IgM/IgG (Eco Diagnóstica) apresentou uma maior sensibilidade (89,2%) na detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 pós 14 dias de sintomas, em comparação aos outros testes avaliados.

Embora a baixa especificidade não tenha sido um problema para a maioria dos imunoenaios de fluxo lateral, os dados dos ELISAs comerciais diferiram significativamente daqueles descritos nas bulas dos fabricantes e em relação a outros estudos de acurácia realizados na China e em países do hemisfério norte.

Outro ponto importante a ser relatado, é em relação a falta de informações sobre os antígenos utilizados na fabricação dos testes sorológicos comerciais, impedindo uma discussão mais profunda sobre as razões das diferenças de desempenho entre estes ensaios. Essas informações, caso fossem disponibilizadas através de exigência dos órgãos reguladores da saúde, poderiam contribuir significativamente para o entendimento do papel de vários antígenos do SARS-CoV-2 e consequentemente, contribuir no desenvolvimento de novos testes indiretos quanto diretos no diagnóstico da COVID-19 (COTA et al., 2020).

Diante do exposto, ensaios sorológicos de detecção de anticorpos específicos anti-SARS-CoV-2 são fundamentais para estudos de vigilância epidemiológica na atual crise de saúde global da COVID-19, colaborando em decisões políticas e medidas preventivas (POLLÁN et al., 2020). Estudos epidemiológicos de base populacional são elemento chave para informar as autoridades sobre a necessidade de manter medidas de saúde pública para evitar novas ondas epidêmicas, permitindo assim, tomadas de decisões cientificamente orientadas pelos governos.

7 CONCLUSÃO

Os pacientes deste estudo apresentaram um total de 18 comorbidades, sendo a hipertensão, doença renal crônica, diabetes e câncer as mais comuns. Ainda, os pacientes apresentaram um perfil heterogêneo no desenvolvimento dos primeiros sintomas, sendo um total de 19 sintomas distintos relatados, sendo dispneia, febre e tosse seca os mais observados.

De um modo geral, os pacientes RT-qPCR+ passaram a ter IgM detectáveis por ELISA a partir da primeira semana de acompanhamento, o qual permaneceu detectável por até oito semanas. Em relação aos anticorpos do tipo IgG, o mesmo apresentou títulos elevados a partir da segunda semana do início de sintomas e permaneceu detectável durante os seis meses do estudo. Ao avaliar separadamente a cronologia dos anticorpos IgM e IgG entre os pacientes RT-qPCR positivos por idade, gênero, presença ou não de neoplasia e por gravidade clínica da doença, foi observado perfis de anticorpos semelhantes entre estes grupos, não tendo diferença estatística significativa.

Em relação a cinética dos biomarcadores avaliados dentre os pacientes COVID-19 positivos, foi observada a redução da grande maioria dos mediadores solúveis desde o primeiro tempo avaliado após a infecção aguda pelo SARS-CoV-2 até 180 dias após o início de sintomas, com exceção de CCL11, CXCL8, CCL3, CCL4, CCL5, IL-6, IFN-g, IL-17, IL-5, FGF-basic, PDGF, VEGF, G-CSF e GM-CSF.

Após análise de anticorpos neutralizantes pelo teste ECO F COVID nAb (ECO Diagnóstica), número significativo dos pacientes infectados apresentou anticorpos neutralizantes para a cepa de referência de Wuhan e para as variantes Alpha, Gamma e Beta.

Ainda, ao avaliar os testes rápidos imunocromatográficos indiretos disponíveis no Brasil, os mesmos apresentaram uma boa sensibilidade e especificidade na detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2, principalmente os testes das marcas Wondfo 2019-nCoV RBD Antibody Rapid Test, COVID-19 Ab Plus ECO Teste IgM/IgG, ECO Diagnóstica e TR DPP® COVID-19 IgM/IgG, Bio-Manguinhos.

Diante dos resultados deste trabalho e de outros estudos previamente discutidos, a resposta imune inata e adaptativa durante a COVID-19 ainda é controversa, o que pode estar intimamente relacionado à gravidade da doença, comorbidades existentes e outras características clínicas específicas de cada paciente.

Compreender as manifestações heterogêneas desta doença e explorar as relações entre esses fenômenos e a imunidade é uma prioridade. Além disso, a duração da memória imunológica e a imunidade protetora ao SARS-CoV-2 pós COVID-19 e em resposta às vacinas anti-SARS-CoV-2 tem uma alta prioridade atualmente.

8 REFERÊNCIAS

ACTT-1 STUDY GROUP et al. Remdesivir for the treatment of Covid-19: final report. **N Engl J Med**, v. 383, n. 19, p. 1813-1826, 2020.

ADAM, David. Special report: The simulations driving the world's response to COVID-19. **Nature**, v. 580, n. 7802, p. 316-319, 2020.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Vacinas - Covid-19. Disponível em: < <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/vacinas/>>. Acesso em: 18, março de 2022.

AHMED, Hassaan et al. Long-term clinical outcomes in survivors of severe acute respiratory syndrome and Middle East respiratory syndrome coronavirus outbreaks after hospitalisation or ICU admission: a systematic review and meta-analysis. **Journal of rehabilitation medicine**, v. 52, n. 5, 2020.

Al, Tao et al. Correlation of chest CT and RT-PCR testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in China: a report of 1014 cases. **Radiology**, v. 296, n. 2, p. E32-E40, 2020.

AL KAHLOUT, Reham A. et al. Comparative serological study for the prevalence of anti-MERS coronavirus antibodies in high-and low-risk groups in Qatar. **Journal of immunology research**, v. 2019, 2019.

ALBERICI, Federico et al. Management of patients on dialysis and with kidney transplantation during the SARS-CoV-2 (COVID-19) pandemic in Brescia, Italy. **Kidney International Reports**, v. 5, n. 5, p. 580-585, 2020.

ALI, Hatem et al. Survival rate in acute kidney injury superimposed COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis. **Renal failure**, v. 42, n. 1, p. 393-397, 2020.

ALLEN, Breanna M. et al. Systemic dysfunction and plasticity of the immune macroenvironment in cancer models. **Nature medicine**, v. 26, n. 7, p. 1125-1134, 2020.

ALLEN, William E. et al. Population-scale longitudinal mapping of COVID-19 symptoms, behaviour and testing. **Nature human behaviour**, v. 4, n. 9, p. 972-982, 2020.

ALVIM, Renata GF et al. An affordable anti-SARS-COV-2 spike protein ELISA test for early detection of IgG seroconversion suited for large-scale surveillance studies in low-income countries. 2020.

ANDERSEN, Kristian G. et al. The proximal origin of SARS-CoV-2. **Nature medicine**, v. 26, n. 4, p. 450-452, 2020.

ARONS, Melissa M. et al. Presymptomatic SARS-CoV-2 infections and transmission in a skilled nursing facility. **New England journal of medicine**, v. 382, n. 22, p. 2081-2090, 2020.

ARUNACHALAM, Prabhu S. et al. Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans. **Science**, v. 369, n. 6508, p. 1210-1220, 2020.

AVANZATO, Victoria A. et al. Case study: prolonged infectious SARS-CoV-2 shedding from an asymptomatic immunocompromised individual with cancer. **Cell**, v. 183, n. 7, p. 1901-1912. e9, 2020.

AZHAR, Esam I. et al. The middle east respiratory syndrome (MERS). **Infectious Disease Clinics**, v. 33, n. 4, p. 891-905, 2019.

BAKER, Michael G.; WILSON, Nick; ANGLEMYER, Andrew. Successful elimination of Covid-19 transmission in New Zealand. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 8, p. e56, 2020.

BARLOW, Ashley et al. Review of emerging pharmacotherapy for the treatment of coronavirus disease 2019. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 40, n. 5, p. 416-437, 2020.

BASTARD, Paul et al. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. **Science**, v. 370, n. 6515, p. eabd4585, 2020.

BASTOS, Mayara Lisboa et al. Diagnostic accuracy of serological tests for covid-19: systematic review and meta-analysis. **bmj**, v. 370, 2020.

BENIGNI, Ariela; CASSIS, Paola; REMUZZI, Giuseppe. Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. **EMBO molecular medicine**, v. 2, n. 7, p. 247-257, 2010.

BETTENCOURT, Paulo et al. Qualitative serology in patients recovered from SARS CoV 2 infection. **The Journal of infection**, v. 81, n. 2, p. e120, 2020.

BHALA, Neeraj et al. Sharpening the global focus on ethnicity and race in the time of COVID-19. **The Lancet**, v. 395, n. 10238, p. 1673-1676, 2020.

BIRRA, Domenico et al. COVID 19: a clue from innate immunity. **Immunologic research**, v. 68, n. 3, p. 161-168, 2020.

BLANCO-MELO, Daniel et al. Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19. **Cell**, v. 181, n. 5, p. 1036-1045. e9, 2020.

BORGES, Leandro et al. COVID-19 and neutrophils: the relationship between hyperinflammation and neutrophil extracellular traps. **Mediators of Inflammation**, v. 2020, 2020.

BOTOSSO, Viviane Fongaro et al. Anti-SARS-CoV-2 equine F (Ab')₂ immunoglobulin as a possible therapy for COVID-19. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, p. 1-17, 2022.

BRAZ, Paulo Rodrigo Lima et al. Terapias medicamentosas empregadas no tratamento da Covid-19 no Brasil: revisão bibliográfica narrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 13, p. e213101321068-e213101321068, 2021.

BRODIN, Petter. Why is COVID-19 so mild in children?. **Acta Paediatrica**, v. 109, n. 6, p. 1082-1083, 2020.

BUETTI, Niccolò et al. Diabetes mellitus is a risk factor for prolonged SARS-CoV-2 viral shedding in lower respiratory tract samples of critically ill patients. **Endocrine**, v. 70, n. 3, p. 454-460, 2020.

BUNDERS, Madeleine J.; ALTFELD, Marcus. Implications of sex differences in immunity for SARS-CoV-2 pathogenesis and design of therapeutic interventions. **Immunity**, v. 53, n. 3, p. 487-495, 2020.

BURKE, Rachel M. et al. Symptom profiles of a convenience sample of patients with COVID-19—United States, January–April 2020. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 69, n. 28, p. 904, 2020.

CARFÌ, Angelo et al. Persistent symptoms in patients after acute COVID-19. **Jama**, v. 324, n. 6, p. 603-605, 2020.

CATT, K. J. et al. Angiotensin II blood-levels in human hypertension. **The Lancet**, v. 297, n. 7697, p. 459-464, 1971.

Centers for Disease Control and Prevention. 2021. COVID-19. Symptoms of COVID-19. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html>.

CHAFEKAR, Aasiyah; FIELDING, Burtram C. MERS-CoV: understanding the latest human coronavirus threat. **Viruses**, v. 10, n. 2, p. 93, 2018.

CHAKRAVARTY, Dimple et al. Sex differences in SARS-CoV-2 infection rates and the potential link to prostate cancer. *Communications biology*, v. 3, n. 1, p. 1-12, 2020.

CHAN, Jasper Fuk-Woo et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. **The lancet**, v. 395, n. 10223, p. 514-523, 2020.

CHANG, Ya-Jen et al. Innate lymphoid cells mediate influenza-induced airway hyper-reactivity independently of adaptive immunity. **Nature immunology**, v. 12, n. 7, p. 631-638, 2011.

CHAO, Jerry Y. et al. Clinical characteristics and outcomes of hospitalized and critically ill children and adolescents with coronavirus disease 2019 at a tertiary care medical center in New York City. **The Journal of pediatrics**, v. 223, p. 14-19. e2, 2020.

CHEN, Bin et al. Overview of lethal human coronaviruses. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 5, n. 1, p. 1-16, 2020.

CHEN, Guang et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. **The Journal of clinical investigation**, v. 130, n. 5, p. 2620-2629, 2020.

CHEN, Liting et al. Scoring cytokine storm by the levels of MCP-3 and IL-8 accurately distinguished COVID-19 patients with high mortality. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 5, n. 1, p. 1-3, 2020.

CHEN, Nanshan et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **The lancet**, v. 395, n. 10223, p. 507-513, 2020.

CHENG, Yichun et al. Kidney disease is associated with in-hospital death of patients with COVID-19. **Kidney international**, v. 97, n. 5, p. 829-838, 2020.

COBEY, Sarah. Modeling infectious disease dynamics. **Science**, v. 368, n. 6492, p. 713-714, 2020.

CONG, Yu et al. MERS-CoV pathogenesis and antiviral efficacy of licensed drugs in human monocyte-derived antigen-presenting cells. **PloS one**, v. 13, n. 3, p. e0194868, 2018.

COPIN, Marie-Christine et al. Time to consider histologic pattern of lung injury to treat critically ill patients with COVID-19 infection. **Intensive care medicine**, v. 46, n. 6, p. 1124-1126, 2020.

CORMAN, Victor M. et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. **Eurosurveillance**, v. 25, n. 3, p. 2000045, 2020.

CORMAN, Victor M. et al. Viral shedding and antibody response in 37 patients with Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 4, p. 477-483, 2016.

COTA, Gláucia et al. Diagnostic performance of commercially available COVID-19 serology tests in Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 101, p. 382-390, 2020.

COVARRUBIAS, Anthony J.; HORNG, Tiffany. IL-6 strikes a balance in metabolic inflammation. **Cell metabolism**, v. 19, n. 6, p. 898-899, 2014.

DAI, Mengyuan et al. Patients with cancer appear more vulnerable to SARS-CoV-2: a multicenter study during the COVID-19 outbreak. **Cancer discovery**, v. 10, n. 6, p. 783-791, 2020.

DAN, Jennifer M. et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. **Science**, v. 371, n. 6529, p. eabf4063, 2021.

DANSER, AH Jan; EPSTEIN, Murray; BATLLE, Daniel. Renin-angiotensin system blockers and the COVID-19 pandemic: at present there is no evidence to abandon renin-angiotensin system blockers. **Hypertension**, v. 75, n. 6, p. 1382-1385, 2020.

DE WIT, Emmie et al. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 8, p. 523-534, 2016.

DEEKS, Jonathan J. et al. Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 6, 2020.

DEL VALLE, Diane Marie et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. **Nature medicine**, v. 26, n. 10, p. 1636-1643, 2020.

DEL VALLE, Diane Marie et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. **Nature medicine**, v. 26, n. 10, p. 1636-1643, 2020.

DIAO, Bo et al. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Frontiers in immunology**, p. 827, 2020.

DINARELLO, Charles A.; SIMON, Anna; VAN DER MEER, Jos WM. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. **Nature reviews Drug discovery**, v. 11, n. 8, p. 633-652, 2012.

DINNES, Jacqueline et al. Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 3, 2021.

DIVISION OF NEPHROLOGY, COLUMBIA UNIVERSITY VAGELOS COLLEGE OF PHYSICIANS WORKING GROUP. Disaster response to the COVID-19 pandemic for patients with kidney disease in New York City. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 31, n. 7, p. 1371-1379, 2020.

ENGVALL, Eva; PERLMANN, Peter. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA: III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. **The Journal of Immunology**, v. 109, n. 1, p. 129-135, 1972.

ESHGHIFAR, Nahal et al. Evaluation of analytical performance of seven rapid antigen detection kits for detection of SARS-CoV-2 virus. **International Journal of General Medicine**, v. 14, p. 435, 2021.

FANG, Lei; KARAKIULAKIS, George; ROTH, Michael. Are patients with hypertension and diabetes mellitus at increased risk for COVID-19 infection?. **The lancet respiratory medicine**, v. 8, n. 4, p. e21, 2020.

FEHR, Anthony R.; PERLMAN, Stanley. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. **Coronaviruses**, p. 1-23, 2015.

FELDMANN, Marc et al. Trials of anti-tumour necrosis factor therapy for COVID-19 are urgently needed. **The Lancet**, v. 395, n. 10234, p. 1407-1409, 2020.

FERRARIO, Carlos M. et al. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockers on cardiac angiotensin-converting enzyme 2. **Circulation**, v. 111, n. 20, p. 2605-2610, 2005.

FILGUEIRAS, Priscilla S. et al. COVID-19 rapid antigen test at hospital admission associated to the knowledge of individual risk factors allow overcoming the difficulty of managing suspected patients in hospitals COVID-19 rapid antigen test facilitates the management of suspected patients on hospital admission. **Fortune Journals**, 2022.

FRANCO-PAREDES, Carlos et al. COVID-19 in jails and prisons: A neglected infection in a marginalized population. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 6, p. e0008409, 2020.

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

GATTINONI, Luciano et al. COVID-19 pneumonia: different respiratory treatments for different phenotypes?. **Intensive care medicine**, v. 46, n. 6, p. 1099-1102, 2020.

GATTINONI, Luciano; CHIUMELLO, Davide; ROSSI, Sandra. COVID-19 pneumonia: ARDS or not?. **Critical care**, v. 24, n. 1, p. 1-3, 2020.

GENSINI, Gian Franco; YACOUB, Magdi H.; CONTI, Andrea A. The concept of quarantine in history: from plague to SARS. **Journal of Infection**, v. 49, n. 4, p. 257-261, 2004.

GRIFONI, Alba et al. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. **Cell**, v. 181, n. 7, p. 1489-1501. e15, 2020.

GRZELAK, Ludivine et al. A comparison of four serological assays for detecting anti-SARS-CoV-2 antibodies in human serum samples from different populations. **Science translational medicine**, v. 12, n. 559, p. eabc3103, 2020.

GUAN, Wei-jie et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. **New England journal of medicine**, v. 382, n. 18, p. 1708-1720, 2020.

GUDBJARTSSON, Daniel F. et al. Humoral immune response to SARS-CoV-2 in Iceland. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 18, p. 1724-1734, 2020.

GUERY, Benoit et al. Clinical features and viral diagnosis of two cases of infection with Middle East Respiratory Syndrome coronavirus: a report of nosocomial transmission. **The Lancet**, v. 381, n. 9885, p. 2265-2272, 2013.

GULLIAMS, Martin et al. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 8, p. 571-578, 2014.

GUO, Li et al. Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19). **Clinical infectious diseases**, v. 71, n. 15, p. 778-785, 2020.

GUO, Weina et al. Diabetes is a risk factor for the progression and prognosis of COVID-19. **Diabetes/metabolism research and reviews**, v. 36, n. 7, p. e3319, 2020.

GUPTA, Aakriti et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. **Nature medicine**, v. 26, n. 7, p. 1017-1032, 2020.

HARRISON, Andrew G.; LIN, Tao; WANG, Penghua. Mechanisms of SARS-CoV-2 transmission and pathogenesis. **Trends in immunology**, v. 41, n. 12, p. 1100-1115, 2020.

HE, Xi et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. **Nature medicine**, v. 26, n. 5, p. 672-675, 2020.

HE, Zhongping et al. Effects of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus infection on peripheral blood lymphocytes and their subsets. **International journal of infectious diseases**, v. 9, n. 6, p. 323-330, 2005.

HERRIDGE, Margaret S. et al. Functional disability 5 years after acute respiratory distress syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 14, p. 1293-1304, 2011.

HIRSCH, Jamie S. et al. Acute kidney injury in patients hospitalized with COVID-19. **Kidney international**, v. 98, n. 1, p. 209-218, 2020.

HOFFMANN, Markus et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 271-280. e8, 2020.

HOU, Hongyan et al. Detection of IgM and IgG antibodies in patients with coronavirus disease 2019. **Clinical & translational immunology**, v. 9, n. 5, p. e1136, 2020.

HSUEH, P.-R. et al. Chronological evolution of IgM, IgA, IgG and neutralisation antibodies after infection with SARS-associated coronavirus. **Clinical microbiology and infection**, v. 10, n. 12, p. 1062-1066, 2004.

HUANG, Chaolin et al. 6-month consequences of COVID-19 in patients discharged from hospital: a cohort study. **The Lancet**, v. 397, n. 10270, p. 220-232, 2021.

HUANG, Chaolin et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497-506, 2020.

HUI, D. S. et al. Impact of severe acute respiratory syndrome (SARS) on pulmonary function, functional capacity and quality of life in a cohort of survivors. **Thorax**, v. 60, n. 5, p. 401-409, 2005.

HUI, David SC; ZUMLA, Alimuddin. Severe acute respiratory syndrome: historical, epidemiologic, and clinical features. **Infectious Disease Clinics**, v. 33, n. 4, p. 869-889, 2019.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Acesso em: 02 de fevereiro de 2022).

IGL'OI, Zsófia et al. Clinical evaluation of Roche SD Biosensor rapid antigen test for SARS-CoV-2 in municipal health service testing site, the Netherlands. **Emerging infectious diseases**, v. 27, n. 5, p. 1323, 2021.

IMAI, Yumiko et al. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. **Nature**, v. 436, n. 7047, p. 112-116, 2005.

ISLAM, Hashim et al. Elevated interleukin-10 levels in COVID-19: potentiation of pro-inflammatory responses or impaired anti-inflammatory action?. **Frontiers in Immunology**, p. 2485, 2021.

JÄÄSKELÄINEN, Anne J. et al. Evaluation of commercial and automated SARS-CoV-2 IgG and IgA ELISAs using coronavirus disease (COVID-19) patient samples. **Eurosurveillance**, v. 25, n. 18, p. 2000603, 2020.

JAIN, Swati et al. COVID-19 vaccines currently under preclinical and clinical studies, and associated antiviral immune response. **Vaccines**, v. 8, n. 4, p. 649, 2020.

JAMAL, Alainna J. et al. Sensitivity of nasopharyngeal swabs and saliva for the detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. **Clinical Infectious Diseases**, v. 72, n. 6, p. 1064-1066, 2021.

KAISER, Rainer et al. Self-sustaining IL-8 loops drive a prothrombotic neutrophil phenotype in severe COVID-19. **Jci Insight**, v. 6, n. 18, 2021.

KANDEEL, Mahmoud et al. From SARS and MERS CoVs to SARS-CoV-2: Moving toward more biased codon usage in viral structural and nonstructural genes. **Journal of medical virology**, v. 92, n. 6, p. 660-666, 2020.

KEVADIYA, Bhavesh D. et al. Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. **Nature materials**, v. 20, n. 5, p. 593-605, 2021.

KIM, Jerome H.; MARKS, Florian; CLEMENS, John D. Looking beyond COVID-19 vaccine phase 3 trials. **Nature medicine**, v. 27, n. 2, p. 205-211, 2021.

KLOK, F. A. et al. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. **Thrombosis research**, v. 191, p. 145-147, 2020.

KO, J.-H. et al. Suggested new breakpoints of anti-MERS-CoV antibody ELISA titers: performance analysis of serologic tests. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 36, n. 11, p. 2179-2186, 2017.

KOCZULA, Katarzyna M.; GALLOTTA, Andrea. Lateral flow assays. **Essays in biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 111-120, 2016.

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

KSIAZEK, Thomas G. et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. **New England journal of medicine**, v. 348, n. 20, p. 1953-1966, 2003.

KUJAWSKI, Stephanie A. et al. Clinical and virologic characteristics of the first 12 patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) in the United States. **Nature medicine**, v. 26, n. 6, p. 861-869, 2020.

KURI-CERVANTES, Leticia et al. Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. **Science immunology**, v. 5, n. 49, p. eabd7114, 2020.

KVEDARAITE, Egle et al. Major alterations in the mononuclear phagocyte landscape associated with COVID-19 severity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 6, p. e2018587118, 2021.

LE BERT, Nina et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. **Nature**, v. 584, n. 7821, p. 457-462, 2020.

LEDFORD, Heidi. J&J's one-shot COVID vaccine offers hope for faster protection. **Nature** (Lond.), 2021.

LEE, Hyun Kyoung et al. Detection of antibodies against SARS-Coronavirus using recombinant truncated nucleocapsid proteins by ELISA. 2008.

LEISMAN, Daniel E. et al. Cytokine elevation in severe and critical COVID-19: a rapid systematic review, meta-analysis, and comparison with other inflammatory syndromes. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, n. 12, p. 1233-1244, 2020.

LI, Gang; CHEN, Xuejuan; XU, Anlong. Profile of specific antibodies to the SARS-associated coronavirus. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 5, p. 508-509, 2003.

LI, Geng et al. Coronavirus infections and immune responses. **Journal of medical virology**, v. 92, n. 4, p. 424-432, 2020.

LI, Qianqian et al. The impact of mutations in SARS-CoV-2 spike on viral infectivity and antigenicity. **Cell**, v. 182, n. 5, p. 1284-1294. e9, 2020.

LI, Qun et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. **New England journal of medicine**, 2020.

LI, Xiaowei et al. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. **Journal of pharmaceutical analysis**, v. 10, n. 2, p. 102-108, 2020.

LIANG, Xiaofeng; FENG, Z.; LI, L. Guidance for corona virus disease 2019: prevention, control, diagnosis and management. Beijing, China: **People's Medical Publishing House**, 2020.

LIM, Jeong-Hoon et al. Fatal outcomes of COVID-19 in patients with severe acute kidney injury. **Journal of clinical medicine**, v. 9, n. 6, p. 1718, 2020.

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

LIU, Yuwei et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as an independent risk factor for mortality in hospitalized patients with COVID-19. **Journal of Infection**, v. 81, n. 1, p. e6-e12, 2020.

LOEFFELHOLZ, Michael J.; TANG, Yi-Wei. Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections—the state of the art. **Emerging microbes & infections**, v. 9, n. 1, p. 747-756, 2020.

LONG, Quan-Xin et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. **Nature medicine**, v. 26, n. 6, p. 845-848, 2020.

LOOR, Karina et al. Safety, diagnostic, and therapeutic value of flexible bronchoscopy in critically ill COVID-19 patients. **Canadian Journal of Anesthesia/Journal canadien d'anesthésie**, v. 68, n. 3, p. 434-435, 2021.

LU, Ligong et al. A potential role of interleukin 10 in COVID-19 pathogenesis. **Trends in Immunology**, v. 42, n. 1, p. 3-5, 2021.

LU, Roujian et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **The Lancet**, v. 395, n. 10224, p. 565-574, 2020.

LU, Xiaoyan et al. US CDC real-time reverse transcription PCR panel for detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. **Emerging infectious diseases**, v. 26, n. 8, p. 1654, 2020.

LUCAS, Carolina et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. **Nature**, v. 584, n. 7821, p. 463-469, 2020.

MA, Aiping et al. High levels of circulating IL-8 and soluble IL-2R are associated with prolonged illness in patients with severe COVID-19. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 626235, 2021.

MA, Huan et al. Serum IgA, IgM, and IgG responses in COVID-19. **Cellular & molecular immunology**, v. 17, n. 7, p. 773-775, 2020.

MAGLEBY, Reed et al. Impact of SARS-CoV-2 viral load on risk of intubation and mortality among hospitalized patients with coronavirus disease 2019. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, 2020.

MAK, Gannon CK et al. Evaluation of rapid antigen test for detection of SARS-CoV-2 virus. **Journal of Clinical Virology**, v. 129, p. 104500, 2020.

MALLETT, Sue et al. At what times during infection is SARS-CoV-2 detectable and no longer detectable using RT-PCR-based tests? A systematic review of individual participant data. **BMC medicine**, v. 18, n. 1, p. 1-17, 2020.

MARÍA, Fernández-Martínez et al. Overall management of emergency general surgery patients during the surge of the COVID-19 pandemic: an analysis of procedures and outcomes from a teaching hospital at the worst hit area in Spain. **European Journal of Trauma and Emergency Surgery**, v. 47, n. 3, p. 693-702, 2021.

MATHEW, Divij et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. **Science**, v. 369, n. 6508, p. eabc8511, 2020.

MCADAMS, David et al. Incentivising wealthy nations to participate in the COVID-19 Vaccine Global Access Facility (COVAX): a game theory perspective. **BMJ global health**, v. 5, n. 11, p. e003627, 2020.

MCELVANEY, Oliver J. et al. Characterization of the inflammatory response to severe COVID-19 illness. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 202, n. 6, p. 812-821, 2020.

MedCalc statistical software [Internet]. Belgium: MedCalc; 1995 Dec 01. Diagnostic test evaluation calculator; [cited 2021 Sep 10]; Available from: https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php/.

MEDZHITOV, Ruslan; SCHNEIDER, David S.; SOARES, Miguel P. Disease tolerance as a defense strategy. **Science**, v. 335, n. 6071, p. 936-941, 2012.

MEGNA, Matteo; NAPOLITANO, Maddalena; FABBROCINI, Gabriella. May IL-17 have a role in COVID-19 infection?. **Medical hypotheses**, v. 140, p. 109749, 2020.

MEHTA, Puja et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. **The Lancet**, v. 395, n. 10229, p. 1033-1034, 2020.

MEI, Federico et al. First detection of SARS-CoV-2 by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay in pleural fluid. **Chest**, v. 158, n. 4, p. e143-e146, 2020.

MIDDLETON, Elizabeth A. et al. Neutrophil extracellular traps contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome. **Blood**, v. 136, n. 10, p. 1169-1179, 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022. Anvisa aprova o registro do primeiro autoteste para Covid-19 no Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa, 2022. Disponível em: < <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/anvisa-aprova-o-registro-do-primeiro-autoteste-para-covid-19-no-brasil>>. Acesso em: 30 de junho de 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022. Secretaria de Vigilância à Saúde (SVS): Guia de vigilância Epidemiológica, junho de 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Painel de casos de doença pelo coronavírus 2019 (COVID-19) no Brasil pelo Ministério da Saúde, 2022. Disponível em: < <https://covid.saude.gov.br/>>. Acesso em: 08 de março de 2022

MIORIN, Lisa et al. SARS-CoV-2 Orf6 hijacks Nup98 to block STAT nuclear import and antagonize interferon signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 45, p. 28344-28354, 2020.

MIYASHITA, Hirotaka et al. Do patients with cancer have a poorer prognosis of COVID-19? An experience in New York City. **Annals of Oncology**, v. 31, n. 8, p. 1088-1089, 2020.

MIZRAHI, Barak et al. Longitudinal symptom dynamics of COVID-19 infection. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2020.

MODERBACHER, Carolyn Rydzynski et al. Antigen-specific adaptive immunity to SARS-CoV-2 in acute COVID-19 and associations with age and disease severity. **Cell**, v. 183, n. 4, p. 996-1012. e19, 2020.

MONTICELLI, Laurel A. et al. Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. **Nature immunology**, v. 12, n. 11, p. 1045-1054, 2011.

MOORE, John B.; JUNE, Carl H. Cytokine release syndrome in severe COVID-19. **Science**, v. 368, n. 6490, p. 473-474, 2020.

NALBANDIAN, Ani et al. Post-acute COVID-19 syndrome. **Nature medicine**, v. 27, n. 4, p. 601-615, 2021.

NARASARAJU, Teluguakula et al. Neutrophilia and NETopathy as key pathologic drivers of progressive lung impairment in patients with COVID-19. **Frontiers in pharmacology**, v. 11, p. 870, 2020.

NATHAN, Carl. Neutrophils and COVID-19: Nots, NETs, and knots. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 9, 2020.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Janssen investigational COVID-19 vaccine: interim analysis of phase 3 clinical data released. Disponível em: <https://www.nih.gov/news-events/news-releases/janssen-investigational-covid-19-vaccine-interim-analysis-phase-3-clinical-data-released>. Acesso em: 18, março de 2022.

NEXTRAIN/NCOV. Genomic epidemiology of SARS-CoV-2 with subsampling focused globally over the past 6 months, 2022. Disponível em: < <https://nextstrain.org/ncov/gisaid/global/6m> >. Acesso em: 30 de junho de 2022.

OCARANZA, María Paz et al. Enalapril attenuates downregulation of angiotensin-converting enzyme 2 in the late phase of ventricular dysfunction in myocardial infarcted rat. **Hypertension**, v. 48, n. 4, p. 572-578, 2006.

OF THE INTERNATIONAL, Coronaviridae Study Group et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature microbiology**, v. 5, n. 4, p. 536, 2020.

OKBA, Nisreen MA et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2- specific antibody responses in coronavirus disease patients. **Emerging infectious diseases**, v. 26, n. 7, p. 1478, 2020.

PADOAN, Andrea et al. IgA-Ab response to spike glycoprotein of SARS-CoV-2 in patients with COVID-19: A longitudinal study. **Clinica chimica acta**, v. 507, p. 164-166, 2020.

PANDHARIPANDE, Pratik P. et al. Long-term cognitive impairment after critical illness. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 14, p. 1306-1316, 2013.

PARK, Wan Beom et al. Kinetics of serologic responses to MERS coronavirus infection in humans, South Korea. **Emerging infectious diseases**, v. 21, n. 12, p. 2186, 2015.

PEIRIS, J. S. M. et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. **The Lancet**, v. 361, n. 9366, p. 1319-1325, 2003.

PEIRIS, Joseph Sriyal Malik et al. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. **The Lancet**, v. 361, n. 9371, p. 1767-1772, 2003.

PENG, Yanchun et al. Broad and strong memory CD4+ and CD8+ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. **Nature immunology**, v. 21, n. 11, p. 1336-1345, 2020.

PEREIRA, Rodolfo M. et al. COVID-19 identification in chest X-ray images on flat and hierarchical classification scenarios. **Computer methods and programs in biomedicine**, v. 194, p. 105532, 2020.

PERICO, Luca et al. Immunity, endothelial injury and complement-induced coagulopathy in COVID-19. **Nature Reviews Nephrology**, v. 17, n. 1, p. 46-64, 2021.

PERLMAN, Stanley; NETLAND, Jason. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. **Nature reviews microbiology**, v. 7, n. 6, p. 439-450, 2009.

PFAAR, Oliver et al. COVID-19 pandemic: practical considerations on the organization of an allergy clinic—an EAACI/ARIA Position Paper. **Allergy**, v. 76, n. 3, p. 648-676, 2021.

PICCOLI, Luca et al. Mapping neutralizing and immunodominant sites on the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain by structure-guided high-resolution serology. **Cell**, v. 183, n. 4, p. 1024-1042. e21, 2020.

POLACK, Fernando P. et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. **New England Journal of Medicine**, 2020.

POLLÁN, Marina et al. Prevalence of SARS-CoV-2 in Spain (ENE-COVID): a nationwide, population-based seroepidemiological study. **The Lancet**, v. 396, n. 10250, p. 535-544, 2020.

PORTE, Lorena et al. Evaluation of a novel antigen-based rapid detection test for the diagnosis of SARS-CoV-2 in respiratory samples. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 99, p. 328-333, 2020.

PROKUNINA-OLSSON, Ludmila et al. COVID-19 and emerging viral infections: The case for interferon lambda. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 5, 2020.

PUNTMANN, Valentina O. et al. Outcomes of cardiovascular magnetic resonance imaging in patients recently recovered from coronavirus disease 2019 (COVID-19). **JAMA cardiology**, v. 5, n. 11, p. 1265-1273, 2020.

QIN, Chuan et al. Dysregulation of immune response in patients with coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. **Clinical infectious diseases**, v. 71, n. 15, p. 762-768, 2020.

RANDO, Halie M. et al. Pathogenesis, symptomatology, and transmission of SARS-CoV-2 through analysis of viral genomics and structure. **Msystems**, v. 6, n. 5, p. e00095-21, 2021.

RESCIGNO, Maria. Dendritic cell functions: Learning from microbial evasion strategies. In: Seminars in immunology. **Academic Press**, 2015. p. 119-124.

RITCHIE, Hannah; Edouard Mathieu, Lucas Rodés-Guirao, Cameron Appel, Charlie Giattino, Esteban Ortiz-Ospina, Joe Hasell, Bobbie Macdonald, Diana Beltekian and Max Roser (2020) - "Coronavirus Pandemic (COVID-19)". Published online at OurWorldInData.org. Retrieved from: '<https://ourworldindata.org/coronavirus>' [Online Resource]

ROBBIANI, Davide F. et al. Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. **Nature**, v. 584, n. 7821, p. 437-442, 2020.

ROSE-JOHN, Stefan; WINTHROP, Kevin; CALABRESE, Leonard. The role of IL-6 in host defence against infections: immunobiology and clinical implications. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, n. 7, p. 399-409, 2017.

SANTOS, Lucas Gomes et al. Prevalence of systemic arterial hypertension and diabetes mellitus in individuals with COVID-19: a retrospective study of deaths in Pernambuco, Brazil. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 117, p. 416-422, 2021.

SARIOL, Alan; PERLMAN, Stanley. Lessons for COVID-19 immunity from other coronavirus infections. **Immunity**, v. 53, n. 2, p. 248-263, 2020.

SCHULTE-SCHREPPING, Jonas et al. Severe COVID-19 is marked by a dysregulated myeloid cell compartment. **Cell**, v. 182, n. 6, p. 1419-1440. e23, 2020.

SCOHY, Anaïs et al. Low performance of rapid antigen detection test as frontline testing for COVID-19 diagnosis. **Journal of Clinical Virology**, v. 129, p. 104455, 2020.

SHROCK, Ellen et al. Viral epitope profiling of COVID-19 patients reveals cross-reactivity and correlates of severity. **Science**, v. 370, n. 6520, p. eabd4250, 2020.

SINHA, Pratik; MATTHAY, Michael A.; CALFEE, Carolyn S. Is a “cytokine storm” relevant to COVID-19?. **JAMA internal medicine**, v. 180, n. 9, p. 1152-1154, 2020.

SNIJDER, Eric J. et al. Ultrastructure and origin of membrane vesicles associated with the severe acute respiratory syndrome coronavirus replication complex. **Journal of virology**, v. 80, n. 12, p. 5927-5940, 2006.

SPIEGEL, Martin et al. Inhibition of beta interferon induction by severe acute respiratory syndrome coronavirus suggests a two-step model for activation of interferon regulatory factor 3. **Journal of virology**, v. 79, n. 4, p. 2079-2086, 2005.

SU, Laura F. et al. Virus-specific CD4+ memory-phenotype T cells are abundant in unexposed adults. **Immunity**, v. 38, n. 2, p. 373-383, 2013.

SU, Shuo et al. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. **Trends in microbiology**, v. 24, n. 6, p. 490-502, 2016.

SUN, M. L. et al. Inhibitors of RAS might be a good choice for the therapy of COVID-19 pneumonia. Zhonghua jie he he hu xi za zhi= Zhonghua jiehe he huxi zazhi= **Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases**, v. 43, p. E014-E014, 2020.

SUNGNAK, Waradon et al. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. **Nature medicine**, v. 26, n. 5, p. 681-687, 2020.

SUZUKI, Yusuke et al. Inflammation and angiotensin II. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 35, n. 6, p. 881-900, 2003.

TAKAHASHI, Takehiro et al. Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes. **Nature**, v. 588, n. 7837, p. 315-320, 2020.

TANAKA, Toshio; NARAZAKI, Masashi; KISHIMOTO, Tadamitsu. Immunotherapeutic implications of IL-6 blockade for cytokine storm. **Immunotherapy**, v. 8, n. 8, p. 959-970, 2016.

TANG, A. N. et al. Detection of novel coronavirus by RT-PCR in stool specimen from asymptomatic child, China. **Emerging infectious diseases**, v. 26, n. 6, p. 1337, 2020.

TANG, Fang et al. Lack of peripheral memory B cell responses in recovered patients with severe acute respiratory syndrome: a six-year follow-up study. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 12, p. 7264-7268, 2011.

TANG, Hui et al. Serologic detection of SARS-CoV-2 infections in hemodialysis centers: a multicenter retrospective study in Wuhan, China. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 76, n. 4, p. 490-499. e1, 2020.

TANG, Ning et al. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. **Journal of thrombosis and haemostasis**, v. 18, n. 4, p. 844-847, 2020.

TAY, Matthew Zirui et al. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 6, p. 363-374, 2020.

TAY, Matthew Zirui et al. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 6, p. 363-374, 2020.

TAYLOR, Peter C. et al. Neutralizing monoclonal antibodies for treatment of COVID-19. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, n. 6, p. 382-393, 2021.

TENFORDE, Mark W. et al. Symptom duration and risk factors for delayed return to usual health among outpatients with COVID-19 in a multistate health care systems network—United States, March–June 2020. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 69, n. 30, p. 993, 2020.

THEVARAJAN, Irani et al. Breadth of concomitant immune responses prior to patient recovery: a case report of non-severe COVID-19. **Nature medicine**, v. 26, n. 4, p. 453-455, 2020.

THOMPSON, Corinne N. et al. COVID-19 Outbreak—New York City, February 29–June 1, 2020. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 69, n. 46, p. 1725, 2020.

TORRES-TAMAYO, Margarita et al. Infección por coronavirus en pacientes con diabetes. **Archivos de cardiología de México**, v. 90, p. 67-76, 2020.

TREGONING, John S. et al. Progress of the COVID-19 vaccine effort: viruses, vaccines and variants versus efficacy, effectiveness and escape. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, n. 10, p. 626-636, 2021.

TRIGGLE, Chris R. et al. COVID-19: learning from lessons to guide treatment and prevention interventions. **Mosphere**, v. 5, n. 3, p. e00317-20, 2020.

UDUGAMA, Buddhisha et al. Diagnosing COVID-19: the disease and tools for detection. **ACS nano**, v. 14, n. 4, p. 3822-3835, 2020.

V'KOVSKI, Philip et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 155-170, 2021.

VABRET, Nicolas et al. Immunology of COVID-19: current state of the science. **Immunity**, v. 52, n. 6, p. 910-941, 2020.

VABRET, Nicolas et al. Immunology of COVID-19: current state of the science. **Immunity**, v. 52, n. 6, p. 910-941, 2020.

VADUGANATHAN, Muthiah et al. Renin–angiotensin–aldosterone system inhibitors in patients with Covid-19. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 17, p. 1653-1659, 2020.

VAN ARKEL, Andreas LE et al. COVID-19–associated pulmonary aspergillosis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 202, n. 1, p. 132-135, 2020.

VAN TAN, Le. COVID-19 control in Vietnam. **Nature immunology**, v. 22, n. 3, p. 261-261, 2021.

VANDERBEKE, Lore et al. Monocyte-driven atypical cytokine storm and aberrant neutrophil activation as key mediators of COVID-19 disease severity. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2021.

VELEZ, Juan Carlos Q.; CAZA, Tiffany; LARSEN, Christopher P. COVAN is the new HIVAN: the re-emergence of collapsing glomerulopathy with COVID-19. **Nature Reviews Nephrology**, v. 16, n. 10, p. 565-567, 2020.

VIVIER, Eric et al. Innate lymphoid cells: 10 years on. **Cell**, v. 174, n. 5, p. 1054-1066, 2018.

VOYSEY, Merryn et al. Single-dose administration and the influence of the timing of the booster dose on immunogenicity and efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine: a pooled analysis of four randomised trials. **The Lancet**, v. 397, n. 10277, p. 881-891, 2021.

WAJNBERG, Ania et al. Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months. **Science**, v. 370, n. 6521, p. 1227-1230, 2020.

WALKER, P. et al. & Cucunuba Perez, Z.(2020). Report 12: The global impact of COVID-19 and strategies for mitigation and suppression.

WALLER, Joseph V. et al. Diagnostic tools for coronavirus disease (COVID-19): comparing CT and RT-PCR viral nucleic acid testing. **American Journal of Roentgenology**, v. 215, n. 4, p. 834-838, 2020.

WALTER, Laura Otto et al. The relationship between peripheral immune response and disease severity in SARS-CoV-2-infected subjects: A cross-sectional study. **Immunology**, v. 165, n. 4, p. 481-496, 2022.

WANG, Dawei et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus–infected pneumonia in Wuhan, China. **Jama**, v. 323, n. 11, p. 1061-1069, 2020.

WANG, Fan et al. Characteristics of peripheral lymphocyte subset alteration in COVID-19 pneumonia. **The Journal of infectious diseases**, v. 221, n. 11, p. 1762-1769, 2020.

WANG, Jann-Tay et al. Clinical manifestations, laboratory findings, and treatment outcomes of SARS patients. **Emerging infectious diseases**, v. 10, n. 5, p. 818, 2004.

WANG, Jin et al. Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts. **Journal of leukocyte biology**, v. 108, n. 1, p. 17-41, 2020.

WANG, Weiqing et al. Care for diabetes with COVID-19: Advice from China. **Journal of Diabetes**, v. 12, n. 5, p. 417-419, 2020.

WANG, Xiaoli et al. Neutralizing antibodies responses to SARS-CoV-2 in COVID-19 inpatients and convalescent patients. **Clinical Infectious Diseases**, 2020.

WANG, Yanqun et al. Kinetics of viral load and antibody response in relation to COVID-19 severity. **The Journal of clinical investigation**, v. 130, n. 10, p. 5235-5244, 2020.

WIERSINGA, W. Joost et al. Pathophysiology, transmission, diagnosis, and treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a review. **Jama**, v. 324, n. 8, p. 782-793, 2020.

WÖLFEL, Roman et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. **Nature**, v. 581, n. 7809, p. 465-469, 2020.

WOO, Patrick CY et al. Longitudinal profile of immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA antibodies against the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid protein in patients with pneumonia due to the SARS coronavirus. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 11, n. 4, p. 665-668, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. COVID-19 Weekly Epidemiological Update, Edition 98, published 29 June 2022. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. SARS-CoV-2 variants, working definitions and actions taken. Disponível em: < <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>>. Acesso em: 21, março de 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Weekly operational update on COVID-19 —1 March 2022. Disponível em: < <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-operational-update-on-covid-19---1-march-2022>>. Acesso em: 18 de março de 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Diagnostic testing for SARS-CoV-2: interim guidance, 11 September 2020. World Health Organization, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Clinical Management of COVID-19: Interim Guidance, 27 May 2020; 13–5. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/332196> [a ccessed June 30, 2022].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. COVID-19 vaccine tracker and landscape. Disponível em: < <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines/>>. Acesso em: 18, março de 2022.

WU, Aiping et al. Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. **Cell host & microbe**, v. 27, n. 3, p. 325-328, 2020.

WU, Fan et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 265-269, 2020.

WU, Hung-Yi; BRIAN, David A. Subgenomic messenger RNA amplification in coronaviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 27, p. 12257-12262, 2010.

WU, Joseph T.; LEUNG, Kathy; LEUNG, Gabriel M. Nowcasting and forecasting the potential domestic and international spread of the 2019-nCoV outbreak originating in Wuhan, China: a modelling study. **The Lancet**, v. 395, n. 10225, p. 689-697, 2020.

WU, Li-xiang et al. Clinical significance of the serum IgM and IgG to SARS-CoV-2 in coronavirus disease-2019. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 35, n. 1, p. e23649, 2021.

WU, Yeshun et al. Nervous system involvement after infection with COVID-19 and other coronaviruses. **Brain, behavior, and immunity**, v. 87, p. 18-22, 2020.

XIANG, Fei et al. Antibody detection and dynamic characteristics in patients with coronavirus disease 2019. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 8, p. 1930-1934, 2020.

XIANG, Tingxiu et al. A novel double antibody sandwich-lateral flow immunoassay for the rapid and simple detection of hepatitis C virus. **International journal of molecular medicine**, v. 30, n. 5, p. 1041-1047, 2012.

YE, Xingnong et al. Low humoral immune response and ineffective clearance of SARS-Cov-2 in a COVID-19 patient with CLL during a 69-day follow-up. **Frontiers in oncology**, v. 10, p. 1272, 2020.

YE, Zheng et al. Chest CT manifestations of new coronavirus disease 2019 (COVID-19): a pictorial review. **European radiology**, v. 30, n. 8, p. 4381-4389, 2020.

YU, Hai-qiong et al. Distinct features of SARS-CoV-2-specific IgA response in COVID-19 patients. **European Respiratory Journal**, v. 56, n. 2, 2020.

YUDANIN, Naomi A. et al. Spatial and temporal mapping of human innate lymphoid cells reveals elements of tissue specificity. **Immunity**, v. 50, n. 2, p. 505-519. e4, 2019.

ZHANG, L. et al. Clinical characteristics of COVID-19-infected cancer patients: a retrospective case study in three hospitals within Wuhan, China. **Annals of oncology**, v. 31, n. 7, p. 894-901, 2020.

ZHANG, Qian et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. **Science**, v. 370, n. 6515, p. eabd4570, 2020.

ZHANG, Yan et al. Coagulopathy and antiphospholipid antibodies in patients with Covid-19. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 17, p. e38, 2020.

ZHAO, Juanjuan et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with novel coronavirus disease 2019. **Clinical infectious diseases**, v. 71, n. 16, p. 2027-2034, 2020.

ZHAO, Juanjuan et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with novel coronavirus disease 2019. **Clinical infectious diseases**, v. 71, n. 16, p. 2027-2034, 2020.

ZHENG, Meijuan et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. **Cellular & molecular immunology**, v. 17, n. 5, p. 533-535, 2020.

ZHOU, Fei et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. **The Lancet**, v. 395, n. 10229, p. 1054-1062, 2020.

ZHOU, Peng et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 270-273, 2020.

ZHOU, Yonggang et al. Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients. **National Science Review**, v. 7, n. 6, p. 998-1002, 2020.

ZHOU, Zhuo et al. Heightened innate immune responses in the respiratory tract of COVID-19 patients. **Cell host & microbe**, v. 27, n. 6, p. 883-890. e2, 2020.

ZHU, Na et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. **New England journal of medicine**, 2020.

ZUO, Yu et al. Neutrophil extracellular traps in COVID-19. **JCI insight**, v. 5, n. 11, 2020.

ANEXOS



ECO F COVID nAb

Teste por fluorescência
para detecção qualitativa
dos anticorpos **neutralizantes**
do SARS-CoV-2

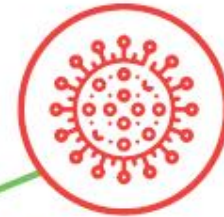
Uso exclusivo nos equipamentos da Linha F-Line
Registo MS: 80954880157



Vigilância
clínica

Imunidade
pós-infecção

Imunidade
pós-vacinação



V1 VARIANTES GRUPO 1

- SARS-CoV-2 (Wuhan)
- 20I / 501Y / V1 (Reino Unido)

V2 VARIANTES GRUPO 2

- 20H/501.V2 (África do Sul)
- 20J / 501Y.V3 (Brasil / Japão)



ECO F COVID nAb

ECO F COVID nAb é um imunoenensaio fluorescente para medição qualitativa de anticorpos neutralizantes circulantes contra SARS-CoV-2 em amostras humanas de soro e plasma. O ECO F COVID nAb deve ser usado com os analisadores F100, F200 e F2400. Este teste é destinado para auxílio na detecção de anticorpos neutralizantes contra o vírus SARS-CoV-2.

PROCEDIMENTO DO TESTE

Preparação da amostra



1. Pipetar 200µL do tampão de extração e transferir para o microtubo (1,5mL).
2. Adicionar 100µL de soro ou plasma ao microtubo contendo o tampão de extração.
3. Dissolver as esferas liofilizadas da pipeta Spoit completamente no tampão de extração.
 - V1 VARIANTES GRUPO 1**
 - Sars-CoV-2 (Wuhan)
 - 201 / 501 Y / V1 (Reino Unido)
 - V2 VARIANTES GRUPO 2**
 - 20H / 501V.2 (África do Sul)
 - 20J / 501Y.V3 (Brasil / Japão)
4. Incubar a amostra + tampão a temperatura de 37±1°C por 20 minutos.

Leitura da amostra

Modo 'Teste Padrão' (Analisadores F100, F200 e F2400)

1. Retire o dispositivo teste do sachê de alumínio e coloque-o sobre uma superfície plana e seca. Escreva as informações do paciente no rótulo branco do dispositivo teste.

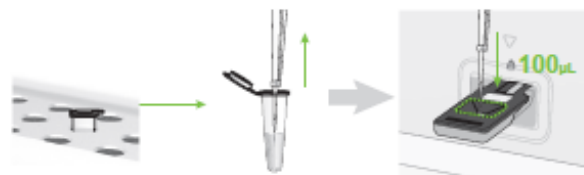
Analisador F2400	Workplace' → 'Run Test' → Inserir ID do paciente/ID do operador no analisador
Analisador F100 e F200	F100 - Standard Test F200 - TESTE PADRÃO' → Inserir ID do paciente/ID do operador no analisador

2. Inserir o dispositivo teste no analisador e selecionar o grupo de variantes correto.

O analisador lê, automaticamente, as informações contidas no código de barras do dispositivo teste para verificar se o dispositivo é válido.



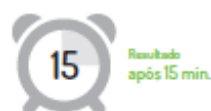
3. Aplicar 100µL da mistura de reação após a incubação, na cavidade da amostra do dispositivo teste.



4. Após aplicar a amostra, pressione imediatamente o botão 'START'.



5. O analisador exibirá automaticamente o resultado do teste após 15 minutos.



ECO F COVID nAb



Leitura da amostra

1. Após realizar o procedimento de preparo das amostras, separar as misturas de reação que foram incubadas.



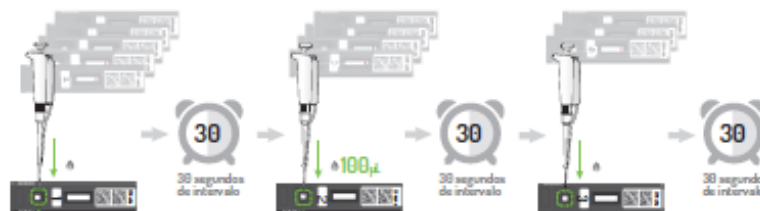
Modo 'Somente Leitura' (Analísadores F100 e F200)

2. Retire o dispositivo teste do sachê de alumínio e coloque-o sobre uma superfície plana e seca. Escreva as informações do paciente no rótulo branco do dispositivo teste.

3. Prepare os dispositivos de acordo com o número de amostras incubadas.



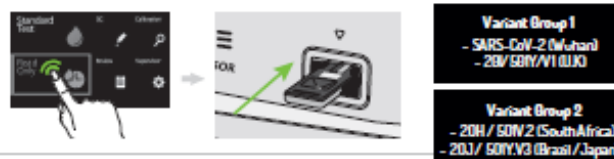
4. Pipetar 100µL da mistura de reação incubada no dispositivo teste com intervalo de 30 segundos.



5. Deixe o dispositivo teste por 15 minutos fora do analisador para incubação.



6. Selecione o modo 'Somente leitura' na tela, selecione o grupo de variantes correto, e insira os dispositivos testes



7. O analisador exibirá automaticamente o resultado do teste.

Interpretação do Resultado

Ensaio Qualitativo

Inibição neutralizante $\geq 20\%$: Positivo e anticorpo neutralizante contra SARS-CoV-2 detectado

Inibição neutralizante $< 20\%$: Negativo e anticorpo neutralizante contra SARS-CoV-2 não detectado

Referências

1. Bureau of Disease Control and Prevention, National Health Commission of China. COVID-19 joint investigation report by China and WHO [in Chinese].
2. Zhou, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579, 270–273 (2020).
3. Tortorici, M.A. & Vesler, D. Structural insights into coronavirus entry. *Adv. Virus Res.* 105, 93–116 (2019).
4. Walls, A. C. et al. Cryo-electron microscopy structure of a coronavirus spike glycoprotein trimer. *Nature* 531, 114–117 (2016).
5. Walls, A. C. et al. Tectonic conformational changes of a coronavirus spike glycoprotein promote membrane fusion. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 114, 11157–11162 (2017).
6. Walls, A. C. et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell* 181, 281–292.e6 (2020).
7. Hoffmann, M. et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* 181, 271–280.e8 (2020).
8. Letko, M., Marzi, A. & Munster, V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat. Microbiol.* 5, 562–569 (2020).



ECO F COVID nAb - FA.0057



ECO F COVID nAb é o imunoenensaio fluorescente para medição qualitativa de anticorpos neutralizantes circulantes contra SARS-CoV-2 em amostras humanas de soro. O ECO F COVID nAb deve ser usado com os analisadores F100, F200 e F2400. Este teste é destinado para auxílio na detecção de anticorpos neutralizantes contra o vírus SARS-CoV-2.

Sumário e Explicação do Teste

A entrada do coronavírus nas células hospedeiras é mediada pela glicoproteína S transmembrana que se projeta da superfície viral. A glicoproteína S compreende duas subunidades funcionais: S1 que é responsável pela ligação aos receptores da célula hospedeira; e S2 que promove a fusão das membranas virais e celulares. A glicoproteína SARS-CoV-2 S foi recentemente demonstrada que, em humanos, a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) é um receptor funcional para SARS-CoV-2. O domínio B da subunidade S1 (SB) é o RBD da glicoproteína S e se liga à ACE2 com alta afinidade, o que possivelmente contribuiu para a atual transmissão rápida do SARS-CoV-2 em humanos. Como a glicoproteína S dos coronavírus medeia a entrada nas células do hospedeiro, é o principal alvo dos anticorpos neutralizantes e o foco dos esforços para desenvolver agentes terapêuticos e vacinas. Os anticorpos neutralizantes desempenham um papel importante na eliminação do vírus e têm sido considerados um produto imunológico chave para proteção ou tratamento contra doenças virais.

Princípio do Teste

ECO F COVID nAb possui duas linhas pré-revestidas, linha controle "C", linha teste "T" na superfície da membrana de nitrocelulose do dispositivo teste. O anticorpo anti-RBD é revestido na região da linha de controle e PEG-estreptavidina é revestido na região das linhas de teste. A proteína RBD conjugada com partículas de európio é usada como detectores para a linha de teste. Durante o teste, a proteína RBD conjugada com partículas de európio interage com os anticorpos neutralizantes SARS-CoV-2 na amostra que faz o complexo anticorpo-RBD ou proteína ACE-2 conjugada com o complexo ACE2-RBD que faz a biotina. O complexo ACE2-Biotina e RBD-Európio migram na membrana por ação capilar até atingir a linha de teste, onde é capturado pelo PEG-estreptavidina. A intensidade da luz fluorescente diminuirá na linha de teste se os anticorpos neutralizantes SARS-CoV-2 estiverem presentes na amostra. A intensidade da luz fluorescente vai variar dependendo da quantidade de anticorpos neutralizantes SARS-CoV-2 presentes na amostra. Se anticorpos neutralizantes SARS-CoV-2 estiverem presentes na amostra, a luz fluorescente aparecerá na linha de teste em proporção inversa à quantidade de anticorpo neutralizante.

Reagentes e Materiais Necessários

1. Cada dispositivo é embalado individualmente e contém:
 - a) Um dispositivo teste.
 - b) Um sachê dessecante com sílica gel.
2. Tampão de extração.
3. Instruções de uso.

Materiais que poderão ser requeridos e não são fornecidos:

1. Cronômetro
2. Centrífuga.
3. Micropipeta automática e ponteiros.
4. Microtubo.

Atenções e Precauções

Use apenas para Diagnóstico *in vitro*

1. A instrução de uso deverá ser lida antes da execução do teste.

2. Não use o teste se o sachê de alumínio estiver danificado ou aberto.
3. Não use os componentes do kit após a data de validade indicada no sachê.
4. Não reutilize o dispositivo teste.
5. Não fume, beba ou coma em áreas em que as amostras ou reagentes do kit estejam sendo manuseados.
6. Observe as precauções estabelecidas contra riscos microbiológicos ao longo do procedimento. Limpe cuidadosamente líquidos derramados utilizando um desinfetante apropriado.
7. Siga os procedimentos padronizados para o descarte apropriado das amostras. Resíduos químicos e biológicos devem ser manuseados e descartados de acordo com todos os regulamentos locais, estaduais e nacionais.
8. Utilize equipamentos de proteção individual como jalecos laboratoriais, luvas descartáveis e óculos de proteção quando estiver manuseando os reagentes e analisando as amostras. Lave bem as mãos após a execução dos testes.
9. Umidade e temperatura podem afetar os resultados de maneira adversa. A sílica dessecante na embalagem absorve umidade impedindo efeitos sobre os produtos.
10. **ATENÇÃO:** Todas as amostras humanas devem ser consideradas potencialmente infectantes. Recomenda-se que os reagentes e as amostras dos pacientes, além do descarte, sejam tratados de acordo com as normas, diretrizes de segurança de risco biológico e regulamentos locais apropriados.

Instruções de Armazenamento e Estabilidade

Armazenar os dispositivos teste entre 2 e 30°C, protegidos da luz. O teste deve permanecer na embalagem selada até o momento do uso. Não congelar. Não armazenar o kit em temperatura superior a 30°C. Deve-se tomar cuidado para evitar contaminação dos componentes do kit. Não usar o kit sob evidência de contaminação microbiológica ou precipitação. Os reagentes do kit são estáveis até a data de validade impressa na embalagem.

Coleta e Manuseio das Amostras

Soro:

- Coletar o sangue total em um tubo comercialmente disponível, NÃO contendo anticoagulantes como heparina, EDTA, citrato de sódio ou oxalato de potássio, por punção venosa. Deixar repousar por 30 minutos para coagulação do sangue. Centrifugar o sangue para obter a amostra de soro.
- As amostras de soro podem ser armazenadas entre 2 e 8°C por até 7 dias após a coleta. Para um armazenamento prolongado, armazenar abaixo de -40°C.
- As amostras devem ser levadas à temperatura ambiente antes da utilização.

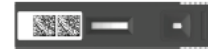
Procedimento

Leia cuidadosamente as instruções de uso antes da realização do procedimento. Levar a amostra e os componentes do teste para a temperatura ambiente, se refrigerados. Verifique a data de validade na parte de trás do sachê de alumínio. Se a data de validade estiver vencida, utilize outro lote.

Abra o sachê de alumínio e verifique o dispositivo teste e sílica gel dentro do sachê de alumínio. Se uma linha colorida violeta (banda de verificação) não aparecer na janela de resultado do dispositivo teste, não a utilize.



Antes do uso

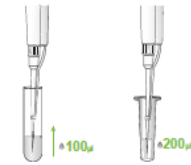


Depois do uso

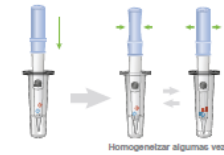
Não escreva no código de barras nem danifique o código de barras do dispositivo teste.

Processamento da amostra

- 1° Passo: Adicionar 100µl de soro e 200µl de tampão de extração em um microtubo.



2° Passo: No microtubo, dissolver as esferas liofilizadas (RBD e ACE-2) da pipeta Spoit (S-Azul) completamente no tampão de extração.



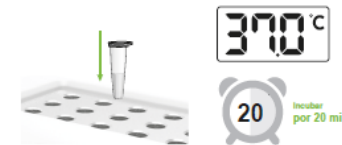
ATENÇÃO!

- Ao homogeneizar com a pipeta Spoit (S-Azul), realize o processo suavemente para minimizar a formação de bolhas de ar.
- Utilize vortex e microtubos spin, se necessário.

3° Passo: Coletar toda a mistura de reação com a pipeta Spoit (S-Azul) e transferir para o microtubo (1,5 mL).



4° Passo: Incubar a mistura de reação a temperatura de 37 ± 1°C por 20 minutos.



Usando um analisador ECO Reader F

Modo "Teste Padrão"

1° Passo: Prepare um analisador ECO Reader F e defina o modo "Teste Padrão" de acordo com o manual do analisador. No caso de utilizar um analisador F2400, vá para "Workplace" na tela principal e selecione "Run Test" para inserir o ID do operador e do paciente. No caso do F100 e F200, selecione a opção "Teste Padrão" e insira o ID do operador e do paciente.

2° Passo: Inserir o dispositivo teste no analisador. O analisador lê, automaticamente, as informações contidas no código de barras do dispositivo teste para verificar se o dispositivo é válido.



3º Passo: Aplicar 100ul da mistura de reação depois de incubada na cavidade da amostra do dispositivo teste.



4º Passo: Após aplicar a amostra, pressione imediatamente o botão 'START'.



5º Passo: O analisador exibirá automaticamente o resultado do teste após 15 minutos.

Modo "Somente Leitura"

1º Passo: Após realizar o procedimento de preparo das amostras, separar as misturas de reação que foram incubadas.



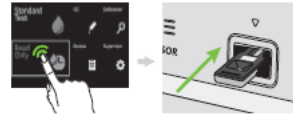
2º Passo: Retire o dispositivo teste do sachê de alumínio e coloque-o sobre uma superfície plana e seca. Escreva as informações do paciente no rótulo branco do dispositivo teste.
3º Passo: Prepare os dispositivos de acordo com o número de amostras incubadas.



4º Passo: Pipetar 100ul da mistura de reação incubada no dispositivo teste com intervalo de 30 segundos.



5º Passo: Deixe o dispositivo teste por 15 minutos fora do analisador para incubação.
6º Passo: Selecione o modo 'Somente leitura' na tela e insira os dispositivos teste em sequência.



7º Passo: O analisador exibirá automaticamente o resultado do teste.

Interpretação do Resultado

Ensaio Qualitativo:

Inibição neutralizante $\geq 20\%$: Positivo e anticorpo neutralizante contra SARS-CoV-2 detectado.

Inibição neutralizante $< 20\%$: Negativo e anticorpo neutralizante contra SARS-CoV-2 não detectado.

Controle de Qualidade

Verificação da calibração dos analisadores ECO Reader F

O teste de calibração dos analisadores ECO Reader F deve ser realizado de acordo com o manual do analisador.

Quando usar o set de calibração

1. Antes de utilizar o analisador pela primeira vez.
2. Quando o analisador cair.
3. Sempre que não concordar com o seu resultado.
4. Quando quiser verificar o desempenho de um analisador e do dispositivo teste.

Como usar o set de calibração

O teste do set de calibração é uma função necessária que garante um bom desempenho, verificando a óptica e as funções do analisador interno.

1. Selecione o menu "Calibração".
2. O set de calibração específico é incluído com o analisador.
3. Insira o CAL-1 primeiro, depois insira o CAL-2 para o teste UV-LED e, em seguida, o CAL-3 para o teste RGB-LED.

Os analisadores ECO Reader F calibram e identificam automaticamente o desempenho óptico através da medição da membrana do dispositivo teste sempre que o teste é conduzido no modo "Teste Padrão". Se a mensagem "EEE" for exibida na tela, isso significa que o analisador tem um problema, portanto, verifique com outro dispositivo teste.

Entre em contato com seu distribuidor local ou a ECO Diagnóstica se a mensagem "EEE" ainda aparecer.

Controle do procedimento interno

1. A zona de controle interna está na extremidade da membrana do dispositivo teste. Os analisadores ECO Reader F lêem o sinal de fluorescência no processo e verificam se o resultado é válido ou inválido.

2. O resultado inválido indica que o sinal de fluorescência não está dentro da faixa pré-definida. Se a tela dos analisadores ECO Reader F exibir "Dispositivo inválido", desligue e ligue o analisador e volte a testar com um novo dispositivo teste.

Desempenho Clínico

O teste foi avaliado em um estudo com 1040 amostras biológicas reagentes e não reagentes testadas em 1040 testes do kit ECO F Covid nAb. As amostras foram consideradas não reagentes se os resultados com o método de referência fossem não reagentes, ou seja, indicassem a ausência de anticorpos anti-coronavírus na amostra. E as amostras foram consideradas reagentes se os resultados com o método de referência fossem reagentes, ou seja, indicassem a presença de anticorpos anti-coronavírus na amostra.

		VNT		Total
		Reagente	Não reagente	
ECO F COVID nAb	Reagente	40	72	112
	Não reagente	0	928	928
Total		40	1000	1040

Sensibilidade: $> 99,9\%$

Especificidade: $97,8\%$

Limitações do Teste

1. Os itens procedimento do teste e interpretação dos resultados devem ser seguidos rigorosamente durante o teste.
2. Os resultados do teste devem ser considerados com outros dados clínicos disponíveis para o médico.
3. Para maior precisão do estado imunológico, testes adicionais de acompanhamento usando outros métodos laboratoriais são recomendados.
4. Falha em seguir o procedimento do teste e na interpretação dos resultados podem afetar adversamente o desempenho do teste e/ou produzir resultados inválidos.

Referência

1. Bureau of Disease Control and Prevention, National Health Commission of China. COVID-19 joint investigation report by China and WHO [in Chinese].
2. Zhou, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature 579, 270–273 (2020).
3. Tortorici, M. A. & Veerler, D. Structural insights into coronavirus entry. Adv. Virus Res. 105, 93–116 (2019).
4. Walls, A. C. et al. Cryo-electron microscopy structure of a coronavirus spike glycoprotein trimer. Nature 531, 114–117 (2016).
5. Walls, A. C. et al. Tectonic conformational changes of a coronavirus spike glycoprotein promote membrane fusion. Proc. Natl Acad. Sci. USA 114, 11157–11162 (2017).
6. Walls, A. C. et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. Cell 181, 281–292.e6 (2020).
7. Hoffmann, M. et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. Cell 181, 271–280.e8 (2020).
8. Letko, M., Marzi, A. & Munster, V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. Nat. Microbiol. 5, 562–569 (2020).

Fabricante: ECO Diagnóstica LTDA.

Avenida Amarante Ribeiro de Castro, 551, Oliveira – Corinto – MG – CEP: 39.200-000
CNPJ 14.633.154/0002-06 - Autorização do MS nº 8.09548-8 - Farmacêutico Resp. Técnico: Vinicius Silva Pereira CRF-MG: 19.800 - Tel.: +55 31 36532025.
contato@ecodiagnostica.com.br – www.ecodiagnostica.com.br

Reg. MS. 80954880157 | Edição: 003/2020, aprovada em 29/12/2020.



TR DPP® COVID-19 IGM/IGG Bio-Manguinhos

TESTE RÁPIDO PARA TRIAGEM QUALITATIVA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS PARA VIRUS SARS-COV-2

(Material fornecido para **20** reações)

Uso em diagnóstico *in vitro*



TR DPP® COVID-19 IGM/IGG Bio-Manguinhos

TESTE RÁPIDO PARA TRIAGEM QUALITATIVA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS PARA VÍRUS SARS-COV-2

(Material fornecido para 20 reações)

Uso em diagnóstico *in vitro*

ATENÇÃO: LEIA CUIDADOSAMENTE ESTE MANUAL ANTES DE INICIAR O TESTE

INDICAÇÃO DE USO:

O TR DPP® COVID-19 IGM/IGG - Bio-Manguinhos é um teste de triagem de uso único, para detectar anticorpos para os vírus SARS-CoV-2 em sangue total venoso, de punção digital, soro ou plasma humano. O teste se baseia na tecnologia de imunocromatografia e utiliza plataforma de duplo percurso. Seu uso é adequado em algoritmos de múltiplos testes para suporte ao diagnóstico da infecção pelo vírus SARS-CoV-2.

Resultados reativos são evidências de exposição ao vírus SARS-CoV-2 e podem ser usados como suporte ao diagnóstico clínico. O TR DPP® COVID-19 IgM/IgG – Bio-Manguinhos é indicado para uso por profissionais capacitados de acordo com as instruções fornecidas.

RESUMO E EXPLICAÇÃO:

Vírus SARS-CoV-2

Os coronavírus são uma grande família de vírus comuns em pessoas e em muitas espécies diferentes de animais, incluindo camelos, gado, gatos, pássaros e morcegos. Existem sete tipos conhecidos de coronavírus humano (HCoV) que causam doenças respiratórias humanas: HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43, HCoV-HKU1, SARS-CoV, MERS-CoV e o novo “doença de coronavírus 2019” (abreviado “COVID-19”).

O COVID-19, descoberto em 2019 em Wuhan, China, é causado pela infecção pelo vírus “SARS-CoV-2”. O quadro clínico completo em relação ao COVID-19 não é totalmente conhecido. As doenças relatadas variaram de muito leves (incluindo algumas sem sintomas relatados) a graves. Os sintomas do COVID-19 são febre, fadiga, tosse e outros sintomas que podem evoluir rapidamente para pneumonia grave, insuficiência respiratória, choque séptico, falência de múltiplos órgãos, entre outros que podem levar a morte.

PRINCÍPIO DO TESTE:

O TR DPP® COVID-19 IgM/IgG - Bio-Manguinhos utiliza uma combinação de antígenos de vírus SARS-CoV-2 ligados a uma membrana (fase sólida), anticorpos específicos e conjugado de proteína A com partículas de ouro coloidal.

A amostra é preparada e em seguida aplicada ao poço "Amostra + Tampão". O tampão propicia o fluxo lateral na direção das duas janelas, promovendo a ligação dos anticorpos aos antígenos (IgM na janela superior e IgG na janela inferior). Após a migração da solução (tampão + amostra) ao longo do suporte de teste, deve-se adicionar o tampão de corrida ao poço 2. O conjugado se liga ao complexo antígeno-anticorpo nas áreas TESTE (T) superior e inferior produzindo uma linha (roxa/rosa) nesta área.

O conjugado se liga aos anticorpos específicos para o vírus SARS-CoV-2 produzindo uma linha (roxa/rosa) na área do TESTE (T). Na ausência de anticorpos para vírus SARS-CoV-2 a linha (roxa/rosa) não aparece na área do TESTE (T). Em ambos os casos, a amostra continua a migrar ao longo da membrana produzindo uma linha (roxa/rosa) na área de CONTROLE (C), o que demonstra o funcionamento adequado dos reagentes.

APRESENTAÇÕES DO PRODUTO

O Kit TR DPP® COVID-19 IgM/IgG - Bio-Manguinhos é fornecido na seguinte apresentação:
TR DPP® COVID-19 IgM/IgG - Bio-Manguinhos – (20 reações)

MATERIAL FORNECIDO:

TR DPP® COVID-19 IgM/IgG - Bio-Manguinhos – 20 reações

Suportes DPP® COVID-19 IgM/IgG com antígenos de COVID-19

embalados individualmente 20 unidades

Tampão de corrida 01 Fr. 9.5 mL

Alças coletoras descartáveis (10 µL) 20 unidades

Tubos para diluição - 20 unidades

Tampas para tubos 20 unidades

Pipetas de transferência (100 µL) 20 unidades

Lancetas estéreis descartáveis 20 unidades

Curativos Adesivos 20 unidades

MATERIAL COMPLEMENTAR:

Micro Leitor DPP®

MATERIAL COMPLEMENTAR NÃO FORNECIDO:

- Cronômetro ou relógio
- Micropipeta calibrada para 10 µL (como alternativa à alça coletora)
- Luvas descartáveis e jaleco para proteção individual
- Algodão
- Álcool 70 %
- Água sanitária ou solução de hipoclorito de sódio a 2,5 %
- Recipiente seguro para descarte de material biológico

CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM DO MATERIAL:

O Kit TR DPP® COVID-19 IgM/IgG - Bio-Manguinhos deve ser armazenado entre 2 °C e 30 °C. Recomenda-se a conservação do Kit em geladeira ou caixa térmica (isopor) somente em locais onde a temperatura ambiente ultrapasse 30 °C. Não congele o Kit ou seus componentes. Os suportes de teste devem permanecer lacrados até o momento de sua utilização. O tampão de corrida deve ser mantido em seu recipiente original.

Caso o Kit seja guardado sob refrigeração assegurar-se de que todos os componentes estejam à temperatura ambiente no momento de sua utilização.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES:

Somente para uso em diagnóstico *in vitro*.

Este conjunto diagnóstico contém produtos biológicos e químicos podendo representar uma fonte de risco. Ao manusear este conjunto, observar as precauções de biossegurança.

A qualidade dos resultados obtidos com este conjunto diagnóstico depende do cumprimento das Boas Práticas de Laboratório, tais como:

O teste deve ser realizado apenas por profissionais capacitados, segundo as instruções contidas neste manual.

- As amostras, assim como outros insumos, devem ser estocadas e manipuladas adequadamente;
- As amostras devem ser homogeneizadas antes do uso;
- Nunca congele amostras de sangue total;
- Equipamentos de proteção individual (EPI), tais como luvas descartáveis e jaleco, devem ser utilizados em todas as etapas de realização do teste;
- Os testes nunca devem ser utilizados após a data de validade;
- Componentes de Kits de lotes diferentes nunca devem ser misturados;
- A integridade dos componentes do Kit sempre deve ser verificada. Em especial, assegurar-se de que a embalagem dos suportes esteja intacta. Caso algum dos componentes do Kit demonstre irregularidade, separe o Kit evitando que seja utilizado e entre em contato com o SAC de Bio-Manguinhos;
- Nunca fracionar os Kits.
- Não adicionar volumes de amostra superiores ao preconizado (10 μ L);
- Não pingar sangue diretamente da ponta do dedo no suporte de teste. Utilizar sempre a alça coletora fornecida no Kit, segundo as orientações abaixo (ver Procedimento do Teste);
- Aguardar 5 minutos e somente após o desaparecimento das cores das linhas T (TESTE) e C (CONTROLE) adicionar o tampão de corrida ao poço 2;

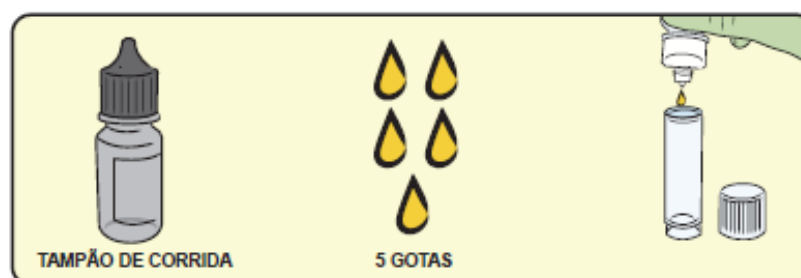
ATENÇÃO: alguns resultados reagentes podem aparecer antes do tempo total de reação, mas é importante a conclusão do tempo para a leitura do resultado.

- Ler os resultados em ambiente bem iluminado.
- Não ler os resultados após 25 minutos da adição do tampão de corrida ao poço 2;
- Após o uso, suportes, ponteiras, lancetas, alças coletoras e luvas devem ser descartadas em água sanitária ou em solução de hipoclorito de sódio a 2,5 %.

COLETA DE AMOSTRA DE SANGUE, SORO OU PLASMA:

O TR DPP® COVID-19 IgM/IgG - Bio-Manguinhos pode ser realizado com amostras de sangue total, soro ou plasma humano.

Antes de coletar a amostra, deve-se preparar o tubo para diluição com 5 gotas (150 μ l) do tampão de corrida.



Coletar a amostra obtida a partir de sangue total, soro ou plasma, com a alça coletora descartável, também fornecida no Kit, ou utilizar micropipeta de 10 µL. Seguir as instruções de procedimentos do teste.

Sangue total: coletar o sangue assepticamente por punção de veia, em tubos contendo EDTA, heparina ou citrato de sódio. Para sangue de punção digital, furar o dedo do paciente com a lanceta fornecida no Kit e desprezar a primeira gota.

Soro: É obtido do sangue total coletado assepticamente por punção de veia com um tubo limpo sem anticoagulante. Deixar o sangue coagular a temperatura ambiente. Centrifugar o sangue a 2000 rpm, durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Separar o soro do coágulo para evitar hemólise.

Plasma: coletar o sangue total com anticoagulante, centrifugar a 2000 rpm, durante 10 minutos, a temperatura ambiente e separar o plasma sobrenadante.

Após a coleta, inserir a amostra de sangue, soro ou plasma no tubo para diluição já preparado com as 5 gotas do tampão de corrida

ATENÇÃO: A INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DEVE SER FEITA APENAS COM O AUXÍLIO DO LEITOR. A INTERPRETAÇÃO VISUAL DEVE SER DESCONSIDERADA

PROCEDIMENTO PARA REALIZAÇÃO DO TR DPP® COVID-19 IGM/IGG - BIO-MANGUINHOS :

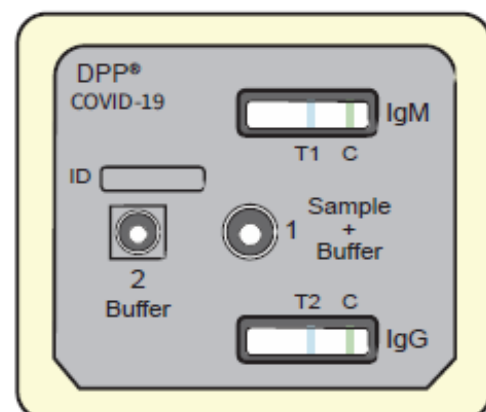
1. Certificar que a amostra a ser testada esteja à temperatura ambiente. Caso a amostra tenha sido refrigerada ou congelada, permitir que a mesma alcance a temperatura ambiente antes de ser testada.

2. Retirar o número necessário de componentes do Kit TR DPP® COVID-19 IgM/IgG - Bio-Manguinhos e colocá-los sobre uma superfície plana. Caso o Kit tenha sido guardado sob refrigeração, certifique-se de que os componentes do Kit estejam à temperatura ambiente no momento do uso.



3. Retirar o suporte de teste do envelope laminado e identificá-lo com o nome do indivíduo ou número de identificação, além do número do lote do Kit de onde o teste foi retirado. Uma vez aberto o envelope laminado, o teste não poderá ser guardado novamente.

4. Verificar a integridade de todos os componentes e a existência de 2 (duas) linhas nas janelas de teste IgM e IgG do suporte, sendo 1 (uma) linha de cor azul (Linha Teste) e 1 (uma) linha de cor verde (Linha Controle). Caso uma ou mais dessas linhas esteja ausente, separar o suporte de teste para que não seja usado e comunicar o ocorrido ao SAC de Bio-Manguinhos. Em seguida, utilizar um novo suporte de teste para continuar o procedimento.



5. Com ajuda da pipeta de transferência inclusa no kit ou micropipeta automática, coletar 100 μ l do tubo de diluição e transferir para o poço 1 (Amostra+Tampão)

Obs.: em caso de coleta de sangue da ponta do dedo, utilizar as lancetas (inclusas no Kit), de acordo com as instruções de uso que as acompanham.

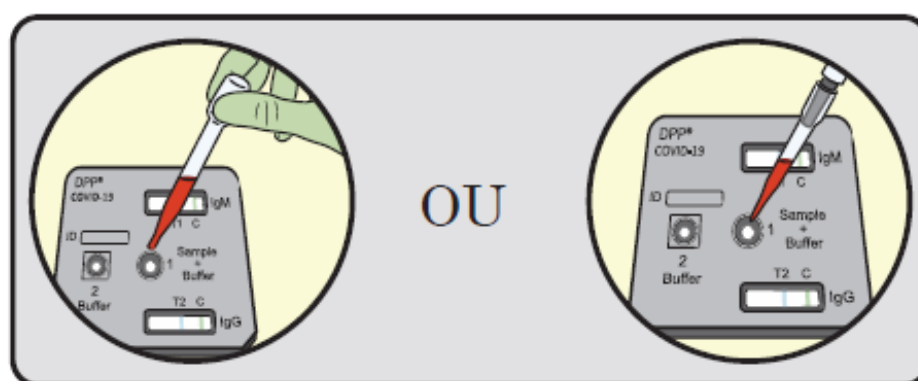
Pressione o bulbo da pipeta de transferência e libere levemente para aspirar a amostra.

Preencha a pipeta até a linha marcada

Observe se a pipeta está preenchida até a linha marcada

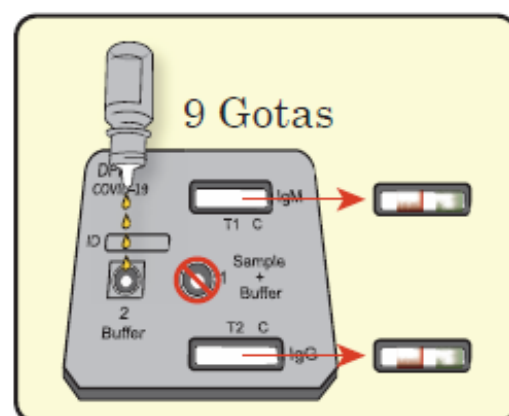
Pressione novamente o bulbo para desprezar a amostra no Poço 1 (Amostra+Tampão)

ATENÇÃO: OS VOLUMES DA AMOSTRA E DE TAMPÃO DEVEM SER RESPEITADAS PARA QUE NÃO OCORRAM FALHAS NO RESULTADO



6. Aguardar 5 (cinco) minutos. Após esse tempo, a linha azul (TESTE) e verde (CONTROLE) da janela devem ter desaparecido. Em caso contrário, descartar o suporte de teste e repetir o procedimento desde o início usando um novo suporte.

7. Verter o frasco de tampão de corrida e mantê-lo na posição vertical (sem inclinar) sobre o poço 2. Adicionar 9 (nove) gotas de tampão, lentamente, ao poço 2.



8. Deixar o teste correr por um período entre 10 e 15 minutos após a adição do tampão ao poço 2 a temperatura ambiente. Caso não haja migração após 3 (três) minutos da adição do tampão ao poço 2, descartar o teste.

A leitura da janela IgM deve ser feita antes da janela IgG

9. Leitura do Teste - Não ler os resultados após 15 minutos da adição do tampão de corrida ao poço 2.

A interpretação do teste deve ser feita com o auxílio do Micro Leitor DPP®

ATENÇÃO: PARA A CORRETA INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS, NÃO EXCEDA O TEMPO DE LEITURA. A LEITURA FORA DO INTERVALO DE TEMPO PRECONIZADO PODE OCASIONAR RESULTADOS EQUIVOCADOS

Leitura com Equipamento – Micro Leitor DPP®

Seguir as instruções de uso do equipamento para obtenção do resultado.

1. Posicione o adaptador para leitor sobre o suporte do teste
2. Insira o MICRO LEITOR DPP® no encaixe sobre a janela IgM (janela superior)
3. Pressione o botão uma única vez: o leitor ligará e apresentará a mensagem “ON”
4. Pressione o botão uma única vez: o leitor apresentará a mensagem “RFID “
5. Posicione o cartão sobre o leitor até ouvir o som. Retire o cartão. O leitor apresentará a mensagem “TEST”
6. Pressione o botão uma única vez; o leitor apresentará a mensagem “RUN “
7. Em aproximadamente 3 segundos, o leitor apresentará o resultado através de uma mensagem onde constará um número. **ANOTE ESSE NÚMERO.** Esse é o valor da intensidade da linha Teste IgM
8. Mova o leitor para o encaixe sobre a janela IgG (janela inferior)
9. Pressione o botão uma única vez: o leitor apresentará a mensagem “RFID”
10. Posicione o cartão sobre o leitor até ouvir o som. Retire o cartão. O leitor apresentará a mensagem “TEST”
11. Pressione o botão uma única vez; o leitor apresentará a mensagem “RUN “
12. Em aproximadamente 3 segundos, o leitor apresentará o resultado através de uma mensagem onde constará um número. **ANOTE ESSE NÚMERO.** Esse é o valor da intensidade da linha Teste IgG
13. Interprete os resultados de acordo com a seção “INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS”

ATENÇÃO: Após a leitura, descartar o suporte, a alça, tubo, pipeta e a lanceta utilizados no teste em um recipiente para descarte de materiais de risco biológico

ATENÇÃO: A INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DEVE SER FEITA APENAS COM O AUXÍLIO DO LEITOR. A INTERPRETAÇÃO VISUAL DEVE SER DESCONSIDERADA

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS:

O sistema DPP COVID-19 IgM/IgG utiliza um algoritmo que inclui valores de corte específicos do ensaio que verifica e confirma a adição de amostras e o procedimento de ensaio adequado. Os resultados serão apresentados se o procedimento de ensaio tiver sido corretamente realizado. Se o procedimento de ensaio não tiver sido efetuado corretamente, os resultados serão apresentados no DPP Micro Leitor como Inválidos, devendo ser efetuado um novo ensaio. Os resultados devem ser interpretados com a ajuda do leitor Micro Leitor DPP®. Em caso de dúvidas na interpretação do teste, separar o suporte e fazer contato com o SAC de Bio-Manguinhos.

Resultado Não Reagente

Um resultado não reagente é indicado uma linha roxa/rosa na área de CONTROLE (C) e nenhuma linha na área de TESTE (T) tanto na janela IgM quanto na janela IgG. Este resultado sugere a ausência de anticorpos para vírus SARS-CoV-2 na amostra e não exclui a possibilidade de infecção pelo vírus SARS-CoV-2. Conforme publicado em “DIRETRIZES PARA DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA COVID-19 – versão 2), o resultado “não reagente” não deve ser utilizado para a confirmação diagnóstica de pacientes com sintomas de início recente. Análises feitas após o sétimo dia do início dos sintomas podem melhorar os parâmetros para o resultado. Neste caso as seguintes mensagens aparecerão no visor do Leitor (onde “##” representa o valor numérico):

<i>IgM X ##/ NEG</i>
<i>IgG X ##/ NEG</i>

Resultado Reagente

A detecção de duas linhas roxa/rosa pelo leitor, uma na área de CONTROLE (C) e outra na área de TESTE (T), indica um resultado reagente. Um teste reagente significa que anticorpos para foram detectados. Um resultado IgM reagente indica uma possível resposta imunológica primária à infecção. Um resultado IgG reagente indica uma possível resposta imunológica secundária à infecção. Um resultado IgM e IgG reagentes indicam uma possível resposta imunológica primária tardia ou início de uma resposta imunológica secundária à infecção. Neste caso as seguintes mensagens aparecerão no visor do Leitor (onde “##” representa o valor numérico):

<i>IgM X ##/ POS</i>
<i>IgG X ##/ POS</i>

ATENÇÃO: Um resultado reagente deve ser confirmado conforme recomendações do MS (Ministério da Saúde).

Resultado Inválido

Uma linha roxa/rosa deve ser identificada na área de CONTROLE (C), independente da presença ou não de linha na área de TESTE (T). Caso uma linha roxa/rosa não seja identificada pelo leitor na área de CONTROLE (C), o teste será considerado inválido. Neste caso a seguinte mensagem aparecer no visor do Leitor:

<i>INV</i>

Um resultado inválido não pode ser interpretado. Separar o material e fazer contato com o SAC de Bio-Manguinhos. Repetir o procedimento de teste com um novo suporte de teste

CONFIRMAÇÃO DE DESEMPENHO DO TESTE:

Ao término do teste, uma linha roxa/rosa aparecerá na área de CONTROLE (C) na janela superior e inferior, tanto nas amostras negativas quanto nas positivas. Esta linha serve de controle interno, confirmando o desempenho adequado do teste.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO:

- O Kit TR DPP® COVID-19 IgM/IgG - Bio-Manguinhos deve ser utilizado segundo as instruções contidas neste manual visando à obtenção de resultados adequados.
- O Kit TR DPP® COVID-19 IgM/IgG - Bio-Manguinhos deve ser utilizado apenas com amostras de sangue total (punção digital ou venosa), soro ou plasma.
- Somente abra o envelope laminado contendo o suporte de teste no momento de sua utilização. Uma vez aberto o envelope laminado, o teste não poderá ser guardado novamente.
- Não utilize kits ou componentes com a data de validade vencida.
- Um resultado reagente sugere a presença de anticorpos para COVID-19 vírus na amostra testada.
- Um resultado não reagente não exclui a possibilidade de exposição ou infecção por COVID-19 vírus, dado que uma resposta imunológica à exposição recente pode levar alguns dias para atingir níveis detectáveis.
- Não é indicado o uso com amostras obtidas de crianças com idade inferior a 2 anos.

ÍNDICES DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE:**SENSIBILIDADE**

O desempenho do TR DPP COVID-19 IgM / IgG foi avaliado usando amostras seriais coletadas de indivíduos sintomáticos. Todos os indivíduos foram confirmados positivos para o novo coronavírus 2019 por RT-PCR. A população positiva consistia em indivíduos residentes em Nova Iorque, 8-21 dias após início dos sintomas e indivíduos residentes na Ásia com 5 -10 dias após início dos sintomas.

DIAS APÓS SURGIMENTO DOS SINTOMAS	NÚMERO DE AMOSTRAS	2019-NCOV RESULTADO RT-PCR	TR DPP COVID-19 IGM/IGG		
			IGM	IGG	ANTICORPO TOTAL
≤6 dias	4	Positivo	1/4=25%	4/4=100%	4/4=100%
7-10 dias	10	Positivo	7/10=70%	6/10=60%	8/10=80%
11-14 dias	4	Positivo	3/4=75%	4/4=100%	4/4=100%
15-18 dias	11	Positivo	11/11=100%	11/11=100%	11/11=100%
19-21 dias	2	Positivo	2/2=100%	2/2=100%	2/2=100%
Total	31	N/A	24/31=77.4%	27/31=87.1%	29/31=93.5%

ESPECIFICIDADE

A concordância negativa do TR DPP COVID-19 IgM/IgG foi avaliada usando amostras coletadas de indivíduos sintomáticos residentes na Ásia e nos Estados Unidos. Os indivíduos, confirmados negativos para o novo coronavírus 2019 por RT-PCR, foram coletados nos dias 3 e 9 após o início dos sintomas. Todos os indivíduos apresentaram resultado não reagente a anticorpos IgM e IgG no sistema DPP COVID-19 IgM/IgG.

NUMERO DE AMOSTRAS	ORIGEM	2019-NCOV RESULTADO RT-PCR	TR DPP COVID-19 IGM/IGG	
			IGM	IGG
21	Asia	Negativo	2/2 = 100%	2/2 = 100%
39	EUA	Negativo	38/39 = 97.4%	36/39=92.3%
TOTAL = 41	x	x	40/41 = 97.6%	38/41=92.7%

REPRODUTIBILIDADE, REPETITIVIDADE E ESTABILIDADE:

As boas práticas de fabricação e laboratoriais, associadas à simplicidade e rapidez na utilização do Kit TR DPP® COVID-19 IgM/IgG - Bio-Manguinhos garantem sua reprodutibilidade, repetitividade e estabilidade, podendo ser utilizado como método seguro e eficaz na detecção de anticorpos específicos para o suporte ao diagnóstico clínico da infecção pelo vírus SARS-CoV-2.

INDICAÇÃO DOS TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO.

O produto deve ser utilizado dentro do prazo de validade determinado pelo fabricante.

O fabricante não se responsabiliza pelos resultados quando os insumos não forem armazenados nas condições determinadas.

O Manual de Instrução deve ser seguido, caso contrário, o fabricante não se responsabiliza pelos resultados obtidos.

O Kit TR DPP® COVID-19 IgM/IgG Bio-Manguinhos somente pode ser processado por técnicos treinados e habilitados.

RAZÃO SOCIAL DO FABRICANTE E SERVIÇO DE ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

Registro MS.: 8.01421-70039

Resp. Tec.: Edimilson Domingos da Silva – CRBio- 2 RJ/ES nº: 21433/02

Fabricado por:

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - Bio- Manguinhos / FIOCRUZ

Av. Brasil, 4365 – CEP: 21040-900 – Rio de Janeiro- RJ

CNPJ: 33.781.055/0001-35 – Indústria Brasileira

Orientações técnicas adicionais a respeito deste produto poderão ser obtidas junto a:

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos -Bio-Manguinhos | FIOCRUZ

CNPJ: 33.781.055/0001-35

Av. Brasil, 4365 – CEP: 21040-900 - Rio de Janeiro - RJ

www.bio.fiocruz.br | SAC.: 08000.210.310 ou sac.reativos@bio.fiocruz.br

Para versão impressa deste manual, entre em contato com o SAC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Universal Precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other bloodborne pathogens in health-care settings. *MMWR* 1988; 37(24):377-388.
2. Portal da Saúde – Ministério da Saúde – www.saude.gov.br.



Celer Finecare SARS-CoV-2 Anticorpo RBD Test

REF: TRQ000115

FINALIDADE E USO DO PRODUTO

O Celer Finecare SARS-CoV-2 Anticorpo RBD Test é um imunoenensaio de fluorescência utilizado em conjunto com os analisadores Finecare (FS 113, FS 114 e FS 205) para detecção rápida e qualitativa do anticorpo RBD do SARS-CoV-2, em amostras de sangue total, soro ou plasma humano.

Os anticorpos RBD SARS-CoV-2 são anticorpos protetores produzidos pelo corpo humano após a inoculação pela vacina para nCoV-2019 ou infecção pelo SARS-CoV-2.

O teste tem como objetivo auxiliar na avaliação da resposta imune humoral adaptativa ao SARS-CoV-2. O teste deve ser utilizado apenas por profissionais de saúde devidamente treinados.

O SARS-CoV-2 pertence ao gênero β . A COVID-19 é uma doença infecciosa respiratória aguda. Pesquisas atuais indicaram que o SARS-CoV-2 se liga ao receptor da célula hospedeira, a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), por meio do RBD da proteína Spike (proteína S), e passa por um processo de fusão da membrana celular. Em seguida, o vírus entra na célula por endocitose, se replica e infecta o corpo.

Foram identificados anticorpos contra SARS-CoV-2 com forte capacidade de neutralização, especialmente se dirigidos contra o RBD. Inúmeras vacinas para COVID-19 estão em desenvolvimento, muitas das quais se concentram em induzir uma resposta imunológica ao RBD.

Somente para uso diagnóstico "IN VITRO"

PRINCÍPIO DE AÇÃO

O Celer Finecare SARS-CoV-2 Anticorpo RBD Test utiliza a metodologia de imunodeteção por fluorescência. O método utiliza o modo de imunodeteção em "sanduíche". Quando uma amostra é adicionada ao poço de reação, proteínas RBD SARS-CoV-2 marcadas com fluorescência se ligam aos anticorpos anti-RBD SARS-CoV-2 presentes na amostra. A mistura migra pela matriz de nitrocelulose da tira de reação por ação capilar e os complexos de anticorpo RBD SARS-CoV-2 circulantes são capturados por outra proteína RBD SARS-CoV-2 imobilizada na tira de teste. Assim quanto maior a concentração de anticorpo RBD SARS-CoV-2 na amostra, mais complexos se formam e se acumulam na tira de reação. A intensidade do sinal de anticorpos fluorescentes detectados pelo Finecare reflete a quantidade de anticorpo RBD SARS-CoV-2 capturados durante a reação indicando sua presença ou ausência, ou seja, resultado reagente ou não reagente. Quanto maior a intensidade do sinal, maior é sua concentração de anticorpos na amostra. A unidade padrão do teste exibida nos

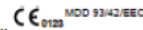
analisadores é Unidade de Fluorescência Relativa (URF, AU/mL).

RELAÇÃO DE COMPONENTES

Apresentação	Sachês (°)	Chip ID	Ponteiras	Solução Tampão	Lanceta Estéril(°)	Álcool Pad	Pipeta pr coleta capilar(°)	IU
TRQ000115_A	5	1	5	5	/	/	/	1
TRQ000115_B	5	1	5	5	5	5	5	1
TRQ000115_C	10	1	10	10	/	/	/	1
TRQ000115_D	10	1	10	10	10	10	10	1
TRQ000115_E	20	1	20	20	/	/	/	1
TRQ000115_F	20	1	20	20	20	20	20	1
TRQ000115_G	25	1	25	25	/	/	/	1
TRQ000115_H	25	1	25	25	25	25	25	1
TRQ000115_I	40	1	40	40	/	/	/	1
TRQ000115_J	40	1	40	40	40	40	40	1

Nota:

(*) Cada sachê contém 1 cassete de teste e um dessecante.



(**) Informação da Lanceta Estéril

(***) Pipeta para coleta capilar.

Material Necessário Não fornecido:

1. Instrumento Finecare (FS 113, FS 114 e FS 205)
2. Centrífuga (amostras soro/plasma)
3. Cronômetro
4. EPI – Equipamentos de proteção para o profissional que irá realizar a coleta/teste (luvas de procedimento, máscara, jaleco e óculos de proteção).

Não contém constituintes de origem humana, porém deve-se seguir as Boas Práticas de Laboratório ao manusear estas substâncias

Composição dos reagentes:

O cassete de teste consiste em uma tira de teste e um cassete de plástico. A tira de teste inclui: membrana de nitrocelulose, almofada para amostra, almofada conjugada, papel absorvente e placa de PVC. Membrana de nitrocelulose revestida com RBD, anticorpos policlonais anti-IgY de galinha; A almofada do conjugado contém proteína RBD recombinante e anticorpo IgY de galinha.

Não contém constituintes de origem humana, porém deve-se seguir as Boas Práticas de Laboratório ao manusear estas substâncias.

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

Armazenar o Celer Finecare SARS-CoV-2 Anticorpo RBD Test entre 4°C a

30°C, dentro da embalagem original fechada. Todos os componentes do kit quando mantidos nas condições de armazenamento indicadas são estáveis até a data de validade impressa no rótulo da embalagem.

O cassete de teste deve ser utilizado no prazo máximo de uma hora após ser retirado da embalagem.

AMOSTRAS

Utilizar soro, plasma ou sangue total, o anticoagulante recomendado é o EDTA ou heparina.

Coleta de sangue por punção capilar:

1. Limpe a área do dedo a ser perfurada com álcool. Deixe secar bem.
2. Use uma lanceta estéril, perfure a pele bem no centro do dedo. Aplique uma pressão suave ao lado do ponto da punção para que uma gota de sangue escape. Limpe a primeira gota de sangue. Permita que uma nova gota de sangue se forme. Se o fluxo sanguíneo for inadequado, massageie gentilmente o dedo do paciente para produzir uma gota com volume suficiente.
3. Coletar 20 µL de sangue capilar utilizando a pipeta descartável. A amostra coletada por punção capilar não pode ser armazenada e deve ser analisada imediatamente.

Coleta de sangue por punção venosa:

1. Seguir os procedimentos padronizados para a coleta de punção venosa de sangue total com um tubo de coleta de sangue contendo anticoagulante adequado (recomenda-se o uso de EDTA ou heparina).
2. É recomendado que a amostra seja analisada imediatamente após a coleta. Não deixe a amostra em temperatura ambiente por período prolongado. Se não puder analisar a amostra imediatamente, deve-se armazená-la de 2-8 °C.
3. Não é adequado analisar amostra de sangue que ficou armazenada 2-8 °C por mais de 3 dias.

Coleta de soro ou plasma:

1. Seguir os procedimentos padronizados para a coleta de punção venosa de sangue total com um tubo de coleta de sangue contendo anticoagulante adequado (recomenda-se o uso de EDTA ou heparina).
2. Separe o soro/plasma do sangue o mais rápido possível a fim de evitar a hemólise.
3. O teste deve ser realizado em até 8 horas após a amostra ser coletada. Não deixe a amostra em temperatura ambiente por período prolongado. As amostras podem ser armazenadas de 2-8°C por até 7 dias. Durante longos períodos de armazenamento, as amostras devem ser mantidas abaixo de -20 °C.

Nota: Apenas as amostras não hemolisadas podem ser utilizadas. As amostras congeladas devem ser mantidas em temperatura ambiente para que sejam completamente descongeladas e bem



homogeneizadas antes da execução do teste. As amostras não devem ser congeladas e descongeladas repetidamente.



Amostras de sangue e produtos do sangue são fontes de agentes infecciosos em potencial. Manuseie todos os produtos do sangue e componentes do teste com cuidado. Luvas e roupas de proteção são recomendadas. Ao realizar a manutenção e procedimentos para solução de problemas no analisador, também use proteção para os olhos.

MANIPULAÇÃO DA AMOSTRA

A manipulação correta das amostras é fundamental para garantir que os resultados obtidos sejam precisos.

É recomendável o uso de EPI's (jaleco manga longo com punho, óculos de proteção, luvas descartáveis, máscaras, entre outros) a fim de reduzir ou eliminar a exposição individual a agentes potencialmente infecciosos.

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

Consulte o Manual do Usuário do Finecare para instruções completas da utilização do analisador. O teste deve ser executado em temperatura ambiente. Se o kit estiver refrigerado, todos os componentes devem ser estabilizados em temperatura ambiente antes de ser utilizado.

- 1) Certifique-se de que o cassete de teste e todos os componentes do kit e amostras estejam em temperatura ambiente (10° C ~30° C).
- 2) Certifique-se que o número do lote dos componentes e do ID chip são idênticos.
 - Para sangue total por punção venosa/soro/plasma:
 - ✓ Pipete 20 µl de sangue total venoso, soro ou plasma e transfira para o tubo contendo a solução tampão. Homogeneize aproximadamente 30 segundos.
 - Para sangue total por coleta capilar:
 - ✓ Transfira 20 µL da amostra de sangue total obtida por coleta capilar diretamente da pipeta de coleta para o tubo contendo solução tampão. Homogeneize aproximadamente 30 segundos.
- 3) Retire o cassete da embalagem e coloque-o em uma superfície plana.
- 4) Pipete 75µL (setenta e cinco microlitros) da mistura da amostra com o tampão homogeneizado e transfira para o cassete de teste.
- 5) "Teste Padrão": Insira o cassete no suporte de cassete e pressione "Test". O tempo de reação é de 15 minutos. Após este período o resultado aparecerá na tela. Para imprimir pressione

"Print".

- 6) "Teste Rápido": Coloque o cassete de teste na plataforma de operação. Cronometre 15 (quinze) minutos. Após os 15 (quinze) minutos insira o cassete no suporte de cassete e pressione "Test". O resultado aparecerá em seguida na tela. Para imprimir pressione "Print".

Procedimento para análise de sangue total por punção capilar:



INTERPRETAÇÃO DO RESULTADO

O resultado do teste irá aparecer na tela do analisador Finecare automaticamente:

Resultado	Título de Diluição	Interpretação
< 1 AU/mL Não Reagente	< 1:20	Anticorpos RBD SARS-CoV-2 não detectados. Negativo. Ausência de anticorpos capazes de gerar uma neutralização viral de 50%.
≥ 1 ~ 20 AU/mL Reagente	1:20 ~ 1:160	Anticorpos RBD SARS-CoV-2 detectados. Presença, em títulos baixos, de anticorpos capazes de gerar uma neutralização viral de pelo menos 50%.
≥ 20 AU/mL Reagente	> 1: 160	Anticorpos RBD SARS-CoV-2 detectados. Presença, em títulos altos, de anticorpos capazes de gerar uma neutralização viral de pelo menos 50%.
Inválido		Quando o visor indicar

		"Sem amostra ou volume insuficiente de amostra", significa que o teste está inválido e deve ser repetido
--	--	--

CONTROLE DE QUALIDADE

Um controle de qualidade interno está incluído no teste. Uma linha colorida que aparece na região de controle (C) é considerada um controle de qualidade interno. Este controle confirma que o volume de amostra é suficiente, que houve absorção adequada da membrana e a técnica correta do procedimento.

As boas práticas de laboratório recomendam o uso de materiais de controle. Embora haja uma linha de controle de procedimento interno no dispositivo de teste, o uso de controle de qualidade é recomendado para verificar o desempenho do teste.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- O resultado do Celer Finecare SARS-CoV-2 Anticorpo RBD Test deve ser avaliado por um profissional qualificado aliado aos dados clínicos do paciente em conjunto com outros resultados de exames laboratoriais.
- Produto desenvolvido para detecção de anticorpos RBD SARS-CoV-2 em amostras humanas de sangue total, soro ou plasma.
- Ensaio qualitativo. Não foi desenvolvido para determinar a concentração de anticorpos RBD SARS-CoV-2.
- A precisão do teste depende do processo de coletas de amostras. A coleta inadequada de amostra, coletada fora do prazo recomendado, armazenamento inadequado ou congelamento e descongelamento repetidos da amostra afetarão o resultado do teste.
- Limitações na detecção de anticorpos podem ocorrer devido à metodologia, para resultados negativos onde há suspeita de infecção ou paciente já vacinado recomenda-se o uso de outros métodos para confirmação.
- Se o hematócrito do sangue total for <30% ou >60%, pode causar resultados incorretos.
- Um resultado não reagente pode ser causado por: 1) coleta inadequada de amostras, transferência ou distribuição inadequada de amostras, ou título de anticorpos na amostra é muito baixo; 2) variações nos genes virais podem causar alterações nos determinantes dos anticorpos.
- Um resultado positivo não pode excluir completamente o risco de infecção por coronavírus (2019-nCoV).



CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

A. Sensibilidade e Especificidade

Um total de 246 amostras coletadas de indivíduos positivos e negativos para nCoV-2019 em um teste de PCR (63 positivos e 183 negativos) foram testados com o Celer Finecare SARS-CoV-2 Anticorpo RBD Test. As amostras positivas foram testadas após 7 dias do diagnóstico pelo PCR. Os resultados da sensibilidade e especificidade entre os dois métodos são mostrados abaixo:

		PCR		Total
		Positivo	Negativo	
Celer Finecare SARS-CoV-2 Anticorpo RBD Test	Positivo	61	1	62
	Negativo	2	182	184
Total		63	183	246

Sensibilidade: 96.83 % (95 % CI: 89.00 %~99.61 %)

Especificidade: 99.45 % (95%CI: 96.99 %~99.99 %)

Total consistente: 98.78 % (95%CI: 96.48 %~99.75 %)

B. Correlação dos Resultados x Capacidade de Neutralização

O Celer Finecare SARS-CoV-2 Anticorpo RBD Test foi comparado ao Ensaio de Neutralização de Pseudovírus. As tabelas a seguir mostram a correlação entre o NtAb50 * do Ensaio de Neutralização de Pseudovírus e os resultados do teste.

		Ensaio de Neutralização de Pseudovírus			Total
		< 1:20	1:20 ~1:60	≥ 1:160	
Celer Finecare SARS-CoV-2 Anticorpo RBD Test	< 1 AU/mL	21	0	0	21
	1~20 AU/mL	1	8	0	9
	> 20 AU/mL	0	0	26	26
Total		22	8	26	56

* NtAb50 = Títulos de anticorpos em 50% de neutralização viral:

Título de Diluição	Resultado	Interpretação do Resultado
< 1:20	Negativo	Ausência de anticorpos capazes de gerar uma neutralização viral de 50%.
1:20 ~ 1:60	Título Baixo	Presença, em títulos baixos, de anticorpos capazes de gerar uma neutralização viral de pelo menos 50%.
≥ 1:160	Título Alto	Presença, em títulos altos, de anticorpos capazes de gerar uma neutralização

viral de pelo menos 50%

C. Reação Cruzada

Amostras contendo os anticorpos listados abaixo foram testadas e não apresentaram reação cruzada com o Celer Finecare SARS-CoV-2 Anticorpo RBD Test:

Anticorpos de Vírus Parainfluenza
Anticorpos Influenza A
Anticorpos Influenza B
Anticorpos Chlamydia pneumonia
Anticorpos Mycoplasma pneumoniae
Anticorpo Adenovírus
Anticorpo VSR
Anticorpo Superfície Hepatite B
Anticorpo Vírus Hepatite C
Anticorpo Treponema pallidum
Anticorpo HIV
Anticorpo vírus EB
Anticorpo vírus Sarampo
Anticorpo Citomegalovírus
Anticorpo Enterovírus tipo 71
Anticorpo Caxumba
Anticorpo Vírus Varicella-Zoster

D. Interferentes

Amostras testadas a seguir não tiveram impacto com o resultado do Celer Finecare SARS-CoV-2 Anticorpo RBD Test, até as seguintes concentrações:

Substância	Concentração
Bilirrubina	250 µmol/L
Hemoglobina	1 g/L
Triglicédeos	3000 mg/dL
Fator Reumatoide	100 IU/mL
Colesterol	1000 mg/dL

E. Efeito gancho

Não houve efeito gancho nos resultados deste teste, na faixa titulada de amostras clinicamente positivas para anticorpos RBD SARS-CoV-2.

F. Precisão

Precisão intraensaio e interensaio: CV ≤ 10%.

TRANSPORTE

O Celer Finecare SARS-CoV-2 Anticorpo RBD Test não é afetado pelo transporte desde que seja entregue ao destinatário nas condições de

temperatura descritas no rótulo da embalagem.

DESCARTE

Para o descarte seguro dos cassetes de testes e materiais biológicos seguir as regulamentações normativas locais, estaduais e federais.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Ismail A A A. ANNALS EXPRESS: Serological tests for Covid 19 antibodies: limitations must be recognized [J]. Annals of Clinical Biochemistry, 2020, 57(4):000456322092705.
- [2] Nie J, Wu X, Ma J, et al. Development of in vitro and in vivo rabies virus neutralization assays based on a high titer pseudovirus system[J]. Rep, 2017, 7:42769.
- [3] Liu S, Song D, Bai H, et al. A safe and reliable neutralization assay based on pseudovirus to measure neutralizing antibody titer against poliovirus[J]. Journal of Medical Virology, 2017, 89(12).



Fabricado por:

Guangzhou Wondfo Biotech Co., Ltd.
N° 8 Lizhishan Road, Science City, Luogang District,
510663, Guangzhou, P. R. China.

Importado e Distribuído por:

Celer Biotecnologia S/A

CNPJ: 04.846-613/0001-03

Rua Padre Eustáquio 1.133, subloja 11

Carlos Prates – CEP: 30.710-580

Belo Horizonte/MG – Brasil.

Responsável Técnico: Kênia Magalhães

CRBM/3:5285

Serviço de Atendimento ao Cliente:

(31) 3413 0814

e-mail: sac@celer.ind.br

Registro Nº: MS80537410092

Código: ACS00165

Data: 18/05/2021

Revisão:01.001

Wondfo 2019-nCoV RBD Antibody Rapid Test

INTENDED USE

The 2019-nCoV RBD antibodies are protective antibody produced by the human body after inoculation with 2019-nCoV vaccine or infection with 2019-nCoV.

The test is intended as an aid to assess the adaptive humoral immune response to the 2019-nCoV.

For *in vitro* diagnostic use only. For professional use only.

SUMMARY

The 2019-nCoV belong to the β genus. COVID-19 is an acute respiratory infectious disease. People are generally susceptible.

The current research has found that the 2019-nCoV binds to their host cell receptor, angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) through RBD from the spike protein (S protein), and undergoes a process of cell membrane fusion. Then the virus enters the cell through endocytosis, replicates and infects the body.

Antibodies against 2019-nCoV with strong neutralizing capacity, especially potent if directed against the RBD, have been identified. Numerous vaccines for COVID-19 are in development, many of which focus on eliciting an immune response to the RBD.

PRINCIPLE

2019-nCoV RBD Antibody Rapid Test is based on the principle of double antigen sandwich immunoassay for determination of 2019-nCoV RBD antibodies in human whole blood, serum and plasma specimen.

Add specimens into the sample well to initial a test. When the 2019-nCoV RBD antibodies level in the specimen is at or above the detection limit of the test, the RBD antibodies bound to the colloidal gold labeled 2019-nCoV recombinant antigen and form an immune complexes which are captured by RBD immobilized in the Test Region (T) of the nitrocellulose membrane, and this produces a colored test band that indicates a positive result. When the 2019-nCoV RBD antibodies level is zero or below the detection limit, there is no visible colored band in the Test Region (T) of the device. This indicates a negative result.

To serve as a procedure control, a colored line will appear at the Control Region (C), if the test has been performed properly.

PRECAUTION

1. This kit is for *in vitro* diagnostic use only.
2. Sealed pouch contains Desiccant pouch, which is for storage purposes only, and is not used in test procedure.
3. All specimens should be treated as capable of transmitting diseases. Use appropriate precautions in the collection, handling, storage and disposal of testing samples and used kit contents. And follow biosafety level 2 or higher guidelines.
4. Wear appropriate personal protective equipment (e.g. medical gloves, medical mask, goggles and lab coat) when handling the contents of this kit.
5. Proper specimen collection, storage and transport are critical to the performance of this test.
6. Discard after first use. The test cannot be used more than once.

7. Avoid excessively high temperature in the testing environment. Test Cassettes and Detection Buffer stored at low temperature need to be returned to room temperature before opening to avoid moisture absorption.
8. Do not touch the reaction area of test strip.
9. Do not use test kit beyond the expiration date.
10. The Test Cassette should remain in its original sealed pouch until use. Do not use the kit if the pouch is punctured or not well sealed.
11. Do not use damaged or stained detection buffer tube.
12. Testing should be applied by professional trained staff working in certified laboratories or clinics at which the specimen(s) is taken by qualified medical personnel.
13. The test result should be interpreted by the physician along with clinical findings and other laboratory test results.
14. DISPOSAL OF THE DIAGNOSTIC: All specimens and the used kit has the infectious risk. The process of disposing the diagnostic must follow the local infectious disposal law or laboratory regulation.
15. If you have questions or suggestions during the use of this reagent, please contact the manufacturer.

MATERIAL


Material Provided

REF	Sealed pouches [*]	Disposable Droppers	Detection Buffer ^{**}	Sterile Lancet ^{***}	Alcohol Pad	IFU
W832P0002	2	2	2*200 μ L	2	2	1
W832P0003	5	5	5*200 μ L	5	5	1
W832P0004	10	10	10*200 μ L	10	10	1
W832P0005	20	20	20*200 μ L	20	20	1
W832P0006	10	10	1*6 mL	/	/	1
W832P0007	20	20	2*6 mL	/	/	1
W832P0008	25	25	25*200 μ L	25	25	1
W832P0009	40	40	40*200 μ L	40	40	1
W832P0010	25	25	2*6 mL	/	/	1
W832P0011	40	40	4*6 mL	/	/	1

Note:

*each sealed pouches containing: 1 Test Cassette and 1 Desiccant Pouch

** There are two types of Detection Buffer: buffer in a capsule (200 μ L/capsule) and buffer in a dropper bottle (6 mL/bottle).

*** CE information of Sterile Lancet:  MDD 93/42/EEC 0123

Reactive ingredients of main components

The test cassette consists of test strip and plastic cassette. The test strip includes: nitrocellulose membrane, sample pad, conjugated pad, absorbent paper and PVC board. Nitrocellulose membrane is coated with RBD, anti-rabbit IgG polyclonal antibodies; Conjugate pad contains 2019-nCoV recombinant antigen and rabbit IgG.

Note: To ensure the accuracy of test results, components in different lots cannot be mixed-used.

Material Required but Not Provided

1. Specimen Collection Containers
2. Centrifuge (for serum/plasma specimen)
3. Timer
4. Personal protective equipment, such as medical gloves, medical mask, goggles and lab coat.
5. Appropriate biohazard waste container and disinfectants.

STORAGE AND STABILITY

1. Store at 2~30°C in the sealed pouch up to the expiration date printed on the package. Do not freeze.

2. The test cassette should be used within 1 hour after taking out from the foil envelope. Buffer solution should be re-capped in time after use.
3. Keep away from sunlight, moisture and heat.
4. Kit contents are stable until the expiration date printed on the outer box.
5. The production date is printed on the outer box.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

The test can be performed with fingerstick Whole Blood, venous whole blood, serum and plasma.

For Fingerstick Whole Blood:

1. Clean the area to be lanced with an alcohol pad. Allow the finger to dry thoroughly.
2. Use a sterile lancet, puncture the skin just off the center of the finger pad. Apply gentle pressure beside the point of the puncture. Wipe away the first drop of blood. Allow a new drop of blood to form. If blood flow is inadequate, the subject's finger may have to be gently massaged at the finger base to produce a droplet of sufficient volume.
3. Draw 20 μ L of finger blood with the disposable dropper. Whole blood specimen collected by fingerstick should be tested immediately.

For Venous Whole Blood:

1. According to standard venous blood collection procedure, collect a venipuncture whole blood specimen using a blood collection tube with suitable anticoagulant (containing EDTA or Heparin). **Other anticoagulants have not been validated and may give incorrect result.**
2. It is recommended that whole blood specimen is tested at the time of specimen collection. If the specimens are not tested immediately, they may be stored at 2~8°C for up to 3 days. Prior to testing, mix the blood by gentle inversion several times, do not freeze or heat whole blood specimens.

For Serum and Plasma:

1. According to standard venous blood collection procedure, collect a venipuncture whole blood specimen using a blood collection tube. If collecting plasma use a blood collection tube containing suitable anticoagulant (containing EDTA or Heparin). **Other anticoagulants have not been validated and may give incorrect result.**
2. Separate the serum/plasma from blood as soon as possible to avoid hemolysis.
3. Test should be performed within 8 hours after the specimens have been collected. Do not leave the specimens at room temperature for prolonged periods.
4. If the specimens are not tested within 8 hours, they should be kept at 2~8°C for up to 7 days. For storage more than 7 days, specimens should be kept below -20°C for long time.

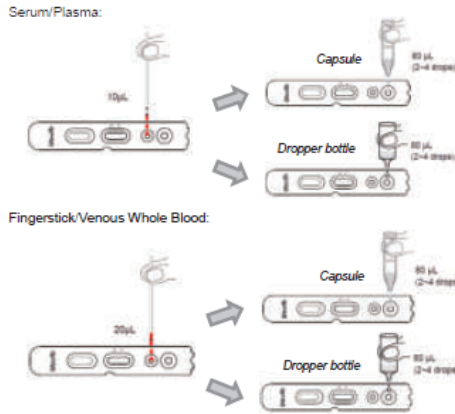
Note: Bring specimens to room temperature before testing. Frozen specimens must be completely thawed and mixed well prior to testing. Specimens should not be frozen and thawed repeatedly. Severe hemolytic or heat-inactivated specimens are not recommended.

TEST PROCEDURE

Please read the instruction for use carefully before performing the test.

1. Allow the device, buffer and specimen to equilibrate to room temperature prior to testing.
2. Remove a test cassette from the sealed pouch by tearing at the notch and place it on a level surface.
3. Add 10 μ L serum/plasma or 20 μ L (1 drop) fingerstick/venous whole blood specimen into the sample well (small well) with the disposable dropper, and then add 80 μ L (2~4 drops) detection buffer (in a dropper bottle or capsule) into the buffer well (large well) as the below picture shows.
4. As the test begins to work, you will see purple color move across the result window in the center of the test device.
5. Wait for 15 minutes and read the results.

Note: Results after more than 30 minutes may be not accurate and should not be read.



RESULT INTERPRETATION

Positive Result

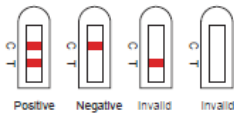
Colored band appear at both test line (T) and control line (C). It indicates that the concentration of the 2019-nCoV RBD antibodies at or above the detection limit of the test.

Negative Result

Colored band appears only at control line (C). It indicates that the concentration of the 2019-nCoV RBD antibodies is zero or below the detection limit of the test.

Invalid Result

No visible colored band appear at control line after performing the test. The directions may not have been followed correctly. Pay particular attention to whether the sample volume is sufficient. It is recommended that the specimen be re-tested.



QUALITY CONTROL

A procedural control is included in the test. A colored line appearing in the control region (C) is considered an internal procedural control. It confirms sufficient liquid volume, adequate membrane wicking and correct procedural technique.

Good laboratory practice recommends the use of the control materials. Users should follow the appropriate federal state, and local guidelines concerning the frequency of assaying external quality control materials.

LIMITATIONS OF PROCEDURE

1. This reagent is designed to detect RBD antibodies against 2019-nCoV in human whole blood, serum or plasma specimen.
2. The accuracy of the test depends on the specimen collection process. Improper specimen collection, improper specimen storage, or repeated freezing and

thawing of the specimen will affect the test result.

3. This reagent is a qualitative assay. It is not designed to determine the quantitative concentration of 2019-nCoV RBD antibodies. If you need to test the quantitative concentration, please use the relevant professional instruments.
4. A positive result cannot completely rule out the risk of infection with the coronaviruses (2019-nCoV).
5. Limited by the method of antibody test reagents, for negative test results, it is recommended to use other methods for review and confirmation.
6. A negative result of this reagent can be caused by:
 - 1) improper specimen collection, improper specimen transfer or handing, the antibodies titer in the specimen is too low;
 - 2) variations in viral genes may cause changes in antibodies determinants.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

A. Sensitivity and Specificity

A total of 238 samples retrospectively collected from 2019-nCoV PCR positive and negative individuals (65 positive and 173 negative) were tested with the 2019-nCoV RBD Antibody Rapid Test.

The sampling date of positive samples were both more than 7 days after diagnosis with PCR.

Reagents	PCR		Total
	Positive	Negative	
2019-nCoV RBD Antibody Rapid Test	Positive	62	63
	Negative	3	175
Total	65	173	238

Sensitivity: 95.38% (95%CI: 87.29%~98.42%)
 Specificity: 99.42% (95%CI: 98.80%~99.90%)
 Overall agreement: 98.32% (95%CI: 95.76%~99.34%)

B. Correlation of test results to serum neutralization capacity

The 2019-nCoV RBD Antibody Rapid Test was compared to The Pseudovirus Neutralization Assay. The following tables show the correlation between NtAb50* of Pseudovirus Neutralization Assay and results of the 2019-nCoV RBD Antibody Rapid Test.

Reagents	Pseudovirus Neutralization Assay			Total
	<1:20	1:20~1:160	≥1:160	
2019-nCoV RBD Antibody Rapid Test	Negative	20	1	21
	Positive	1	6	31
Total	21	7	24	52

*NtAb50= Antibody titers resulting in 50% virus neutralization:

Dilution Titer	Result	Test Result Interpretation
< 1:20	Negative	Neutralizing antibodies for 2019-nCoV are not detected at 50% virus neutralization.
1:20~1:160	Low titer	Low neutralizing antibodies for 2019-nCoV are detected at 50% virus neutralization.
>1:160	High titer	High neutralizing antibodies for 2019-nCoV are detected at 50% virus neutralization.

C. Cross-reactivity

Cross-reactivity of the 2019-nCoV RBD Antibody Rapid Test was evaluated using specimens containing the antibodies listed below. The results showed no cross

reactivity with the following:

Parainfluenza virus antibodies	Treponema pallidum antibodies
Influenza A antibodies	HIV antibodies
Influenza B antibodies	EB virus antibodies
Chlamydia pneumonia antibodies	Measles virus antibodies
Mycoplasma pneumoniae antibodies	Cytomegalovirus antibodies
Adenovirus antibodies	Enterovirus type 71 antibodies
Respiratory syncytial virus antibodies	Mumps antibodies
Hepatitis B surface antibodies	Varicella-zoster virus antibodies
Hepatitis C virus antibodies	

D. Interference

The test result of 2019-nCoV RBD Antibodies Test were not be interfered with the substance at the following concentration:

Substance	Concentration
Bilirubin	250 µmol/L
Hemoglobin	9 g/L
Triglyceride	15 mmol/L
Rheumatoid factors	80 IU/mL
Antinuclear antibodies (ANA) titer	1:240
Ant-mitochondrial antibodies (AMA)	80 U/mL
HAMA	1000 µg/mL

E. Hook effect

Within the titer range of clinically positive specimens of 2019-nCoV RBD antibodies, there was no hook effect in the test results of this product.

F. Precision

1. Within-run Precision was determined by testing separately two positive specimens in 10 times. The agreement rate was 100%.
2. Between-run Precision was determined by testing three different specimens including positive and negative in 3 different lots of test devices. The negative agreement rate and the positive agreement rate were 100%.

BIBLIOGRAPHY

- [1] Burton, D. R. Antibodies, viruses and vaccines. Nat. Rev. Immunol. 2,706–713 (2002).
- [2] Klasse, P. J. Neutralization of virus infectivity by antibodies: old problems in new perspectives. Adv. Biol. <https://doi.org/10.1155/2014/157895> (2014)

INDEX OF SYMBOL

In Vitro Diagnostic Use	See Instruction for Use	Expiry Date	Manufacturer
Tests per Kit	Manufacturing Date	Keep Dry	Do not reuse
Lot	Batch Number	Authorized Representative	Keep away from Sunlight
Store between 2~30°C	Catalog #		

Guangzhou Wondfo Biotech Co., Ltd.
 No.8 Lizhishan Road, Science City,
 Luogang District,510663, Guangzhou,
 P.R.China

Qarad BV
 Ciplastraat 3
 2440 Geel, Belgium

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Determinação da evolução cronológica de IgM e IgG em pacientes com SARS-CoV-2 e aplicação clínica dos ensaios rápidos de detecção combinada IgM-IgG e de detecção antigênica

Pesquisador: Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz

Área Temática: A critério do CEP

Versão: 2

CAAE: 30428720.3.0000.5091

Instituição Proponente: Instituição Instituto René Rachou/FIOCRUZ Minas

Patrocinador Principal: Fundação Osvaldo Cruz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.979.661

Apresentação do Projeto:

As informações contidas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram obtidas dos documentos contendo as Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1531987.pdf 14/04/2020) e do Projeto Detalhado.

INTRODUÇÃO

Os três surtos sem precedentes de infecções emergentes por coronavírus humano (HCoV) no início do século XXI destacaram a necessidade de disponibilidade imediata, precisa e rápida de testes de diagnóstico. Os métodos de diagnóstico laboratorial para infecções por coronavírus humano evoluíram substancialmente, com o desenvolvimento de novos ensaios e com a disponibilidade de testes atualizados para os emergentes. Os métodos laboratoriais mais recentes são rápidos, altamente sensíveis e específicos, e estão substituindo gradualmente os padrões moleculares. Este trabalho visa avaliar o potencial diagnóstico de métodos laboratoriais disponíveis para coronavírus no Brasil, concentrando-se na doença de coronavírus 2019 (COVID-19) com surto inicial em Wuhan, China. O novo SARS-CoV-2 pode causar doenças respiratórias letais. Testes sorológicos anti-SARS-CoV-2 incluem o ELISA, a imunofluorescência e a imunocromatografia e estão disponíveis como kits comerciais. Os mesmos estão sendo utilizados para vários fins, incluindo

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

**COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA**

Continuação do Parecer: 3.979.661

investigações epidemiológicas, avaliação da cinética de anticorpos e avaliação da viabilidade de terapias. Estudos anteriores relatam a importância do entendimento do perfil IgM/IgG contra SARS-CoV, no entanto, o perfil traçado pelo novo SARS-CoV-2 ainda não foi definido, em especial, quando o mesmo é comparado ao uso de medicamentos corticosteróides e outros novos protocolos terapêuticos. O entendimento desta resposta humoral é particularmente importante neste momento quando determinações foram feitas pelo Ministério da Saúde e pela OMS quanto ao uso de testes rápidos indiretos IgM/IgG e testes rápidos de detecção antigênica direta. Até o momento, a OMS relatou 462.684 casos confirmados e 20.834 mortes por SARS-CoV-2 em todo o mundo, tendo o vírus neste momento uma taxa de letalidade de 4,5%. Nas Américas, foram registradas até o dia 26 de março de 2020, 75.712 casos confirmados e 1.065 mortes. Após seu primeiro isolamento, vários testes de diagnóstico laboratorial foram desenvolvidos. Testes moleculares como RT-PCR e de sequenciamento estão sendo usados no diagnóstico para dados compulsórios de registro, enquanto testes sorológicos e testes rápidos estão limitados a ambientes de investigação ou vigilância. Recentemente, vários testes rápidos foram aprovados pelos órgãos de vigilância sanitária em todos os continentes, assim como no Brasil. A maior parte destes testes envolve métodos de duas fases para detecção de anticorpos IgM e IgG anti-SARS-CoV-2 e, uma pequena parcela envolve a detecção antigênica de proteínas virais. Comparativamente aos testes moleculares, a acurácia dos testes rápidos no que inclui sensibilidade e especificidade diagnóstica, tende a ser inferior. Mas os últimos apresenta vantagens inúmeras em relação aos primeiros, como baixo custo, poucos minutos para a liberação do resultado, possibilidade de ser utilizado em qualquer local incluindo farmácias e drogarias, não estando restrito a ambiente hospitalar ou centros de referência em diagnóstico. Ainda, pelo grande surto e número de casos suspeitos, os centros de referência em diagnóstico para SARS-CoV-2 não estão conseguindo atender a demanda e os resultados estão demorando para além do tempo necessário de 48 horas para liberação de laudo diagnóstico, chegando em até 6 dias, o que agrava e muito o cenário de saturação do sistema de saúde e internações. Visando o crescimento exponencial no número de casos a serem diagnosticados para SARS-CoV-2 nos próximos dias e meses e buscando esclarecer a aplicabilidade e o potencial de uso dos testes rápidos disponíveis no Brasil, este trabalho se propõe a determinar o perfil longitudinal de 300 pacientes internados no Hospital da Baleia. Em primeiro momento, será determinada a titulação de IgM e IgG e momentos de pico máximo, soroconversão e manutenção da resposta humoral utilizando ELISA in house, para posterior avaliação do potencial diagnóstico e a confiabilidade de testes rápidos disponíveis no Brasil.

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar**Bairro:** Asa Norte**CEP:** 70.719-040**UF:** DF**Município:** BRASILIA**Telefone:** (61)3315-5877**E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.979.661

HIPÓTESE

Os níveis séricos em série de IgM e IgG específicos para SARS-CoV-2 permanecem por até 3 meses? O período de soroconversão para IgG e o período de alcance de níveis máximos de IgM e IgG condiz com a janela diagnóstica proposta pelos testes rápidos? Pacientes com co-morbidades, co-infecções virais e que estão recebendo protocolos terapêuticos distintos tem perfil humoral diferente? Testes rápidos aprovados no Brasil apresentam eficiência diagnóstica acurada?

METODOLOGIA

1. Obtenção de amostras humanas

Trezentos pacientes com diagnóstico molecular confirmado para SARS-CoV-2 internados e em tratamento no Hospital da Baleia no período de abril a junho de 2020 serão convidados a participar da pesquisa e serão acompanhados durante 3 meses. Serão obtidas amostras de sangue periférico e swab de nasofaringe a cada 3 dias desde o 1º dia de internação até o 15º, seguido de uma coleta por mês durante 3 meses, totalizando 8 coletas por paciente. Amostras de sangue periférico no volume de 10 ml serão coletadas pela equipe médica do Hospital da Baleia por punção venosa, obedecendo normas de segurança, e serão centrifugadas a 3.000 g/5 min para coleta do soro, que será armazenado a 4°C por 12 horas ou a -20°C até uso. A coleta de swab de orofaringe será feita com abaixador de língua para pressionar gentilmente a língua. Simultaneamente, o swab estéril é pressionado e rolado sobre as tonsilas e atrás da úvula (faringe posterior), evitando tocar na língua, mucosa bucal e úvula. O swab é fechado dentro de tubo estéril que será armazenado a temperatura ambiente por até 12 horas ou a -20°C até uso. Nos momentos de coleta, são anotadas nos tubos a identificação dos pacientes, a data e a hora da coleta.

2. Determinação do perfil longitudinal de anticorpos

O perfil longitudinal dos anticorpos IgM e IgG será determinado por ELISA in house com amostras de sangue periférico. Esta ELISA será feita com placas de 96 poços de fundo chato de poliestireno de alta adsorção. Estas placas serão sensibilizadas com 0,5 ug/ml de SARS-CoV2/2019-nCoV Spike/RBD Protein e SARS-CoV-2/2019-nCoV Nucleocapsid Protein diluídas em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 por aproximadamente 16 h a 4°C. Em seguida, a placa será lavada 3 vezes com PBS contendo 0,05% de Tween e bloqueada com 2,5% de proteínas do leite por 2 h a 37°C. As amostras de soro de pacientes serão adicionadas e incubadas por 1 h a temperatura ambiente. A placa será lavada novamente e o anticorpo anti-IgG ou anti-IgM humano conjugado a

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.979.661

peroxidase será adicionado e mesma será incubada por 1 h a temperatura ambiente. A reação será revelada por TMB e a densidade óptica determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 450 nm. Este ensaio determinará a curva longitudinal de resposta humoral específica para IgM e IgG, o período de soroconversão para IgG, o período em que os níveis máximos de IgM e IgG é atingido e sua persistência.

3. Avaliação de desempenho de testes rápidos anti-SARS-CoV-2 disponíveis para uso no Brasil.

Amostras de sangue e swab de nasofaringe serão direcionadas as análises de testes rápidos disponíveis para uso no Brasil para determinação da capacidade e da janela diagnóstica destes testes. Serão avaliados testes de detecção combinada IgM-IgG, como:

- 1) Coronavírus 2019-nCoV IgG/IgM, MedTeste;
- 2) COVID-19 IgG/IgM ECO Teste, EcoDiagnostica;
- 3) DPP IgM/IgG, BioManguinhos Fiocruz, e do teste rápido de detecção direta: ECO F COVID-19 Ag, EcoDiagnostica.

A realização de cada teste seguirá rigorosamente as instruções dos fabricantes. A manutenção da capacidade diagnóstica dos testes avaliados será, ainda, determinada quanto à relação com a presença de co-morbidades, co-infecções virais e de acordo com os medicamentos utilizados durante a internação. Relatórios médicos e prontuários serão utilizados para acompanhamento de informações pessoais, sintomas, protocolos de tratamento, resultados do diagnóstico molecular, co-morbidades e co-infecções virais.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Pacientes com diagnóstico molecular confirmado para SARS-CoV-2 internados e em tratamento no Hospital da Baleia no período de abril a junho de 2020 que aceitem participar do estudo e suas condições e assinem o TCLE serão incluídos.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVOS GERAIS

Determinar por ELISA in house níveis séricos em série de IgM e IgG específicos para o SARS-CoV-2 em 300 pacientes com SARS-CoV-2 internados e em tratamento no Hospital da Baleia, utilizando SARS-CoV-2/2019-nCoV Spike/RBD Protein e SARS-CoV-2/2019-nCoV Nucleocapsid Protein.

Determinar o período de soroconversão para IgG, o período em que os níveis máximos de IgM e IgG será atingido e sua persistência.

Agrupar pacientes de acordo com a presença ou ausência de co-morbidades, co-infecções virais e de acordo com os protocolos terapêuticos adotados, em especial no que se refere ao uso de

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.979.661

anti-inflamatórios corticosteróides e novos medicamentos.

Comparar os dados obtidos ao desempenho dos ensaios rápidos de detecção combinada IgM-IgG em amostras de sangue e de detecção antigênica em amostras de swab de nasofaringe que estão em fase inicial de uso comercial.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

As amostras de sangue periférico e swab orofaringe serão obtidas por equipe médica do Hospital da Baleia capacitada para os procedimentos citados. A coleta da amostra de sangue venoso pode, às vezes, resultar na formação de um pequeno hematoma e leve dor localizada. A coleta de swab orofaringe é indolor e não gera desconforto. Os pesquisadores deste projeto farão contato com os pacientes para apresentação do projeto e do consentimento livre e esclarecido. Este contato se dará nos primeiros 3 dias de internação do paciente. O projeto será apresentado ao paciente em linguagem acessível com explicações claras e esclarecedoras, com as informações mais importantes do protocolo de pesquisa, não escondendo possíveis riscos e desconfortos. Os pesquisadores farão também a leitura conjunta do TCLE com o participante, de maneira que ele possa tomar sua decisão de forma justa e sem constrangimentos. Os pesquisadores integrantes deste projeto se comprometem a manter em sigilo todas as informações coletadas no banco de dados dos pacientes. Nome dos pacientes, números de identificação de prontuários, datas de nascimento, excetuando-se a citação do ano, naturalidade, plano de saúde, telefones e endereços eletrônicos serão omitidos de qualquer documento, planilha e publicação decorrente deste trabalho.

BENEFÍCIOS

Considerando a atual pandemia por SARS-CoV-2 e sua expansão crescente no Brasil e no mundo, estudos como este são fundamentais neste momento. Estudos anteriores relatam a importância do entendimento do perfil IgM/IgG contra SARS-CoV, no entanto, o perfil traçado pelo novo SARS-CoV-2 não foi definido, em especial, quando o mesmo é comparado ao uso de medicamentos corticosteróides e outros novos protocolos terapêuticos. O entendimento desta resposta humoral irá demonstrar os momentos de detecção inicial, detecção máxima e de redução dos anticorpos, assim como o tempo de detecção dos antígenos virais antes, durante e após os protocolos de tratamento. Esta compreensão é importante para o atual diagnóstico, o desenvolvimento de vacinas e para dados epidemiológicos. Ainda, indicarão a capacidade diagnóstica e a relação entre os laudos dos ensaios rápidos disponíveis no Brasil para determinação indireta e direta em

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.979.661

pacientes infectados por SARS-CoV-2.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo irá descrever os perfis longitudinais de anticorpos IgM e IgG em pacientes infectados por SARS-CoV-2 com amostras coletadas no início da internação até 90 dias do aparecimento dos sintomas. Para isso, trezentos pacientes com diagnóstico confirmado para SARS-CoV-2 internados e em tratamento no Hospital da Baleia no período de abril a junho de 2020 serão convidados a participar e serão acompanhados durante 3 meses. Serão obtidas amostras de sangue periférico e swab de nasofaringe a cada 3 dias desde o 1º dia de internação até o 15º, seguido de uma coleta por mês durante 3 meses.

Previsão do número de participantes de pesquisa a serem incluídos no estudo: 300.

Financiamento: Fundação Oswaldo Cruz.

Início previsto: abril de 2020.

Término previsto: setembro de 2020.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

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

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Análise das respostas ao Parecer Consubstanciado nº 3.964.505 emitido em 10/04/2020:

1. No documento "Anexo_4_projetoCovid19", é informado que "Serão obtidas amostras de sangue periférico e swab de nasofaringe a cada 3 dias desde o 1º dia de internação até o 15º, seguido de uma coleta por mês durante 3 meses."

Solicita-se esclarecimento se haverá armazenamento de amostras. Caso afirmativo, solicita-se adequação do protocolo de pesquisa conforme disposto na Resolução CNS nº 441 de 2011 e na Portaria MS nº 2201 de 2011. Solicita-se, ainda, especificar por quanto tempo as amostras serão armazenadas (se for o caso) após o término do estudo e o destino das amostras após o período de armazenamento.

RESPOSTA: Haverá armazenamento de amostras por 2 anos contados a partir da data da coleta. Sendo assim, o protocolo de pesquisa foi adequado de forma a conter esta informação, a justificativa da necessidade de manutenção, o tempo de armazenamento, e o destino das amostras após este período. Estes esclarecimentos estão inseridos no "Anexo_4_projetoCovid19" que compreende o projeto com as alterações (versão limpa) e no "Anexo4_ProjetoCovid19_AlteraçõesCorVermelha" que compreende o projeto com as alterações

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conepe@saude.gov.br

**COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA**

Continuação do Parecer: 3.979.661

assinaladas em vermelho na página 5 item “Metodologia proposta”, subitem “1. Obtenção de amostras humanas”. Este subitem está transcrito a seguir: “1. Obtenção de amostras humanas. Trezentos pacientes com diagnóstico molecular confirmado para SARSCoV-2 internados e em tratamento no Hospital da Baleia no período de abril a junho de 2020 serão convidados a participar da pesquisa e serão acompanhados durante 3 meses. Serão obtidas amostras de sangue periférico e swab de nasofaringe a cada 3 dias desde o 1º dia de internação até o 15º, seguido de uma coleta por mês durante 3 meses, totalizando 8 coletas por paciente. As amostras coletadas serão armazenadas por dois anos contados a partir da data da coleta em biorepositório do grupo de pesquisa para o caso de necessidade de repetições nos ensaios propostos neste projeto. As amostras não serão utilizadas para outras análises que não estejam descritos neste documento. Transcorridos os dois anos, as amostras armazenadas serão descartadas conforme normas vigentes de órgãos técnicos competentes, e de acordo com o TCLE, respeitando-se a confidencialidade e a autonomia do participante da pesquisa. O descarte se dará da seguinte forma: os resíduos contaminados com SARS-CoV-2 serão manejados de acordo com as determinações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que determina que todo resíduo deve ser acondicionado em sacos de cor branco leitosa, impermeáveis, de material resistente à ruptura e vazamento contidos no seu interior, não ultrapassando 2/3 de sua capacidade. Esses sacos serão identificados pelo símbolo de substância infectante. Durante toda etapa de gerenciamento, os sacos permanecerão dentro de recipientes de acondicionamento tampados em sala exclusiva para armazenamento temporário de resíduos biológicos, conforme especificado na RDC/ANVISA nº 222/2018. A Fiocruz possui projeto de gerenciamento de resíduos biológicos e contrato com empresa especializada que tem a responsabilidade de coletar os resíduos e assegurar a eliminação das características de periculosidade do resíduo com tratamento específico, de forma que todo o processo atende aos padrões de qualidade ambiental e de saúde pública. Após tratamento, os resíduos passarão a ser considerados resíduos do grupo D, para fins de disposição final. Amostras de sangue periférico no volume de 10 ml serão coletadas pela equipe médica do Hospital da Baleia por punção venosa, obedecendo normas de segurança, e serão centrifugadas a 3.000 g/5 min para coleta do soro, que será armazenado a 4°C por 12 horas ou a -20°C para tempo superior a 12 horas. A coleta de swab de orofaringe será feita com abaixador de língua para pressionar gentilmente a língua. Simultaneamente, o swab estéril é pressionado e rolado sobre as tonsilas e atrás da úvula (faringe posterior), evitando tocar na língua, mucosa bucal e úvula. O swab é fechado dentro de tubo estéril com solução fisiológica estéril que será armazenado a temperatura ambiente por até 12 horas ou a -20°C para tempo

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar**Bairro:** Asa Norte**CEP:** 70.719-040**UF:** DF**Município:** BRASILIA**Telefone:** (61)3315-5877**E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.979.661

superior a 12 horas. Os tubos com swabs devem ser embalados individualmente em sacos plásticos com zip. Nos momentos de coleta, são anotadas nos tubos a identificação dos pacientes, a data e a hora da coleta. O transporte das amostras biológicas até a unidade da Fiocruz será realizado com gelo reciclável em caixa de isopor fechada com fita crepe contendo somente as amostras para pesquisa de Coronavírus/Influenza."

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.2. Na página 6 de 10, item "Riscos", lê-se: "Os pesquisadores deste projeto EM NENHUM MOMENTO ENTRARÃO EM CONTATO DIRETO COM OS PACIENTES." (destaque nosso). Solicitam-se esclarecimentos sobre como ocorrerá o processo de consentimento livre e esclarecido, em que momento e de que maneira os pesquisadores farão o convite ao futuro participante da pesquisa/responsável legal para participar e fornecerão todas as informações para o melhor esclarecimento sobre a pesquisa proposta.

RESPOSTA: Os pesquisadores deste projeto farão contato com os pacientes para apresentação do projeto e do consentimento livre e esclarecido. Este contato se dará nos primeiros 3 dias de internação do paciente. O projeto será apresentado ao paciente em linguagem acessível com explicações claras e esclarecedoras, com as informações mais importantes do protocolo de pesquisa, não escondendo possíveis riscos e desconfortos. Os pesquisadores farão também a leitura conjunta do TCLE com o participante, de maneira que ele possa tomar sua decisão de forma justa e sem constrangimentos. Esta informação foi inserida no "Anexo_4_projetoCovid19" que compreende o projeto com as alterações (versão limpa) e no "Anexo4_ProjetoCovid19_AlteraçõesCorVermelha" que compreende o projeto com as alterações assinaladas em vermelho na página 6 item "Riscos". Este subitem está transcrito a seguir: "Riscos. As amostras de sangue periférico e swab orofaringe serão obtidas por equipe médica do Hospital da Baleia capacitada para os procedimentos citados. A coleta da amostra de sangue venoso pode, às vezes, resultar na formação de um pequeno hematoma e leve dor localizada. A coleta de swab orofaringe é indolor e não gera desconforto. Os pesquisadores deste projeto farão contato com os pacientes para apresentação do projeto e do consentimento livre e esclarecido. Este contato se dará nos primeiros 3 dias de internação do paciente. O projeto será apresentado ao paciente em linguagem acessível com explicações claras e esclarecedoras, com as informações mais importantes do protocolo de pesquisa, não escondendo possíveis riscos e desconfortos. Os pesquisadores farão também a leitura conjunta do TCLE com o participante, de maneira que ele possa tomar sua decisão de forma justa e sem constrangimentos. Os pesquisadores integrantes

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.979.661

deste projeto se comprometem a manter em sigilo todas as informações coletadas no banco de dados dos pacientes. Nome dos pacientes, números de identificação de prontuários, datas de nascimento, excetuando-se a citação do ano, naturalidade, plano de saúde, telefones e endereços eletrônicos serão omitidos de qualquer documento, planilha e publicação decorrente deste trabalho.”

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2. Quanto ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

2.1. Não consta a garantia de assistência integral e gratuita, pelo tempo que for necessário, em caso de danos decorrentes direta ou indiretamente pela participação no estudo. Ressalta-se que é de responsabilidade do pesquisador, do patrocinador do estudo e das instituições participantes, a prestação de assistência integral e acompanhamento do participante da pesquisa que vier a sofrer tais danos, conforme o item II.3.2 da Resolução CNS nº 466 de 2012. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: A informação sobre a garantia de assistência integral e gratuita ao participante que sofrer danos decorrentes direta ou indiretamente pela participação no estudo foi incluída no documento “Anexo5_TCLECovid19” que compreende o TCLE com as alterações (versão limpa) e no “Anexo5_TCLECovid19_AlteraçõesCorVermelha” que compreende o TCLE com as alterações destacadas na cor vermelha. O item está transcrito a seguir: “Prezado Senhor/Prezada Senhora, O grupo de pesquisa Diagnóstico e Terapia de Doenças Infecciosas e Câncer da Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz está realizando um estudo de interesse para o diagnóstico e controle da doença causada pelo novo coronavírus. Se você quiser participar desse estudo, solicitamos que autorize a coleta de 10 mL de seu sangue, a coleta de saliva para realizarmos exames laboratoriais e o acesso ao seu prontuário médico que ajudarão no diagnóstico rápido do novo coronavírus e na descoberta de formas de controlar a pandemia. A coleta da amostra de sangue venoso pode, às vezes, resultar na formação de um pequeno hematoma (roxo) e leve dor localizada. Entretanto, a coleta será feita por profissional capacitado e com grande experiência. Será utilizado material descartável de boa qualidade (como agulhas e tubos a vácuo). A coleta de saliva, por sua vez, é indolor e não causa nenhum desconforto bastando fazer uma raspagem de cotonete no interior de sua boca. As coletas serão feitas a cada 3 dias durante 15 dias enquanto você estiver no hospital e, depois, 1 vez por mês durante 3 meses quando o equipe de saúde irá até sua casa realizar a coleta. O material coletado ficará guardado na Fiocruz para uso exclusivo neste estudo e será descartado após 2 anos da data da coleta. Toda informação obtida nessa pesquisa é considerada

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.710-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.979.661

confidencial. Sua participação é totalmente voluntária e caso você não queira participar não haverá nenhum prejuízo para o seu tratamento. Você também pode desistir da participação em qualquer momento da pesquisa, caso assim resolva. Você não terá qualquer tipo de despesa para participar da pesquisa e não receberá remuneração por sua participação. A assinatura desse termo de consentimento garante a assistência integral e gratuita, pelo tempo que for necessário, em caso de complicações e danos decorrentes da sua participação no estudo. Você terá acesso a todos os resultados derivados desse estudo. Você e o pesquisador assinarão duas vias iguais, ficando uma via com você e a outra com o pesquisador responsável."

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.2. Solicita-se que conste no TCLE o tipo e grau de acesso aos resultados dos exames por parte do participante de pesquisa, com opção de tomar ou não conhecimento dessas informações (Resolução CNS nº 340 de 2004, item V.1.d).

RESPOSTA: A informação sobre acesso aos resultados dos exames por parte do participante de pesquisa foi incluída no documento "Anexo5_TCLECovid19" que compreende o TCLE com as alterações (versão limpa) e no "Anexo5_TCLECovid19_AlteraçõesCorVermelha" que compreende o TCLE com as alterações destacadas na cor vermelha. O item está transcrito a seguir: "Prezado Senhor/Prezada Senhora, O grupo de pesquisa Diagnóstico e Terapia de Doenças Infecciosas e Câncer da Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz está realizando um estudo de interesse para o diagnóstico e controle da doença causada pelo novo coronavírus. Se você quiser participar desse estudo, solicitamos que autorize a coleta de 10 mL de seu sangue, a coleta de saliva para realizarmos exames laboratoriais e o acesso ao seu prontuário médico que ajudarão no diagnóstico rápido do novo coronavírus e na descoberta de formas de controlar a pandemia. A coleta da amostra de sangue venoso pode, às vezes, resultar na formação de um pequeno hematoma (roxo) e leve dor localizada. Entretanto, a coleta será feita por profissional capacitado e com grande experiência. Será utilizado material descartável de boa qualidade (como agulhas e tubos a vácuo). A coleta de saliva, por sua vez, é indolor e não causa nenhum desconforto bastando fazer uma raspagem de cotonete no interior de sua boca. As coletas serão feitas a cada 3 dias durante 15 dias enquanto você estiver no hospital e, depois, 1 vez por mês durante 3 meses quando o equipe de saúde irá até sua casa realizar a coleta. O material coletado ficará guardado na Fiocruz para uso exclusivo neste estudo e será descartado após 2 anos da data da coleta. Toda informação obtida nessa pesquisa é considerada confidencial. Sua participação é totalmente voluntária e caso você não queira participar não haverá nenhum prejuízo para o seu tratamento.

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.979.861

Você também pode desistir da participação em qualquer momento da pesquisa, caso assim resolva. Você não terá qualquer tipo de despesa para participar da pesquisa e não receberá remuneração por sua participação. A assinatura desse termo de consentimento garante a assistência integral e gratuita, pelo tempo que for necessário, em caso de complicações e danos decorrentes da sua participação no estudo. Você terá acesso a todos os resultados derivados desse estudo. Você e o pesquisador assinarão duas vias iguais, ficando uma via com você e a outra com o pesquisador responsável."

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.3. Solicitam-se esclarecimentos se a coleta de material feita uma vez por mês durante três meses será realizada na casa do participante ou se ele terá que se deslocar. Solicita-se incluir no TCLE que, quando for necessário seu deslocamento em função do estudo, será garantido o ressarcimento das despesas do participante da pesquisa e de seu acompanhante com o estudo. Saliencia-se que os itens ressarcidos não são apenas aqueles relacionados a transporte e alimentação, mas a todo gasto decorrente da participação no estudo (Resolução CNS nº 466 de 2012, itens II.21 e IV.3.g).

RESPOSTA: A coleta de amostras biológicas dos participantes do estudo em período posterior a internação será feita na residência do mesmo, evitando-se assim que o participante tenha que sofrer qualquer deslocamento para este fim. Esta informação foi incluída no documento "Anexo5_TCLECovid19" que compreende o TCLE com as alterações (versão limpa) e no "Anexo5_TCLECovid19_AlteraçõesCorVermelha" que compreende o TCLE com as alterações destacadas na cor vermelha. O item está transcrito a seguir: "Prezado Senhor/Prezada Senhora, O grupo de pesquisa Diagnóstico e Terapia de Doenças Infecciosas e Câncer da Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz está realizando um estudo de interesse para o diagnóstico e controle da doença causada pelo novo coronavírus. Se você quiser participar desse estudo, solicitamos que autorize a coleta de 10 mL de seu sangue, a coleta de saliva para realizarmos exames laboratoriais e o acesso ao seu prontuário médico que ajudarão no diagnóstico rápido do novo coronavírus e na descoberta de formas de controlar a pandemia. A coleta da amostra de sangue venoso pode, às vezes, resultar na formação de um pequeno hematoma (roxo) e leve dor localizada. Entretanto, a coleta será feita por profissional capacitado e com grande experiência. Será utilizado material descartável de boa qualidade (como agulhas e tubos a vácuo). A coleta de saliva, por sua vez, é indolor e não causa nenhum desconforto bastando fazer uma raspagem de cotonete no interior de sua boca. As coletas serão feitas a cada 3 dias durante 15 dias enquanto você estiver no hospital

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.979.661

e, depois, 1 vez por mês durante 3 meses quando o equipe de saúde irá até sua casa realizar a coleta. O material coletado ficará guardado na Fiocruz para uso exclusivo neste estudo e será descartado após 2 anos da data da coleta. Toda informação obtida nessa pesquisa é considerada confidencial. Sua participação é totalmente voluntária e caso você não queira participar não haverá nenhum prejuízo para o seu tratamento. Você também pode desistir da participação em qualquer momento da pesquisa, caso assim resolva. Você não terá qualquer tipo de despesa para participar da pesquisa e não receberá remuneração por sua participação. A assinatura desse termo de consentimento garante a assistência integral e gratuita, pelo tempo que for necessário, em caso de complicações e danos decorrentes da sua participação no estudo. Você terá acesso a todos os resultados derivados desse estudo. Você e o pesquisador assinarão duas vias iguais, ficando uma via com você e a outra com o pesquisador responsável.”

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.4. No projeto detalhado, página 8 de 10, é informado que "Os dados individuais e clínicos dos pacientes participantes deste estudo serão obtidos de relatórios médicos e prontuários." Se houver intenção de consultar o prontuário, essa informação deverá estar claramente expressa no TCLE, bem como a anuência do participante da pesquisa para o acesso e uso dos seus dados registrados no prontuário. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: A informação sobre o acesso ao prontuário médico de cada participante, bem como anuência do mesmo para acesso e uso dos seus dados foi incluída no "Anexo5_TCLECovid19" que compreende o TCLE com as alterações (versão limpa) e no "Anexo5_TCLECovid19_AlteraçõesCorVermelha" que compreende o TCLE com as alterações destacadas na cor vermelha. O item está transcrito a seguir: "Prezado Senhor/Prezada Senhora, O grupo de pesquisa Diagnóstico e Terapia de Doenças Infecciosas e Câncer da Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz está realizando um estudo de interesse para o diagnóstico e controle da doença causada pelo novo coronavírus. Se você quiser participar desse estudo, solicitamos que autorize a coleta de 10 mL de seu sangue, a coleta de saliva para realizarmos exames laboratoriais e o acesso ao seu prontuário médico que ajudarão no diagnóstico rápido do novo coronavírus e na descoberta de formas de controlar a pandemia. A coleta da amostra de sangue venoso pode, às vezes, resultar na formação de um pequeno hematoma (roxo) e leve dor localizada. Entretanto, a coleta será feita por profissional capacitado e com grande experiência. Será utilizado material descartável de boa qualidade (como agulhas e tubos a vácuo). A coleta de saliva, por sua vez, é indolor e não causa nenhum desconforto bastando fazer uma raspagem de cotonete no interior de

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.979.661

sua boca. As coletas serão feitas a cada 3 dias durante 15 dias enquanto você estiver no hospital e, depois, 1 vez por mês durante 3 meses quando o equipe de saúde irá até sua casa realizar a coleta. O material coletado ficará guardado na Fiocruz para uso exclusivo neste estudo e será descartado após 2 anos da data da coleta. Toda informação obtida nessa pesquisa é considerada confidencial. Sua participação é totalmente voluntária e caso você não queira participar não haverá nenhum prejuízo para o seu tratamento. Você também pode desistir da participação em qualquer momento da pesquisa, caso assim resolva. Você não terá qualquer tipo de despesa para participar da pesquisa e não receberá remuneração por sua participação. A assinatura desse termo de consentimento garante a assistência integral e gratuita, pelo tempo que for necessário, em caso de complicações e danos decorrentes da sua participação no estudo. Você terá acesso a todos os resultados derivados desse estudo. Você e o pesquisador assinarão duas vias iguais, ficando uma via com você e a outra com o pesquisador responsável."

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1531987.pdf	14/04/2020 09:26:41		Aceito
Outros	Anexo5_TCLECovid19_Alteracoes.pdf	14/04/2020 09:25:58	Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz	Aceito
Outros	Anexo4_ProjetoCovid19_Alteracoes.pdf	14/04/2020 09:25:26	Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz	Aceito
Outros	CartaResposta.pdf	14/04/2020 09:24:48	Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Anexo5_TCLECovid19.pdf	14/04/2020 09:22:25	Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz	Aceito

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.979.661

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Anexo4_ProjetoCovid19.pdf	14/04/2020 09:18:44	Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz	Aceito
Declaração de concordância	Anexo3_CartaHospitalDaBaleia.pdf	01/04/2020 10:42:12	Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anexo2_CartaFiocruz.pdf	31/03/2020 07:55:07	Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz	Aceito
Folha de Rosto	Anexo1_FolhadeRosto.pdf	31/03/2020 07:54:36	Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

BRASILIA, 19 de Abril de 2020

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador(a))

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte CEP: 70.719-040
UF: DF Município: BRASILIA
Telefone: (61)3315-5877 E-mail: conep@saude.gov.br