

FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA FRAÇÃO RBD DA PROTEÍNA *SPIKE* DO SARS-COV-2 PARA O
IMUNODIAGNÓSTICO DA COVID-19**

LARISSA DE CARVALHO MEDRADO VASCONCELOS

Salvador - Bahia

2023

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

**AVALIAÇÃO DA FRAÇÃO RBD DA PROTEÍNA *SPIKE* DO SARS-COV-2 PARA O
IMUNODIAGNÓSTICO DA COVID-19**

LARISSA DE CARVALHO MEDRADO VASCONCELOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para
a obtenção do grau de Mestra.

Orientador: Prof. Dr. Fred Luciano Neves Santos

Coorientadora: Prof. Dra. Isadora Cristina de Siqueira

Salvador - Bahia

2023

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ – Bahia - Salvador

V331a Vasconcelos, Larissa de Carvalho Medrado.

Avaliação da fração RBD da proteína *spike* do SARS-COV-2 para o imunodiagnóstico da Covid-19 / Larissa de Carvalho Medrado Vasconcelos. _ Salvador, 2023.

103 f.: il.: 30 cm

Orientador: Prof. Dr. Fred Luciano Neves Santos
Coorientadora: Prof. Dra. Isadora Cristina de Siqueira

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2023.

1. Sorodiagnóstico. 2. Covid-19. 3. RBD. 4. Spike. 5. SARS-CoV-2. I. Título.

CDU 616-097:614.4

“AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DA FRAÇÃO RBD DA PROTEÍNA SPIKE DO SARS-COV-2 PARA O
IMUNODIAGNÓSTICO DA COVID-19”

LARISSA DE CARVALHO MEDRADO VASCONCELOS

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 13 de julho de 2023.

COMISSÃO EXAMINADORA



Documento assinado digitalmente
PAOLA ALEJANDRA FIORANI CELEDON
Data: 26/07/2023 10:31:03-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra Paola Alejandra Fiorani Celedon
Pesquisadora
ICC/Fiocruz



Documento assinado digitalmente
CARINA CARVALHO DOS SANTOS
Data: 14/08/2023 08:44:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Carina Carvalho dos Santos
Professor Adjunto
FaCfar-UFBA



Documento assinado digitalmente
LEONARDO PAIVA FARIAS
Data: 17/07/2023 10:24:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Leonardo Paiva Farias
Pesquisador em Saúde Pública
IGM- Fiocruz

FONTES DE FINANCIAMENTO

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).
Fundação Oswaldo Cruz (INOVA).
Instituto Gonçalo Moniz/Fiocruz (IGM).

AGRADECIMENTOS

Uma etapa da minha vida se encerra com a finalização da escrita da dissertação. Os últimos dois anos foram difíceis e cheios de desafios, tanto acadêmicos quanto pessoais, mas eu não mudaria por nada.

Agradeço imensamente à vida por ter me direcionado para este caminho, no qual tive a oportunidade de realizar o mestrado na Fiocruz Bahia sob a orientação do Dr. Fred Luciano que me acolheu e me transmitiu lições relevantes e coorientação da Dra. Isadora Siqueira que também me acolheu e forneceu diferentes oportunidades, experiências que tenho plena convicção de que levarei para o meu futuro profissional.

Agradeço aos nossos colaboradores que foram essenciais para realização do meu mestrado, visto que sem eles este projeto não seria possível, o Aquiles Assunção Camelier e André Luiz Freitas de Oliveira Júnior do Hospital Aliança D'Or, o Antônio Carlos Bandeira do Hospital Aeroporto, a Maternidade José Maria de Magalhães Neto e a Rede Mundial Unida de Pesquisa Antiviral (*United World Antiviral Research Network*).

Agradeço a todas as pessoas presentes na minha vida, cujo suporte foi de extrema importância:

A minha família que todos os dias me manteve erguida e olhando para frente independente dos obstáculos.

As minhas amigas Lise Hora e Beatriz Setenta que me ofereceram o ombro amigo para chorar e desabafar, meu amigo Victor Summers que em diversos momentos agiu como um farol me mantendo no meu caminho e clareando minhas ideias e expectativas.

Aos meus colegas de faculdade que me ajudaram na transição para a vida adulta, aos integrantes do LAPEX, em especial a Yasmin Macedo e o Alan Duarte, que contribuíram para realização deste projeto e finalmente a todos os integrantes do LASP que me acolheram e me mostraram o tipo de pessoa devo me espelhar no futuro.

Agradeço ao Leonardo Leony, uma das pessoas mais inteligentes que conheci na minha vida e que no início me guiou e teve paciência para me ensinar na minha transição de aluna de iniciação científica para mestranda.

Ao Ângelo Antônio Oliveira, um colega que visualizo como inspiração para me tornar uma pessoa e pesquisadora melhor, que nunca teve receio em me dizer quando estava errada para que eu tivesse oportunidade de evoluir.

A Fernanda Habib, Ayla Araújo e Rosângela Almeida que me acompanharam durante todo esse trajeto, contribuindo para realização do meu projeto e rindo comigo por meio de altos-papos.

A Dr. Fred um excelente pesquisador e extremamente inteligente, que vem durante todo esse tempo me mostrando o tipo de pessoa que posso me tornar desde que me mantenha humilde e nunca vire as costas ao aprendizado.

À CAPES pelo fomento, apoio financeiro e consolidação do programa de pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

A minha família, colegas, o LASP e nossos colaboradores eu só tenho gratidão e o desejo de continuar aprendendo.

VASCONCELOS, Larissa de Carvalho Medrado. **Avaliação da fração RBD da proteína Spike do SARS-CoV-2 para o imunodiagnóstico da COVID-19.** 2023. 103 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2023.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2) é um betacoronavírus pertencente à família Coronaviridae. A Coronavirus disease-2019 (COVID-19), doença causada pelo vírus, apresenta quadro clínico inespecífico e de gravidade variada. O diagnóstico padrão da fase aguda é através de ensaios moleculares, no entanto, imunoenaios são utilizados para rastreamento de casos. Dentre as proteínas do SARS-CoV-2, a fração RBD da proteína *Spike* consiste em um potencial candidato para ser usado como matriz antigênica em ensaios sorológicos indiretos. **OBJETIVO:** Avaliar o desempenho diagnóstico da fração RBD da proteína *Spike* do SARS-CoV-2 para o imunodiagnóstico da COVID-19. **MATERIAL E MÉTODOS:** A fração recombinante RBD foi cedida pelo Instituto de Desenho de Proteínas (*Institute for Protein Design*, Seattle-WA, EUA). O ELISA indireto foi padronizado para determinação da melhor quantidade do antígeno RBD, e a melhor titulação do anticorpo secundário IgG e IgM e das amostras séricas. A avaliação do potencial diagnóstico da RBD foi realizada utilizando 705 amostras séricas caracterizadas através de testes comerciais para detecção da infecção pelo SARS-CoV-2, sendo 354 amostras positivas para COVID-19 e 351 negativas, obtidas de doadores de sangue antes do início da pandemia. Para a avaliação da reatividade cruzada foram utilizadas 135 amostras pré-pandemia positivas para outras doenças infecto-parasitárias. **RESULTADOS:** Após a definição das melhores condições para realização dos imunoenaios, o RBD-ELISA IgG apresentou boa capacidade diagnóstica com AUC de 84,6%, sensibilidade de 48%, especificidade de 99,1% e acurácia de 73,5%. Já o RBD-ELISA IgM demonstrou capacidade diagnóstica razoável com AUC de 76,5%, sensibilidade de 51,1%, especificidade de 94,6%, e acurácia de 72,8%. Ao estratificar as amostras pelo intervalo de coleta após início dos sintomas, foram observadas diferenças nos parâmetros de desempenho para ambos os testes, sendo o intervalo de 15-21 dias com o melhor desempenho comparado aos demais intervalos. Ao avaliar a reatividade cruzada, o RBD-ELISA IgG obteve uma taxa de 4,4% (6/135) de reatividade, enquanto o RBD-ELISA IgM apresentou taxa de 3,7% (5/135). **CONCLUSÃO:** O RBD-ELISA IgG e IgM são capazes de diferenciar amostras positivas de negativas, apresentando boa capacidade diagnóstica. Quando realizada a estratificação dos resultados por data da coleta após a data do início dos sintomas, ambos os testes apresentaram elevado desempenho no intervalo de 15-21 dias. Todavia, o uso dos testes em paralelo possibilitou o aumento nos parâmetros de desempenho independente do período em que a coleta da amostra foi realizada.

Palavras-chave: Sorodiagnóstico. COVID-19. RBD. *Spike*. SARS-CoV-2.

VASCONCELOS, Larissa de Carvalho Medrado. **Evaluation of the RBD fraction of the Spike protein of SARS-CoV-2 for the immunodiagnosis of COVID-19.** 2023. 103 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2023.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is a betacoronavirus belonging to the Coronaviridae family. Coronavirus disease-2019 (COVID-19), a disease caused by the virus, has a nonspecific clinical picture of varying severity. The standard diagnosis of the acute phase is through molecular assays; however, immunoassays are used for case screening. Among the SARS-CoV-2 proteins, the RBD fraction of the Spike protein is a potential candidate to be used as an antigenic matrix in indirect serological assays. **OBJECTIVE:** To evaluate the diagnostic performance of the RBD fraction of the Spike protein of SARS-CoV-2 for the immunodiagnosis of COVID-19. **MATERIAL AND METHODS:** The recombinant RBD fraction was provided by the Institute for Protein Design, Seattle-WA, USA. The indirect ELISA was standardized to determine the best amount of RBD antigen, and the best titer of secondary antibody IgG and IgM and serum samples. The assessment of the diagnostic potential of RBD was performed using 705 serum samples characterized through commercial tests for the detection of SARS-CoV-2 infection, 354 of which were positive for COVID-19 and 351 negatives, obtained from blood donors before the start of the pandemic. For the evaluation of cross-reactivity, 135 pre-pandemic samples positive for other infectious and parasitic diseases were used. **RESULTS:** After defining the best conditions for carrying out the immunoassays, the RBD-ELISA IgG showed good diagnostic capacity with an AUC of 84.6%, sensitivity of 48%, specificity of 99.1% and accuracy of 73.5%. The RBD-ELISA IgM, on the other hand, demonstrated a reasonable diagnostic capacity with an AUC of 76.54%, sensitivity of 51.1%, specificity of 94.6%, and accuracy of 72.8%. When stratifying the samples by the collection interval after the onset of symptoms, differences were observed in the performance parameters for both tests, with the interval of 15-21 days having the best performance compared to the other intervals. When evaluating cross-reactivity, the RBD-ELISA IgG had a reactivity rate of 4.4% (6/135), while the RBD-ELISA IgM had a rate of 3.7% (5/135). **CONCLUSION:** The RBD-ELISA IgG and IgM are able to differentiate positive from negative samples, presenting good diagnostic capacity. When the results were stratified by collection date after the date of symptom onset, both tests showed high performance in the 15–21-day interval. However, the use of tests in parallel allowed the increase in performance parameters regardless of the period in which the sample collection was performed.

Keywords: Serodiagnosis. COVID-19. RBD. Spike. SARS-CoV-2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Genoma completo do SARS-CoV-2	18
Figura 2	Estrutura da proteína <i>Spike</i> do SARS-CoV-2	19
Figura 3	Cinética de anticorpos (IgA, IgM e IgG) anti-SARS-CoV-2 e de detecção de RNA viral no curso da COVID-19 branda	23
Figura 4	Combinação binária entre os prováveis resultados obtidos em um determinado teste e o diagnóstico verdadeiro da doença	31
Figura 5	Painel da caracterização sorológica	37
Figura 6	Análise gráfica das densidades óticas da padronização dos imunoenaios utilizando três sistemas-tampão	39
Figura 7	Análise gráfica das densidades óticas obtidas na avaliação considerando o tempo de reação (<i>time titration</i>) para mensurar o tempo de incubação ideal após adição da solução reveladora (esquerda). Análise do SNR (direita)	40
Figura 8	Análise gráfica das densidades óticas das amostras séricas no RBD-ELISA IgG	41
Figura 9	Análise gráfica dos índices de reatividade da avaliação do potencial diagnóstico da fração RBD da proteína <i>Spike</i> do SARS-CoV-2 (IgG)	43
Figura 10	Análise gráfica dos índices de reatividade do RBD-ELISA IgG estratificados a partir dos intervalos de coleta após início dos sintomas	45
Figura 11	Análise gráfica dos índices de reatividade das amostras doenças infecto-parasitárias para o RBD-ELISA IgG	47
Figura 12	Análise gráfica das densidades óticas das amostras séricas no RBD-ELISA IgM	47
Figura 13	Análise gráfica dos índices de reatividade da avaliação do potencial diagnóstico do RBD-ELISA IgM	51
Figura 14	Análise gráfica dos índices de reatividade do RBD-ELISA IgM estratificados a partir dos intervalos de coleta após início dos sintomas	52
Figura 15	Análise gráfica dos índices de reatividade das amostras doenças infecto-parasitárias para o RBD-ELISA IgM	54
Figura 16	Análise gráfica dos índices de reatividade dos testes comerciais	56

- Figura 17** Análise gráfica da curva dos índices de reatividade do RBD-ELISA IgM com quatro pacientes (#50, #60, #61 e #64) para COVID-19 58
- Figura 18** Análise gráfica da curva dos índices de reatividade do RBD-ELISA IgG com quatro pacientes (#50, #60, #61 e #64) para COVID-19 59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Interpretação dos valores das razões de verossimilhança	33
Quadro 2	Interpretação do Índice Kappa de Cohen (κ)	34
Quadro 3	Interpretação dos valores da área abaixo da curva ROC (AUC)	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Índices de reatividade obtidos por testes comerciais das amostras sérias positivas e negativas para COVID-19 utilizadas para a confecção dos <i>pools</i> séricos usados na padronização	38
Tabela 2	Análise do SNR dos tampões de sensibilização	39
Tabela 3	Avaliação das densidades óticas das amostras durante a padronização	42
Tabela 4	Parâmetro de desempenho dos CO no RBD-ELISA IgG	43
Tabela 5	Parâmetros de desempenho obtidos na avaliação do potencial diagnóstico do RBD-ELISA IgG	44
Tabela 6	Parâmetros de desempenho do RBD-ELISA IgG por intervalo de coleta	46
Tabela 7	Avaliação das densidades óticas das amostras durante a padronização	49
Tabela 8	Parâmetro de desempenho dos CO no RBD-ELISIA IgM	50
Tabela 9	Parâmetros de desempenho obtidos na avaliação do potencial diagnóstico do RBD-ELISA IgM	51
Tabela 10	Parâmetros de desempenho do RBD-ELISA IgM por intervalo de coleta	53
Tabela 11	Análise combinatória do RBD-ELISA IgG e IgM	54
Tabela 12	Análise combinatória do RBD-ELISA IgG e IgM por intervalo de coleta das amostras	55
Tabela 13	Parâmetros de desempenho dos RBD-ELISA e dos testes comerciais.	57
Tabela 14	Características dos pacientes	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acc	Acurácia
ACE2	<i>Angiotensin converting enzyme 2</i> (Enzima conversora da angiotensina 2)
AIS	Após início dos sintomas
AT2	Angiotensina-2
AUC	<i>Area Under Curve</i> (Área abaixo da curva ROC)
Bp	Pares de bases
CD	Domínio do conector
CH	Hélice central
CHA	Doença de Chagas
CO₂	Dióxido de carbono
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i> (Doença do coronavírus 2019)
CRISPR	Ensaio de repetições palindrômicas curtas agrupadas regularmente interespaçadas
CT	Cauda citoplasmática
DEN	Dengue
DO	Densidade óptica
DOR	Razão de probabilidades diagnósticas
NTD	Domínio N-terminal
DP	Desvio-padrão
E	Envelope
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (Ensaio de imunoabsorção enzimática)
Esp	Especificidade
Exa	Exatidão
FIL	Filariose
FN	Falso negativo
FP	Falso positivo
GISAID	Iniciativa Global de Compartilhamento de Todos os Dados da Influenza
HBV	Hepatite B
HCl	Ácido clorídrico
HCoV	<i>Human Coronavirus</i> (Coronavírus humano)

HCV	Hepatite C
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> (Vírus da imunodeficiência humana)
(HOCH₂)₃CNH₂	Tris(hidroximetil)aminometano
HR1	Região heptada 1
HR2	Região heptada 2
HTLV	<i>Human T-lymphotropic virus</i> (Vírus linfotrópico de células T humanas)
IC95%	Intervalo de confiança a 95%
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> (Comitê internacional de taxonomia de vírus)
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IHR	<i>International Health Regulations</i> (Regulamento Sanitário Internacional)
INAA	Ensaio de amplificação isotérmica de ácido nucleico
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside
IR	Índice de reatividade
κ	Índice de <i>Kappa</i> de Cohen
LEI	Leishmaniose
M	Membrana
MERS-CoV	<i>Middle east respiratory syndrome coronavirus</i> (Síndrome respiratória do Oriente Médio)
N	Núcleocapsídeo
Na₂CO₃	Carbonato de sódio
Na₂HPO₄	Fosfato dissódico
NaCl	Cloreto de sódio
NaH₂PO₄	Fosfato monossódico
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
NGS	Sequenciamento de nova geração
ORD	<i>Odds ratio diagnostics</i>
ORFs	<i>Open reading frames</i> (Fase de leitura aberta)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão Fosfato Salino)
Pe	Probabilidade esperada
PEI-MAX	Cloridrato de Polietilenoimina Linear

PF	Peptídeo de fusão
Po	Probabilidade observada
qPCR	<i>Real time polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia em tempo real)
RBD	<i>Receptor binding domain</i> (Domínio de ligação ao receptor)
RBM	<i>Receptor binding motif</i> (Domínio de ligação ao motivo)
RNA	Ácido ribonucleico
ROC	<i>Receiver operating characteristic curve</i> (Características de operação do receptor)
ROIs	Regiões de interesse
RPM	Rotações por minuto
RT-PCR	<i>Reverse-transcriptase polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa)
RV	Razão de verossimilhança
S	<i>Spike</i> (Espícula)
S1	Subunidade 1
S1/S2	Sítio de clivagem da protease S1/S2
S2	Subunidade 2
S2'	Sítio de clivagem da protease S2'
SARS-CoV	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus</i> (Síndrome respiratória aguda grave)
SARS-CoV-2	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i> (Síndrome respiratória aguda grave 2)
Sen	Sensibilidade
SD1	Subdomínio 1
SD2	Subdomínio 2
SNR	<i>Signal-to-noise ratio</i> (Relação de sinal ruído)
SS	Sequência simples
SYP	Sífilis
TM	Domínio transmembranar
TMPRSS2	Protease serina transmembranar 2
VN	Verdadeiro negativo
VP	Verdadeiro positivo

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µl	Microlitro
°C	Graus Celsius
M	Molar
mm	Milímetro
nM	Nanomolar
nm	Nanômetro
kb	Quilobase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	HISTÓRICO	16
2.2	SARS-CoV-2	17
2.2.1	Proteína S	18
2.2.1.1	Domínio de ligação ao receptor (RBD)	19
2.3	DOENÇA CORONAVÍRUS 2019 (COVID-19)	21
2.4	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	22
3	OBJETIVOS	25
3.1	OBJETIVO GERAL	25
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO	26
4.1.1	Locais de Experimentação	26
4.1.2	Considerações éticas	26
4.2	ANTÍGENO RECOMBINANTE	26
4.3	PAINEL SOROLÓGICO	27
4.3.1	Dimensionamento amostral	27
4.3.2	Obtenção e caracterização do painel amostral	27
4.4	PADRONIZAÇÃO DO RBD-ELISA	28
4.4.1	Sensibilização das microplacas	28
4.5	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DIAGNÓSTICO	28
4.6	ANÁLISE DOS RESULTADOS	29
4.6.1	Padronização: definição das melhores condições de ensaio	29
4.6.2	Definição do ponto de corte (<i>Cut-off</i>)	29
4.6.3	Normalização dos dados	30
4.6.4	Parâmetros de desempenho	30
4.6.5	Testes estatísticos	35
5	RESULTADOS	36
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO PAINEL SOROLÓGICO	36
5.2	RBD-ELISA IgG	37

5.2.1	Padronização do ELISA indireto IgG	37
5.2.1.1	Obtenção dos controles	37
5.2.1.2	Seleção do sistema-tampão	38
5.2.1.3	Tempo de reação	40
5.2.1.4	Seleção das condições	41
5.2.1.5	Seleção do <i>Cut-off</i> (Ponto de corte)	42
5.2.2	Avaliação do potencial diagnóstico	43
5.2.3	Reatividade Cruzada	46
5.3	RBD-ELISA IgM	47
5.3.1	Padronização do ELISA indireto IgM	47
5.3.1.1	Seleção das condições	47
5.3.1.2	Sensibilização em temperatura ambiente	50
5.3.1.3	Seleção do <i>Cut-Off</i>	50
5.3.2	Avaliação do potencial diagnóstico do RBD-ELISA IgM	50
5.3.3	Reatividade Cruzada RBD-ELISA IgM	53
5.4	ANÁLISE COMBINATÓRIA	54
5.5	COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO DOS RBD-ELISA COM TESTES COMERCIAIS	55
5.6	DINÂMICA DOS ANTICORPOS	57
6	DISCUSSÃO	60
6.1	PADRONIZAÇÃO DO ELISA INDIRETO	60
6.2	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DIAGNÓSTICO	62
6.3	REATIVIDADE CRUZADA	63
6.4	COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO DOS RBD-ELISA COM TESTES COMERCIAIS	64
6.5	DINÂMICA DOS ANTICORPO	65
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
8	PERSPECTIVAS	68
	REFERÊNCIAS	69
	ANEXO	77
	APÊNDICES	78

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2) é um betacoronavírus pertencente à família Coronaviridae. Foi identificado pela primeira vez na cidade de Wuhan, China, em dezembro de 2019, através do relato de indivíduos com pneumonia viral de origem desconhecida (ZHU et al., 2020). A *Coronavirus disease-2019* (COVID-19), como a doença foi denominada, causa quadro clínico com sintomatologia e gravidade variadas, sendo observados casos assintomáticos a graves. Quando a doença é sintomática, manifestações não específicas são relatadas, como febre, tosse, fadiga, dores musculares e outras, as quais podem evoluir ou não para uma pneumonia viral (VANNABOUATHONG, CHRISTOPHER et al., 2020). O diagnóstico padrão da doença na fase aguda é baseado na detecção de sequências virais por meio da reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR). Contudo, apresenta limitações na identificação e rastreamento de casos assintomáticos e pouca viabilidade para uso em estudos epidemiológicos, sendo necessária a utilização de ferramentas complementares (PERVEEN et al., 2023).

O uso de ensaios sorológicos auxilia a preencher esta lacuna, identificando indivíduos com carga viral baixa ou indetectável, assim como no rastreamento de contactantes (LI et al., 2020; WU et al., 2020). O teste de escolha para ser utilizado no diagnóstico da COVID-19 varia conforme a fase clínica que o indivíduo se encontra, visto que os testes comerciais apresentam desempenho diagnóstico variado conforme o objetivo da pesquisa. A proteína Spike (S) do SARS-CoV-2 S é altamente imunogênica e alvo de diferentes estudos (GATTINGER et al., 2021; BERRY et al., 2010; MULLINGAN et al., 2020; RAVICHANDRAN et al., 2020). Em especial, a sua fração do domínio de ligação do receptor (RBD, do inglês *receptor binding domain*) é um potencial candidato para uso como matriz antigênica em testes sorológicos. De fato, trata-se de um alvo comum para anticorpos neutralizantes (AMANAT et al., 2020; PREMKUMARET et al., 2020).

Desde a descoberta da COVID-19, diversos testes sorológicos foram desenvolvidos, apresentando variabilidade nos valores de sensibilidade. Esta variabilidade ocorre devido os diferentes intervalos de tempo das coletas das amostras utilizadas e ausência de um perfil comum entre os pacientes quanto a síntese de anticorpos (DEEKS et al., 2020). Diante do exposto, fica evidente a necessidade do desenvolvimento de testes sorológicos capazes de preencher as lacunas no imunodiagnóstico da COVID-19, proporcionando resultados positivos em poucos dias após o aparecimento dos sintomas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

No final de dezembro de 2019, na cidade de Wuhan, na província de Hubei, China, foram reportados casos de pneumonia de origem desconhecida associados a um mercado atacadista de frutos de mar e animais silvestres (ZHU et al., 2020). Os casos foram reportados à Organização Mundial da Saúde (OMS) e, até 3 de janeiro de 2020, 44 casos tinham sido descritos. Destes, 33 encontravam-se em estado estável, apresentando febre, e 11 em estado crítico, com achados radiográficos de lesão invasiva nos pulmões e quadros respiratórios graves (WHO, 2020). A partir daí, surgiram novos relatos de indivíduos infectados na Tailândia, Japão e República da Coreia, que apresentavam histórico de passagem na cidade de Wuhan. Os novos casos não estavam relacionados ao mercado atacadista de frutos de mar e animais silvestres, indicando a transmissão entre pessoas (LI, 2020). Um estudo relatou que a facilidade de locomoção humana por meio de transporte aéreo foi um facilitador na disseminação do vírus para fora do leste asiático, permitindo que ele atingisse todos os continentes do mundo (BOGOCH et al., 2020). Em 7 de janeiro de 2020, foi realizado o isolamento do patógeno por meio do sequenciamento metagenômico, permitindo a identificação de um novo tipo de coronavírus, inicialmente denominado nCoV (*Novel coronavirus*). O genoma completo foi compartilhado na plataforma *GenBank*, tornando-o público e permitindo que novos estudos fossem realizados para elucidação deste novo agente viral (WHO, 2020). Novos sequenciamentos foram realizados a partir de amostras de indivíduos infectados, revelando homologia com outros coronavírus, dentre eles os responsáveis por infectar morcegos e pangolins, atingindo similaridade de 85-97% do seu genoma. Observou-se também similaridade de aproximadamente 80% com o SARS-CoV e 50% de homologia com o MERS-CoV, coronavírus responsáveis pelos surtos da síndrome respiratória aguda em 2002 e a epidemia da síndrome respiratória do Oriente Médio, respectivamente (ADIL et al., 2021; LU et al., 2020; ZHOU et al., 2020; ZHU et al., 2020). Assim, em fevereiro de 2020, o Comitê internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV; *International Committee on Taxonomy of Viruses*) nomeou o nCoV como SARS-CoV-2, devido sua semelhança ao SARS-CoV. Enquanto, a OMS nomeou a doença de COVID-19.

Previamente à pandemia causada pelo SARS-CoV-2, seis coronavírus humanos (HCoV) já haviam sido descritos e associados a infecções respiratórias em seres humanos: HCoV-229E,

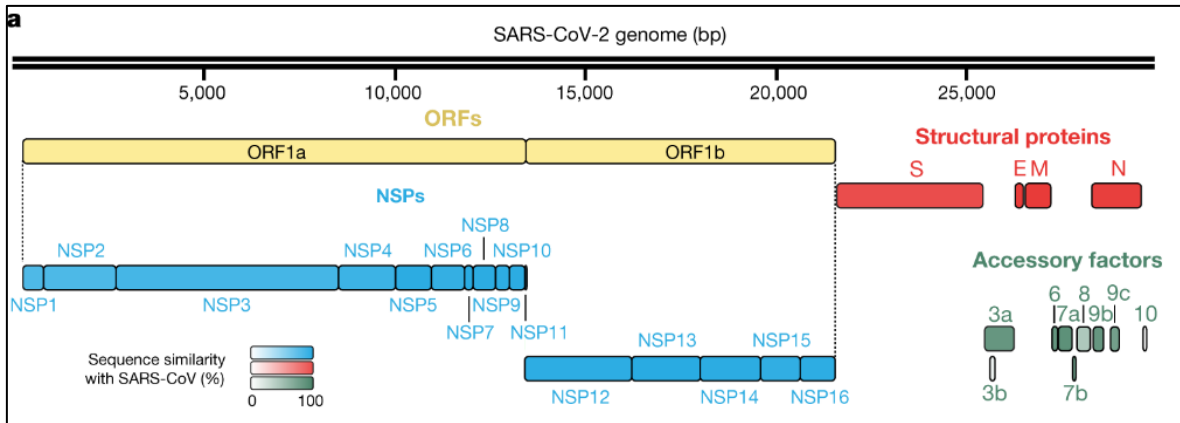
HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, SARS-CoV e MERS-CoV (JONSDOTTIR; DIJKMAN, 2016). Todos os seis HCoV apresentam sintomatologia variada, de quadros gripais leves a quadros mais graves, chamando a atenção para a sua importância médica, principalmente quanto aos mecanismos de evasão do sistema imune do hospedeiro e os possíveis alvos para desenvolvimento de vacinas (JONSDOTTIR; DIJKMAN, 2016).

No entanto, contrário aos outros coronavírus, o SARS-CoV-2 apresentou elevada transmissibilidade com um crescimento exponencial de novos casos, com transmissão através de indivíduos infectados e assintomáticos. Tal aumento foi observado em curto período, atingindo no final de março de 2020 quase 500 mil casos de pessoas com COVID-19, e aproximadamente 38 mil óbitos advindos da infecção no mundo (<https://covid19.who.int/>). Desta forma, com o aumento alarmante de casos, a OMS declarou a COVID-19 como um problema de saúde público, sendo caracterizado como pandemia no dia 11 de março de 2020.

O número de casos continuou aumentado exponencialmente no mundo, sendo a inserção das campanhas de vacinações, aproximadamente um ano após a descoberta do vírus, uma medida que se tornou eficaz para redução da transmissão e gravidade da doença (FIOLET *et al.*, 2022; GOLOB *et al.*, 2021; VITIELLO *et al.*, 2021). Posteriormente, na décima quinta reunião do Regulamento Sanitário Internacional (IHR; *International Health Regulations*), a COVID-19 deixou de ser uma emergência de saúde pública de interesse internacional (LENHARO, 2023; WHO, 2023).

2.2 SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 é um vírus da família Coronaviridae, pertencente ao gênero Betacoronavirus. Como outros coronavírus, é envelopado e apresenta uma única fita de RNA positiva. O seu genoma possui aproximadamente 29 kb em comprimento, sendo formado por longas poliproteínas, dentre elas as ORF1a e ORF1b, proteínas não-estruturais (NSP) que, após codificação e processamento, originam dezesseis outras NSPs; as quais são bem conservadas entre os coronavírus e desempenham funções importantes para realização de processos biológicos (NAQVI *et al.*, 2020). Conforme ilustrado na Figura 1, o genoma também é composto por quatro proteínas estruturais: a proteína *Spike* ou espícula (S), a de membrana (M), a do envelope (E) e a do nucleocapsídeo (N).



Legenda: Bp (Pares de base); ORFs (*Open reading frames*); NSP (Proteínas não codificantes); S (*Spike*); E (Envelope); M (Membrana); N (Núcleocapsídeo)

Figura 1 - Genoma completo do SARS-CoV-2.

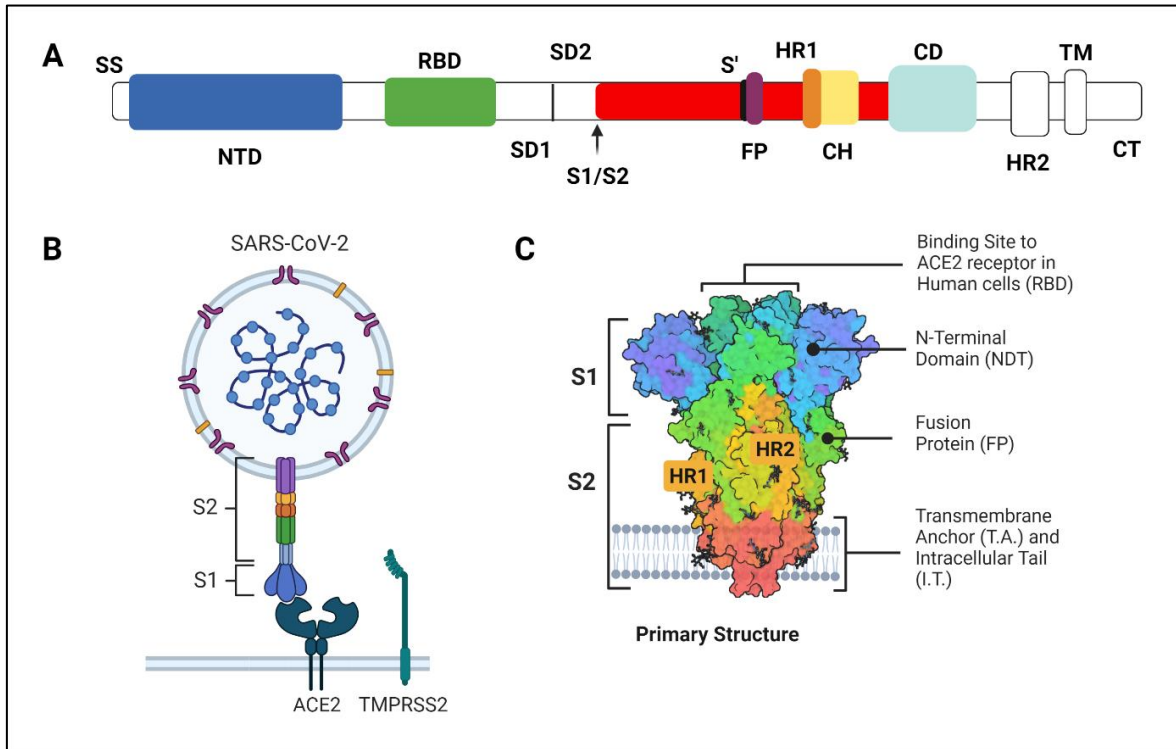
Fonte: Adaptada de (GORDON et al., 2020).

A proteína S é uma glicoproteína transmembranar de classe I que se estende a partir do envelope viral, formando diversas espículas responsáveis pela adesão à célula hospedeira e pelo processo de junção das suas membranas. Estruturalmente, a proteína M, glicoproteína mais abundante do vírion, desempenha importante papel da montagem da partícula viral, interagindo intimamente com as proteínas S, E e N. Enquanto a proteína E, um peptídeo composto por domínio transmembranar hidrofóbico e uma cauda citoplasmática carregada, é encontrado em pequenas quantidades, mas contribui de forma significativa para a patogênese do vírus. O núcleocapsídeo viral, encontrado durante os estágios iniciais da infecção, auxilia a introdução do RNA viral na célula hospedeira através da formação de uma ribonucleoproteína, a qual lhe confere proteção (SATARKER et al., 2020; SIU et al., 2008).

2.2.1 Proteína S

A proteína S, glicoproteína transmembranar trímica, é encontrada no envelope viral formando aproximadamente 15 a 30 espículas, as quais cobrem toda a sua superfície e atribuem um aspecto coroado ao vírion. É dividida em três regiões: o ectodomínio, a região transmembranar e o domínio intracelular (Figura 2). A porção externa da proteína S, o ectodomínio, consiste em duas subunidades de ligação ao receptor (S1) e de fusão de membrana (S2). A S1 é dividida em mais duas porções: o domínio N-terminal (NTD) e o domínio de ligação ao receptor (RBD), sendo esta última a porção responsável em reconhecer a célula hospedeira via o receptor da enzima conversora da angiotensina 2 (ACE2). Enquanto a S2 possui o maquinário responsável pela clivagem e fusão das membranas permitindo então o

início do ciclo de infecção do SARS-CoV-2 (KADAM et al., 2021; WANG et al., 2020; LI, 20216).



Legenda: SS (Sequência simples); NTD (Domínio N-terminal); RBD (Domínio de ligação ao receptor); SD1 (Subdomínio 1); SD2 (Subdomínio 2); S1/S2 (Sítio de clivagem da protease S1/S2); S2' (Sítio de clivagem da protease S2'); PF (Peptídeo de fusão); HR1 (Região heptada 1); CH (Hélice central); CD (Domínio do conector); HR2 (Região heptada 2); TM (Domínio transmembranar); CT (Cauda citoplasmática); ACE2 (Enzima conversora de angiotensina 2); TMPRSS2 (Protease serina transmembranar 2).

Figura 2 - Estrutura da proteína *Spike* do SARS-CoV-2.

Fonte: Elaborado pela autora (a partir <https://biorender.com/>)

2.2.1.1 Domínio de ligação ao receptor (RBD)

A RBD é uma das porções da subunidade 1 da proteína S, responsável pelo início do processo infeccioso se ligando especificamente à ACE2 nas células hospedeiras. A formação do complexo RBD/ACE2 induz a dissociação da S1 com a ACE2, e permite a transição da S2 de um estado de pré-fusão metaestável para um estado estável de pós-fusão, para a ativação da maquinaria responsável pela fusão das membranas (LAN *et al.*, 2020). A RBD é composta por dois subdomínios: um principal e um externo. O subdomínio principal consiste em cinco folhas- β dispostas de maneira antiparalela e conectadas por laços e hélices curtas (WANG *et al.*, 2020). Enquanto o subdomínio externo é inserido entre as fitas $\beta 4$ e $\beta 7$, composto por alça estabilizada ($\beta 5$ e $\beta 6$) conectadas por uma ligação dissulfeto. Dentre as fitas antiparalelas $\beta 4$ e $\beta 7$, encontra-

se o motivo de ligação ao receptor (RBM), o qual possui grande parte dos sítios de ligação entre o SARS-CoV-2 e ACE2 (LAN et al., 2020; SAPONARO et al., 2020).

A RBD apresenta mudanças conformacionais que permitem esconder ou expor os determinantes de ligação, lembrando o movimento de uma dobradiça. O estado aberto ocorre quando o domínio está livre para ligação à célula hospedeira, e estado fechado quando a RBD está parcialmente oculta, impossibilitando sua ligação a ACE2 (WALLS et al., 2020). Ao comparar as estruturas do SARS-CoV-2 com a de outros coronavírus, é possível encontrar algumas semelhanças, como o movimento de dobradiça existente no SARS-CoV e no MERS-CoV. Em específico, a estrutura do SARSCoV-2 e do SARS-CoV apresentam elevada homologia na proteína S e na RBD. Todavia, quando a RBD está em estado fechado, é possível observar uma diferença em relação à sua posição entre os vírus (WRAPP et al., 2020).

A RBD consiste em potencial alvo para o diagnóstico e tratamento da COVID-19, sendo que estudos recentes mostram sua dominância sobre a resposta de anticorpos neutralizantes policlonais em indivíduos infectados (GATTINGER et al., 2021; BERRY et al., 2010; CAO et al., 2020; PICCOLI et al., 2020; PREMKUMAR et al., 2020). Ademais é possível observar que altos níveis de anticorpos da classe G (IgG) contra epítomos conformacionais, mas não sequenciais, da RBD inibem a sua ligação com a ACE2, sendo caracterizada a sua atividade neutralizante. Anticorpos da classe M (IgM) também foram associados a altos títulos de anticorpos neutralizantes durante o início da fase convalescente (GATTINGER et al., 2021; BERRY et al., 2010; CAO et al., 2020; PICCOLI et al., 2020; PREMKUMAR et al., 2020). Estes achados permitem fortalecer o papel da RBD como possível alvo para desenvolvimento de testes diagnósticos e vacinas (MULLINGAN et al., 2020; RAVICHANDRAN et al., 2020)

A partir do surgimento de novas variantes do SARS-CoV-2 foi possível observar mutações importantes que influenciam na patogênese da infecção, sendo localizadas principalmente na proteína S (KORBER et al., 2020). Por meio da comparação do genoma selvagem com os demais presentes na plataforma GISAID, foram encontradas 725 mutações não degeneradas na proteína S, 89 das quais na RBD, e mais especificamente 52 na RBM (CHEN et al., 2023). Em especial, as mutações encontradas na RBD proporcionam aumento da sua força da ligação com o ACE2 e uma redução de 85% da atividade neutralizante quando comparado à cepa selvagem (LUPALA et al., 2022).

2.3 DOENÇA CORONAVÍRUS 2019 (COVID-19)

A COVID-19 é uma síndrome respiratória causada pelo SARS-CoV-2, transmitida principalmente através da via respiratória por meio de gotículas ou aerossóis expelidos por indivíduos infectados, e por meio de superfícies contaminadas; com transmissão por indivíduos assintomáticos ou sintomáticos (MEYEROWITZ et al., 2021; FURUKAWA et al., 2020). A doença afeta principalmente o sistema respiratório com sintomas inespecíficos, como febre, tosse, náuseas, dispneia, mialgia, fadiga, vômito e diarreia, podendo evoluir para uma pneumonia viral, acompanhada de falência de órgãos, síndrome respiratória aguda grave e óbito (GUAN et al., 2020). Outros sistemas e órgãos também podem ser afetados, visto que a ACE2 não é exclusiva de células do sistema respiratório, podendo apresentar manifestações hematológicas, renais, cardíacas, endócrinas, neurológicas, hepáticas, dermatológicas e gastrointestinais. Os achados laboratoriais mais comuns são linfocitopenia, neutrofilia, trombocitopenia, elevação de marcadores inflamatórios, fibrinogênio e D-dímero (GUPTA et al., 2020). A gravidade do quadro clínico é variada e seus desfechos são influenciados por fatores como idade avançada e comorbidades (ALSHAMMARY et al., 2022).

O vírus infecta as células hospedeiras através da ligação da proteína S ao ACE2, enzima presente em células epiteliais dos pulmões, intestinos, cérebro e dos vasos sanguíneos, realizando a fusão das membranas pela ação de serina-proteases TMPRSS2 (Transmembrane protease serina 2). Após entrada na célula, o RNA viral sequestra a sua maquinaria dando início a confecção de novas partículas virais. Neste processo, ocorre a formação de um complexo de transcrição-replicação que sintetiza RNAs subgenômicos e proteínas estruturais, para montagem posterior do vírion (FEHR; PERLMAN, 2015; KUMAR et al., 2020).

Diversos mecanismos podem estar relacionados à patogenicidade da COVID-19, a elevada transmissibilidade do SARS-CoV-2 e os diferentes desfechos clínicos. A regulação negativa da ACE2, devido ligação à RBD, promove desregulação do sistema angiotensina-aldosterona. Um outro mecanismo é a “tempestade de citocinas” devido à liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, que causa danos às células epiteliais (SAMUDRALA et al., 2020). Resposta imune exacerbada é comum em pacientes graves com COVID-19, com aumento da resposta humoral e redução da resposta celular, em particular redução da população de células T CD4+, mas com uma predominância de ação mediada por linfócitos Th2 (OJA et al., 2020). Diferentes perfis podem ser definidos de acordo com a evolução e gravidade da doença. O primeiro perfil, associado a um quadro moderado e consequente recuperação, é

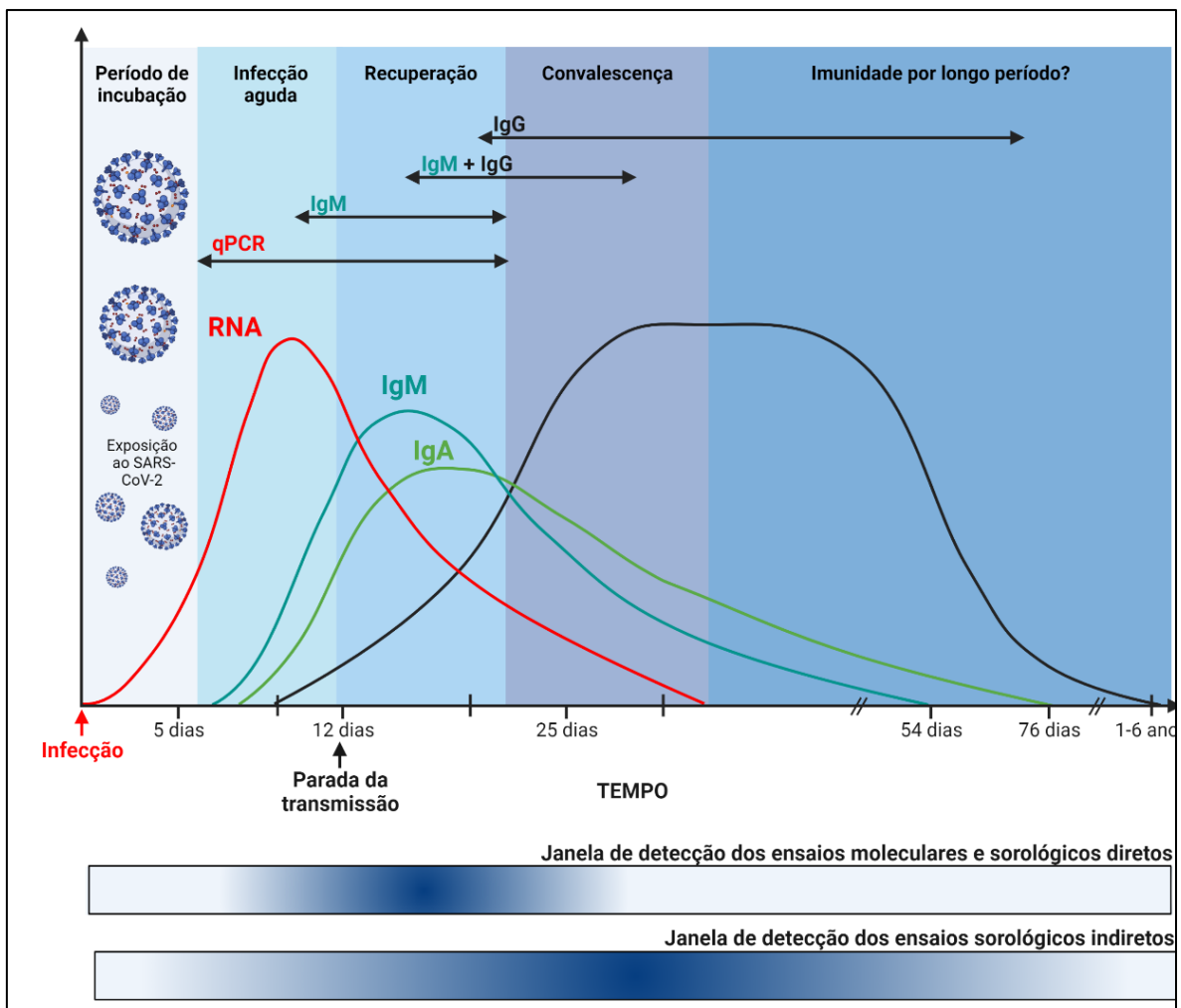
caracterizado por baixa expressão de citocinas pró-inflamatórias e aumento nos genes de reparo tecidual. Enquanto o segundo e terceiro perfis são associados à sintomatologia grave com elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias e possível falecimento. Por último, um quarto perfil pode ser construído caracterizado pela “tempestade” de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, gerando danos a diversos órgãos e sistemas (LUCAS et al., 2020).

2.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O surgimento do SARS-CoV-2 deu início a uma corrida para desenvolver ferramentas diagnósticas eficazes para identificação dos casos para isolamento social, tratamento, controle e investigação epidemiológica. De imediato, a confirmação do diagnóstico da COVID-19 baseia-se na detecção do RNA viral, que pode ser realizada através de amostras de secreção respiratória, destacando *swabs* nasofaríngeos e orofaríngeos, através da RT-PCR para detecção da infecção em sua fase aguda (KEVADIYA et al., 2021). A publicação da sequência genômica do SARSCoV-2 permitiu a realização de diferentes estudos, aprimorando os ensaios e permitindo a seleção de alvos para síntese de primers (iniciadores) específicos de regiões de interesse (ROIs) exclusivas do vírus, tais como: a estrutura de leitura aberta de replicase (ORF1a/b), espícula (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N). Contudo, a interpretação dos resultados deve ser realizada com cautela. De fato, a variabilidade na liberação do material viral (viral shedding) pode levar a perda da sensibilidade do teste dependendo do tipo de amostra coletada e a data de realização do exame após o início dos sintomas. A redução da sensibilidade pode prejudicar o rastreamento de casos ativos, isolamento de indivíduos infectados e a introdução de terapia adequada (CHAU et al., 2020; WIKRAMARATNA et al., 2020).

Outros tipos de ensaios utilizados no diagnóstico da COVID-19 são os de neutralização de anticorpos, testes rápidos para detecção de antígenos, os ensaios de repetições palindrômicas curtas agrupadas regularmente espaçadas (CRISPR), sequenciamento de nova geração (NGS) e ensaios de amplificação isotérmica de ácido nucleico (INAA) (QURAIISHI; UPADHYAY; NIGAM, 2022; ROTONDO et al., 2022). No entanto, os testes comerciais baseados nas tecnologias acima mencionadas apresentam vantagens e desvantagens quanto ao seu desempenho. A maioria deles necessita de equipamentos sofisticados e profissionais qualificados para a sua realização e interpretação dos resultados.

Em um estudo realizado por Kucirka e cols. (2020), foi observada elevada taxa de resultados falso-negativos quando a RT-PCR foi realizada nos primeiros quatro dias e depois do nono dia após o surgimento dos sintomas. Estes achados sugerem que o melhor período para realização do teste situa-se entre o quinto e oitavo dia pós-início dos sintomas. Uma lacuna é criada quando testes moleculares apresentam pequena janela de detecção para investigação de casos ativos. Assim, o decaimento da carga viral durante a infecção pelo SARS-CoV-2 torna-se um fator limitante para o sucesso diagnóstico. Por este motivo, a detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 constitui uma alternativa na busca de casos da infecção, fornecendo informações complementares aos ensaios moleculares (Figura 3).



Legenda: qPCR (Reação em cadeia da polimerase em tempo real); IgM (Anticorpos da classe M); IgG (Anticorpos da classe G); IgA (Anticorpos da classe A).

Figura 3 - Cinética de anticorpos (IgA, IgM e IgG) anti-SARS-CoV-2 e de detecção de RNA viral no curso de COVID-19 branda.

Fonte: (Acervo GRUPYBE).

Com base no exposto, o uso de ensaios sorológicos indiretos é indicado para avaliação de indivíduos 14 dias após o surgimento dos sintomas, com quadro clínico indicativo de COVID-19 e/ou RT-PCR negativa. Outra utilidade baseia-se na avaliação de infecções passadas e da resposta imune, quando utilizados após 14 ou mais dias após o início dos sintomas; bem como ferramenta epidemiológica para realização de estudos de soroprevalência (DEEKS et al., 2020). Devido à baixa conservação da RBD entre coronavírus, testes que a utilizam como matriz antigênica mostram elevada especificidade, mesmo quando testados com soro de camundongos infectados com os coronavírus responsáveis por outras zoonoses (PREMKUMAR et al., 2020).

Durante a corrida para o desenvolvimento de ensaios sorológicos indiretos para o diagnóstico da COVID-19, diversos testes foram lançados no mercado. Todavia, poucos avaliaram o uso da RBD isolada como matriz antigênica. Entretanto, os poucos estudos que avaliaram o potencial diagnóstico da RBD demonstraram elevado potencial diagnóstico desta molécula, indicando que ela pode ser útil em inquéritos sorológicos e na detecção de indivíduos infectados após duas semanas do início dos sintomas (PETERHOFF et al., 2021; INDENBAUM et al., 2020). Além disso, existe uma correlação entre anticorpos anti-RBD e a neutralização do SARS-CoV-2, devido a uma possível ação protetora conferida por estes anticorpos, aumentando o seu potencial diagnóstico (PETERHOFF et al., 2021; INDENBAUM et al., 2020).

3 OBJETIVOS

3.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o desempenho da proteína RBD do vírus SARS-CoV-2 para o imunodiagnóstico da COVID-19.

3.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Padronizar o teste imunoenzimático no formato ELISA indireto utilizando a proteína RBD (RBD-ELISA) para detecção de anticorpos IgG e IgM anti-SARS-CoV-2;
- b) Determinar os parâmetros de desempenho do RBD-ELISA utilizando amostras séricas positivas e negativas para a COVID-19;
- c) Avaliar a reatividade cruzada utilizando amostras séricas de indivíduos positivos para outras doenças infecto-parasitárias de interesse epidemiológico no Brasil.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

4.1.1 Locais de Experimentação

A avaliação e validação do potencial diagnóstico do antígeno RBD foram realizadas no Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP), do Instituto Gonçalo Moniz – IGM/Fiocruz-BA.

4.1.2 Considerações éticas

Este estudo encontra-se inserido no projeto “Enfrentamento da COVID-19: desenvolvimento de métodos de diagnóstico *in vitro* de alto desempenho”, aprovado pelo CEP do Instituto Gonçalo Moniz - IGM/ FIOCRUZ/ BA, CAAE: 33552720.0.0000.0040. (Anexo A).

4.2 ANTÍGENO RECOMBINANTE

A fração recombinante da RBD foi cedida pelo Instituto de Desenho de Proteínas (*Institute for Protein Design*, Seattle, WA, EUA). O gene sintético foi obtido comercialmente e clonado no vetor pET28a. Os antígenos foram expressos em células de mamíferos HEK293, transfectados com o vetor híbrido por densidade e PEI-MAX. As células foram cultivadas no meio Expi293TM à 37 °C, em 75% de umidade, 8% de CO₂, 150 RPM com 25 mm de alcance. A cultura foi realizada em frasco crescimento ideal de 1,6 L (Thomson Instrument Company, EUA) com tampa de ventilação estéril. Após três dias de cultivo houve a colheita do antígeno recombinante via filtração estéril, de acordo com o protocolo do fabricante. O antígeno foi enviado para o LASP já purificado e pronto para uso.

4.3 PAINEL SOROLÓGICO

4.3.1 Dimensionamento amostral

Para o estudo de avaliação do desempenho diagnóstico, o cálculo amostral foi realizado utilizando o *software* OpenEpi (DEAN *et al.*, 2013) considerando população > 1 milhão, sensibilidade e especificidade esperada de 99%, intervalo de confiança de 95%, e erro absoluto de 2,5%. Assim, foram estimadas 122 amostras: 61 amostras positivas e 61 negativas.

4.3.2 Obtenção e caracterização do painel amostral

O painel sorológico para avaliação do potencial diagnóstico da fração RBD foi composto por 705 amostras elegíveis: 354 amostras séricas positivas para COVID-19 pertencentes a 128 indivíduos infectados e 351 amostras séricas negativas. As amostras positivas para COVID-19 foram oriundas de pacientes internados no hospital Aliança e na Maternidade José Maria de Magalhães Neto, situados em Salvador (Bahia), e do hospital Aeroporto, situado em Lauro de Freitas (Bahia). As amostras foram coletadas no período de março a outubro de 2020; e foram estratificadas por intervalos de acordo com a data da coleta após o início dos sintomas: 0-7 dias, 8-14 dias, 15-21 dias, e >22. As amostras negativas para COVID-19 foram obtidas da Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA) e coletadas em período prévio à pandemia. As amostras foram avaliadas quanto a presença ou ausência de anticorpos IgM e IgG anti-SARS-CoV-2 utilizando três testes comerciais: GOLD ELISA COVID-19 IgG+IgM (REM Diagnóstica SA, São Paulo, SP, Brasil), Anti-SARS-CoV-2 NCP ELISA (IgG) (EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Alemanha) e Anti-SARS-CoV-2 NCP ELISA (IgM) (EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Alemanha). Os testes comerciais foram realizados de acordo com as instruções dos fabricantes. Na avaliação de reatividade cruzada foram utilizadas amostras séricas colhidas no período pré-pandemia e sorologicamente positivas para cada umas das seguintes doenças infecto-parasitárias: dengue (n = 20), sífilis (n = 20), HIV-1/2 (n = 20), HTLV-1/2 (n = 20), HCV (n = 20), HBV (n = 20), doença de Chagas (n = 5), filariose (n = 5) e leishmaniose (n = 5).

4.4 PADRONIZAÇÃO DO RBD-ELISA

O ensaio imunoenzimático no formato ELISA indireto (RBD-ELISA) foi padronizado selecionando as condições que melhor diferenciaram amostras positivas de negativas para a COVID-19. Desta maneira, quantidades variadas de antígeno (RBD), diferentes diluições dos anticorpos secundários IgG e IgM marcados com peroxidase e de amostras séricas foram avaliadas utilizando uma matriz de decisão (*checkerboard titration*). Os antígenos foram avaliados nas quantidades de 25, 50, 100 e 200 ng, os anticorpos secundários nas diluições de 1:2.500, 1:5.000, 1:10.000, 1:20.000, 1:40.000 e 1:80.000 e amostras séricas das diluições de 1:50, 1:100 e 1:200. Para a padronização do RBD-ELISA IgG e IgM foram utilizados 4 *pools* de amostras séricas negativas (N1, N2, N3 e N4) e 3 compostos por amostras positivas (P1, P2 e P3) para COVID-19, previamente caracterizados por testes comerciais.

4.4.1 Sensibilização das microplacas

Com objetivo de otimizar as condições do RBD-ELISA, a sensibilização das microplacas foi realizada considerando diferentes sistemas-tampão. Inicialmente, 100 µl de solução tampão carbonato/bicarbonato (50 mM, pH 9,4; carbonato de sódio – Na₂CO₃ e bicarbonato de sódio – NaHCO₃; pH 9,4), tampão PBS (pH 7,4; fosfato dissódico – Na₂HPO₄, fosfato monossódico – NaH₂PO₄, cloreto de sódio - NaCl) e tampão TRIS-HCL (20 mM, pH 8,4; tris(hidroximetil)aminometano-(HOCH₂)₃CNH₂, ácido clorídrico – HCl) contendo 100 ng do antígeno RBD foram adicionados aos poços de microplacas de poliestireno de alta ligação de 96 cavidades de fundo chato (Corning[®] 96-well, Costar, Glendale, AZ, EUA). Em seguida, as microplacas foram incubadas *overnight* (16 ± 2 horas a 8 °C). Após este período, foram acrescentados 100 µl da solução WellChampion™ (lote 130703; Ken-Em-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Dinamarca) por poço, para sensibilização e bloqueio. Após 15 minutos de incubação a temperatura ambiente, as microplacas foram esvaziadas por inversão e colocadas em estufa a 37 °C por 90 minutos para secagem (MARCONI[®] MA032, São Paulo, SP, Brasil).

4.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DIAGNÓSTICO

Após a sensibilização das microplacas, os poços foram lavados uma vez utilizando 250 µl de tampão PBS Tween-20 a 0,05% (PBS-T). Em seguida, 100 µl das amostras séricas na

diluição pré-determinada foram adicionados aos poços. As microplacas foram seladas e incubadas por 30 minutos a 37 °C (MARCONI® MA032, São Paulo, SP, Brasil). Ao final desta etapa, os poços foram lavados cinco vezes com 250 µl de tampão PBS-T. Em seguida, 100 µl do anticorpo secundário anti-humano HRP IgG (LATED, Biomanguinhos, FIOCRUZ-RJ; lote 225EXCJHP16Z) ou anticorpo secundário anti-humano HRP IgM (LATED, Biomanguinhos, FIOCRUZ-RJ), diluídos em PBS-T, foram adicionados a cada poço, na condição pré-selecionada.

Novamente as microplacas foram seladas e incubadas por 30 minutos a 37 °C (MARCONI® MA032, São Paulo, SP, Brasil). Subsequentemente, um novo ciclo de lavagem foi realizado conforme descrito anteriormente. Então, 100 µl da solução reveladora TMB Plus (lote 111011; Ken-Em-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Dinamarca) foram adicionados aos poços e as microplacas incubadas por 15 minutos sob abrigo de luz. Após a incubação, 50 µl de H₂SO₄ a 0,2 M foram adicionados para a interrupção das reações. Por fim, a leitura das microplacas foi realizada em um espectrofotômetro (SPECTRAmax 340PC®, San José, CA, EUA) a 450 nm.

4.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.6.1 Padronização: definição das melhores condições de ensaio

Para definição das condições que melhor diferenciavam amostras positivas de negativas, foi calculada a relação de sinal-ruído (SNR) e a diferença entre as médias aritméticas das densidades óticas (DO) dos *pools* de amostras positivas e das negativas acrescida a três desvios-padrão (DP). Além disso, foi estabelecido pelo nosso grupo de pesquisa que a média das DO dos *pools* de amostras positivas apresentasse sinal superior a 0,80 e a das negativas sinal inferior a 0,15.

4.6.2 Definição do ponto de corte (*Cut-off*)

O ponto de corte (CO) foi calculado individualmente para cada microplaca. Diferentes fórmulas foram utilizadas, considerando os maiores valores de sensibilidade, especificidade e acurácia. Desta forma, a média dos controles negativos (XNEG) e seus respectivos desvios

padrões (DP) foram calculados e seis fórmulas para determinação do CO foram utilizadas, conforme descrito abaixo:

$$CO\ 1 = \text{Área abaixo da curva ROC (AUC)}$$

$$CO\ 2 = XNEG + 0,130$$

$$CO\ 3 = XNEG \times 2$$

$$CO\ 4 = XNEG \times 3$$

$$CO\ 5 = XNEG + 3DP$$

$$CO\ 6 = XNEG + 2DP$$

4.6.3 Normalização dos dados

A normalização dos dados foi obtida através do cálculo do índice de reatividade (IR), de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Índice de reatividade (IR)} = \frac{\text{DO da Amostra}}{\text{Valor do CO}}$$

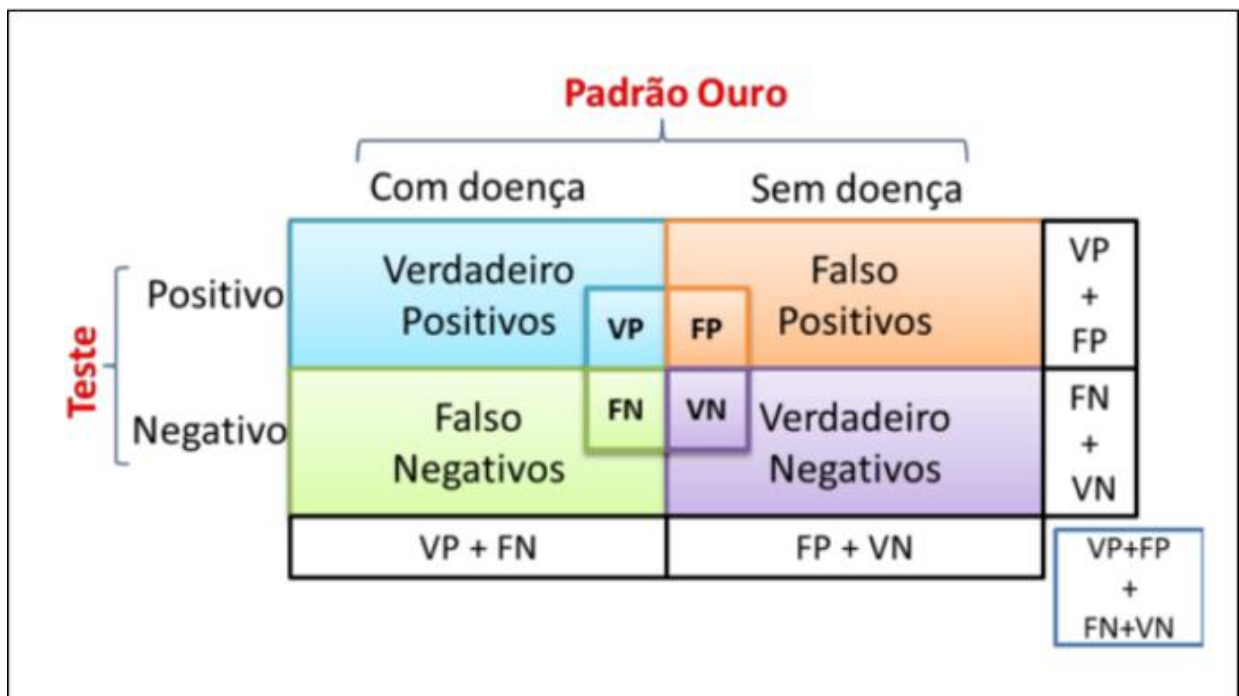
A partir do IR, foram consideradas negativas todas as amostras com sinal inferior a 1,00 ($IR < 1,00$) e positivas todas aquelas com sinal igual ou superior a 1,00 ($IR \geq 1,00$). A zona cinza foi composta por amostras que obtiveram $IR = 1,0 \pm 10\%$. Sinal igual ou inferior a 1,20 para as amostras positivas ($IR \leq 1,20$) e superior ou igual a 0,80 para as amostras negativas ($IR \geq 0,80$) foram adotados como critério de repetição.

4.6.4 Parâmetros de desempenho

Os parâmetros de desempenho foram estimados utilizando tabelas de dupla entrada (2 x 2) ou de contingência, conforme ilustrado na figura 4. A partir desta tabela foi realizado o cálculo da sensibilidade, especificidade, acurácia, razões de verossimilhança (RV), índice *Kappa* de Cohen (κ), a razão de probabilidades diagnósticas (DOR) e área abaixo da curva ROC (AUC), junto com seus respectivos intervalos de confiança a 95% (IC95%).

Através da tabela de dupla entrada, alguns conceitos podem ser formulados e os parâmetros de desempenho calculado, tais como (SANTOS, 2016):

- Verdadeiro Positivos (VP): são amostras que possuem resultado positivo no teste índice dentro do grupo amostral previamente diagnosticado como positivo para a COVID-19;
- Verdadeiro Negativos (VN): são amostras que possuem resultado negativo no teste índice dentro do grupo amostral previamente diagnosticado como negativo para a COVID-19;
- Falso Positivos (FP): são amostras que possuem resultado positivo no teste índice dentro do grupo amostral previamente diagnosticado como negativo para a COVID-19;
- Falso Negativos (FN): são amostras que possuem resultado negativo no teste índice dentro do grupo amostral previamente diagnosticado como positivo para a COVID-19.



Legenda: FN (Falso negativos); FP (Falso positivos); VN (Verdadeiro negativos); VP (Verdadeiro positivos).

Figura 4 - Combinação binária entre os prováveis resultados obtidos em um determinado teste e o diagnóstico verdadeiro da doença.

Fonte: (SANTOS, 2016).

Assim, através da combinação binária, foram calculados os seguintes parâmetros (OUCHCHANE; RABILLOUD; BOIRE, 2009):

- ✓ Sensibilidade (Sen). Definida como a probabilidade de um resultado ser positivo pelo teste índice dentre as amostras sorologicamente positivas para COVID-19. Desta forma, o total de resultados verdadeiramente positivos sobre o total de amostras

positivas. Quanto mais próxima de 1 (ou 100%) estiver a sensibilidade, melhor será o desempenho do teste. Esta probabilidade é estimada conforme a fórmula abaixo:

$$Sen = \frac{VP}{VP + FN}$$

- ✓ Especificidade (Esp). Definida como a probabilidade de um resultado ser negativo pelo teste índice dentre as amostras sorologicamente negativas para COVID-19. Desta forma, o total de resultados verdadeiramente negativos sobre o total de amostras negativas. Assim, com a interpretação similar a sensibilidade, quanto mais próxima de 1 (ou 100%) estiver a especificidade, melhor será o desempenho do teste. Esta probabilidade é estimada conforme a fórmula abaixo:

$$Esp = \frac{VN}{VN + FP}$$

Os valores dos intervalos de confiança a 95% (IC 95%) para a sensibilidade e especificidade foram calculados conforme as fórmulas abaixo:

$$IC95\% = \pm 1,96x \sqrt{\frac{Sen \times (1-Sen)}{NDo}} \quad \text{e} \quad IC95\% = \pm 1,96x \sqrt{\frac{Esp \times (1-Esp)}{NSa}}$$

Legenda: NDo = número de doentes; NSa = número de sadios

- ✓ Acurácia (Acc). Também conhecida como Exatidão (Exa), refere-se aos resultados corretamente classificados (VP e VN) dentre as amostras avaliadas, ou seja, representa a proporção de diagnósticos corretos. O seu valor varia de 0 a 1, sendo que 1 (ou 100%) corresponde ausência de resultados falso positivos e falso negativos. Esta probabilidade é estimada conforme a fórmula abaixo:

$$Exa = \frac{VP + VN}{VP + FP + FN + VN}$$

- ✓ Razões de verossimilhança (RV) são parâmetros que permitem quantificar informações precisas de um novo teste. As RVs são calculadas para verificar se os resultados do RBD-ELISA interferem de forma positiva ou negativa na probabilidade laboratorial de diagnosticar a COVID-19. Semelhante ao risco relativo, mostram quantas vezes é aumentada a probabilidade do teste de detectar determinado resultado em uma amostra.

As RVs são interpretadas de acordo com a tabela abaixo (Quadro 1), sendo que um melhor desempenho é encontrado quando a RV é diferente de 1.Z

Quadro 1 - Interpretação dos valores das razões de verossimilhança.

Resultados possíveis	Interpretação
RV > 10	Aumento significativo da probabilidade
RV 5 a 10	Aumento moderado da probabilidade
RV 2 a 5	Aumento pequeno da probabilidade
RV 1 a 2	Aumento insignificante da probabilidade
RV = 1	Sem significado estatístico
RV 0,5 a 1	Diminuição insignificante da probabilidade
RV 0,2 a 0,5	Diminuição pequena da probabilidade
RV 0,1 a 0,2	Diminuição moderada da probabilidade
RV < 0,1	Diminuição significativa da probabilidade

Legenda: RV (Razão de verossimilhança).

Fonte: Adaptado de (OUCHCHANE; RABILLOUD; BOIRE, 2009).

Os testes diagnósticos com resultado dicotômico possuem dois coeficientes de probabilidade possíveis: o positivo e o negativo. A RV positiva (RV+) corresponde quantas vezes aumenta a probabilidade de encontrar um resultado positivo em uma amostra que seja positiva (sensibilidade) do que em uma amostra negativa (complemento da especificidade). A RV negativa (RV-) indica quantas vezes aumenta a probabilidade de encontrar um resultado negativo em uma amostra positiva (complemento da sensibilidade) do que em uma amostra negativa (especificidade). Ambos os parâmetros foram calculados como segue abaixo:

$$RV_{+} = \frac{Sen}{1 - Esp} \quad e \quad RV_{-} = \frac{1 - Sen}{Esp}$$

- ✓ Índice *Kappa* de Cohen (κ). Parâmetro que mede o grau de concordância entre medidas da mesma variável categórica que não acontece ao acaso. Esta medida tem como valor máximo 1,00 que representa concordância total entre as avaliações e valor mínimo zero, indicando ausência de concordância entre as avaliações. Os valores do índice κ e do IC95% são calculados como descrito abaixo, onde P_o representa a probabilidade observada e P_e a probabilidade esperada e são interpretados de acordo com a quadro 2 (SANTOS, 2016):

$$\kappa = \frac{Po - Pe}{1 - Pe} \quad e \quad IC95\% = \kappa \pm 1,96 \sqrt{\frac{Po(1 - Po)}{n(1 - Pe)(1 - Pe)}}$$

Quadro 2 - Interpretação do Índice Kappa de Cohen (κ).

Índice κ de Cohen	Concordância
> 0,00	Nenhuma
0,00 a 0,20	Fraca
0,21 a 0,40	Razoável
0,41 a 0,60	Regular
0,61 a 0,80	Moderada
0,81 a 0,99	Quase perfeita
1,00	Perfeita

Fonte: adaptado de (LANDIS; KOCK, 1977).

Neste caso, os resultados obtidos no RBD-ELISA foram comparados quanto à concordância com o teste padrão da COVID-19 (clínica + RT-PCR).

- ✓ Razão da probabilidade diagnóstica (DOR). É definido como a razão entre a probabilidade de o teste ser positivo se o indivíduo possuir a COVID-19 em relação a probabilidade de o teste ser positivo se o indivíduo for negativo para a COVID-19. Os valores de DOR variam de zero ao infinito. Todavia, os testes só são úteis se os valores forem maiores que 1. Quanto mais elevados os valores de DOR, melhor o desempenho do teste. Este parâmetro é calculado como segue abaixo (SANTOS, 2016):

$$DOR = \frac{RV +}{RV -}$$

- ✓ Área abaixo da curva ROC (AUC). Parâmetro estimado a partir da obtenção de curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic Curve*). A partir dos gráficos formados, a área abaixo da curva é calculada, com seu valor variando de 0 a 1. Os testes diagnósticos apresentam utilidade quando os valores são acima de 0,50. A construção das curvas ROC e determinação dos valores de AUC foram realizados utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., Chicago, IL, EUA). A interpretação dos valores de AUC estão descritos no quadro 3 (SWETS, 1988).

Quadro 3 - Interpretação dos valores da área abaixo da curva ROC (AUC).

Resultados possíveis	Interpretação
$1,00 \leq AUC \leq 0,90$	Excelente
$0,90 < AUC \leq 0,80$	Bom
$0,80 < AUC \leq 0,70$	Razoável
$0,70 < AUC \leq 0,60$	Pobre
$0,60 < AUC \leq 0,50$	Fracó

Legenda: AUC (Área abaixo da curva ROC).

Fonte: adaptado de (SWETS, 1988).

Os RBD-ELISA IgG e IgM foram avaliados por meio da análise combinatória, cujo objetivo foi utilizar os parâmetros de desempenho obtidos nos ensaios individualmente (Sen, Esp e Exa), para elevação da qualidade do teste e reduzir os resultados falso positivos e falso negativos. Assim, foram feitas as análises em série e em paralelo:

- ✓ Em série. O resultado é positivo quando os dois testes (A e B) são positivos.

$$T_{s+} = A_+ \cap B_+$$

- ✓ Em paralelo. Quando um dos testes é positivo (A), o teste conjunto também é (B).

$$T_{p+} = A_+ \cup B_+$$

4.6.5 Testes estatísticos

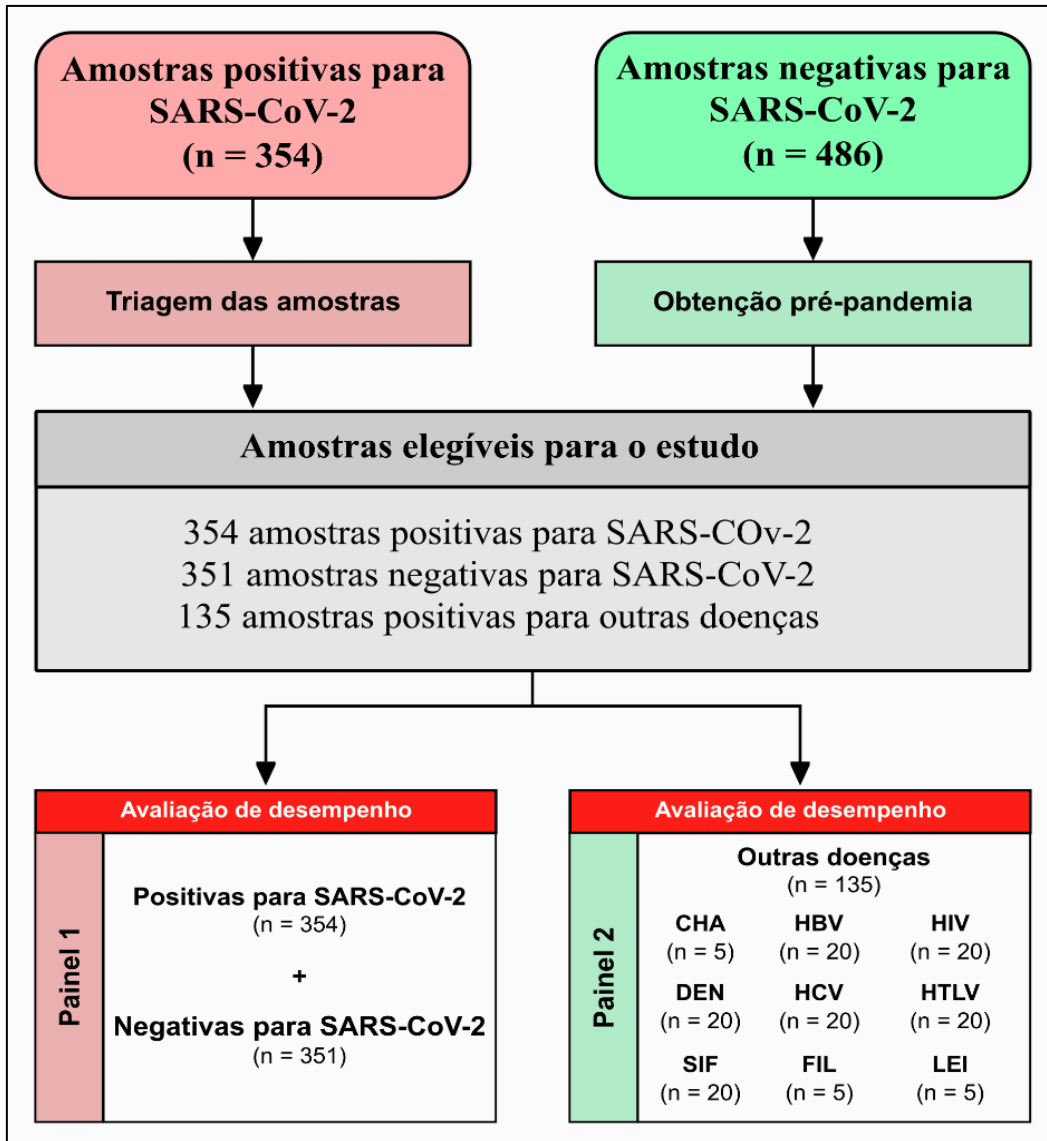
As análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Prism v8.0, Chicago, IL, EUA). As medidas descritivas foram apresentadas através de média geométrica, desvio padrão e coeficiente de variação. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para testar a normalidade dos dados. Uma vez rejeitada a hipótese nula foi utilizado o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. No caso de confirmação da normalidade dos dados foi utilizado o teste T de Student. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de $p < 0,05$. A ausência de sobreposição dos valores dos IC95% foi considerada significância estatística.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO PAÍNEL SOROLÓGICO

Um total de 840 amostras foram incluídas no presente estudo (Figura 5). A mediana da idade dos indivíduos positivos para SARS-CoV-2 foi de 49 anos (intervalo interquartil: 35,5-67,0 anos). A infecção pelo SARS-CoV-2 (n = 354) foi encontrada com mais frequência em mulheres (53,1%) em comparação com homens (46,9%). As amostras positivas foram classificadas pelo início dos sintomas da seguinte forma: 0-7 dias após o início dos sintomas, 8-14 dias após o início dos sintomas, 15-21 dias após o início dos sintomas e até 21 dias após o início dos sintomas. As 354 amostras positivas para COVID-19 foram avaliadas por três testes sorológicos e por RT-PCR. Elas foram oriundas de 128 indivíduos admitidos em unidades hospitalares e com quadro clínico compatível com a infecção.

As amostras negativas (n = 351) e as positivas para outras doenças infecto parasitárias (n = 135) foram coletadas em período pré-pandêmico, não havendo necessidade de avaliação pelos testes comerciais. Entretanto, 161 amostras negativas para a COVID-19 foram submetidas aos testes comerciais para possibilitar a análise dos parâmetros de desempenho. Assim, as amostras foram divididas em dois painéis: o primeiro para avaliação de desempenho dos ELISA composto por amostras positivas e negativas para COVID-19, e um segundo para avaliação de reatividade cruzada composto pelas amostras positivas para outras doenças infecto-parasitárias.



Legenda: CHA (doença de Chagas); FIL (Filariose); HBV (Hepatite B); HCV (Hepatite C); HIV (Vírus da imunodeficiência humana); HTLV (Vírus linfotrófico de células T humanas); LEI (Leishmaniose).

Figura 5 - Painel da caracterização sorológica.

Fonte: Elaborado pela autora

5.2 RBD-ELISA IgG

5.2.1 Padronização do ELISA indireto IgG

5.2.1.1 Obtenção dos controles

Na padronização do RBD-ELISA para detecção de anticorpos IgG, foram utilizadas 14 amostras positivas e 16 amostras negativas para COVID-19, as quais foram previamente caracterizadas por testes comerciais. Estas amostras foram utilizadas para formação de 3 *pools*

contendo amostras positivas e 4 *pools* contendo amostras negativas. Os índices de reatividade nos testes comerciais encontram descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Índices de reatividade obtidos por testes comerciais das amostras séricas positivas e negativas para COVID-19 utilizadas para a confecção dos *pools* séricos usados na padronização.

Amostra	Perfil sorológico	IR GOLD	IR EURO IgG	IR EURO IgM	Pool
LIBCOV-158	Positiva 1	2,10	0,92	0,27	P1
LIBCOV-146	Positiva 2	6,39	8,85	7,49	P1
LIBCOV-29	Positiva 3	4,80	3,66	1,52	P1
LIBCOV-16	Positiva 4	7,01	6,52	10,43	P1
LIBCOV-21	Positiva 5	6,95	7,37	10,59	P2
LIBCOV-125	Positiva 6	3,57	0,72	5,85	P2
LIBCOV-166	Positiva 7	4,38	4,02	0,45	P2
LIBCOV-163	Positiva 8	3,55	2,34	0,39	P2
LIBCOV-147	Positiva 9	5,37	6,56	16,37	P2
LIBCOV-19	Positiva 10	5,05	5,42	8,05	P3
LIBCOV-23	Positiva 11	5,45	7,51	7,86	P3
LIBCOV-18	Positiva 12	5,23	4,15	1,41	P3
LIBCOV-44	Positiva 13	5,35	5,51	5,49	P3
LIBCOV-63	Positiva 14	6,50	6,34	2,87	P3
HEMOBA-2653	Negativa 1	0,22	0,13	0,57	N1
HEMOBA-2654	Negativa 2	0,22	0,10	0,36	N1
HEMOBA-2647	Negativa 3	0,21	0,08	0,20	N1
HEMOBA-2640	Negativa 4	0,23	0,13	0,05	N1
HEMOBA-2663	Negativa 5	0,21	0,9	0,1	N2
HEMOBA-2650	Negativa 6	0,23	0,09	0,18	N2
HEMOBA-2648	Negativa 7	0,25	0,08	0,29	N2
HEMOBA-2636	Negativa 8	0,23	0,13	0,18	N2
HEMOBA-2686	Negativa 9	0,23	0,14	0,52	N3
HEMOBA-2642	Negativa 10	0,29	0,1	0,04	N3
HEMOBA-2625	Negativa 11	0,23	0,13	0,16	N3
HEMOBA-2713	Negativa 12	0,23	0,11	0,06	N3
HEMOBA-2707	Negativa 13	0,27	0,08	0,15	N4
HEMOBA-2695	Negativa 14	0,23	0,13	0,18	N4
HEMOBA-2689	Negativa 15	0,25	0,12	0,27	N4
HEMOBA-2632	Negativa 16	0,29	0,15	0,16	N4

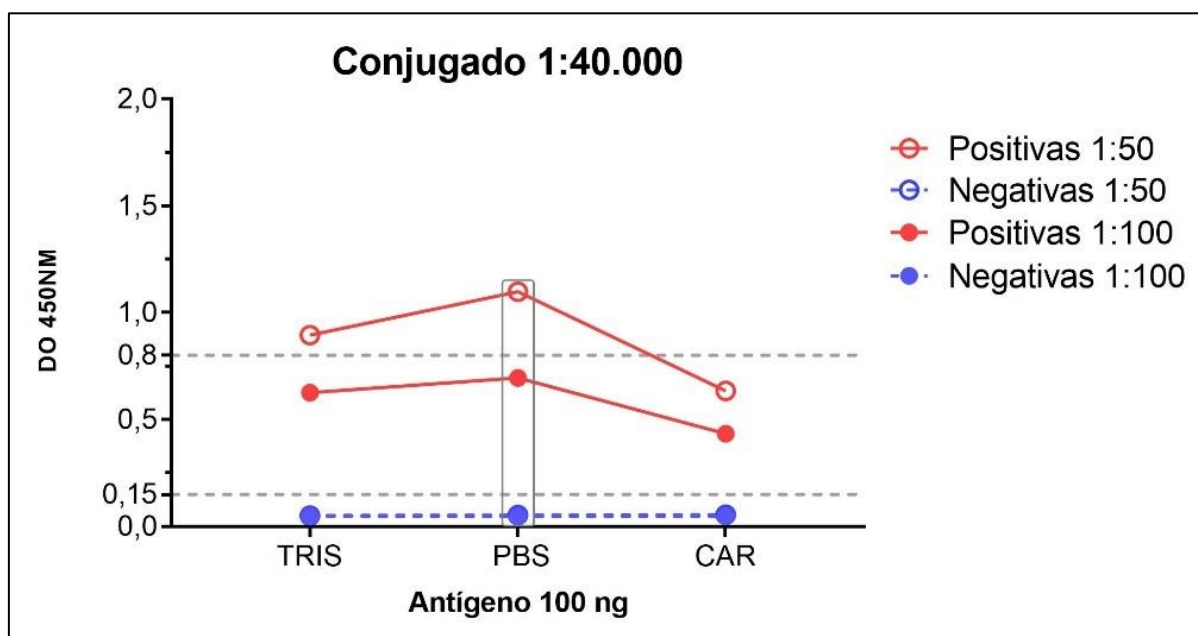
Legenda: IR (Índice de reatividade); P (Positivo); N (Negativo); EURO IgM (Anti-SARS-CoV-2 NCP ELISA IgM); EURO IgG (Anti-SARS-CoV-2 NCP ELISA (IgG); GOLD (GOLD ELISA COVID-19 IgG + IgM).

Fonte: Elaborado pela autora

5.2.1.2 Seleção do sistema-tampão

Inicialmente, três tampões foram testados para a sensibilização do antígeno, a saber: carbonato/bicarbonato (pH 9,4), tampão PBS (pH 7,4) e tampão TRIS-HCL (pH 8,4). Para esta avaliação, o antígeno foi estabelecido em 100 ng/poço e o anticorpo secundário anti-IgG na

diluição de 1:40.000. Contudo, as amostras séricas foram testadas nas diluições de 1:50 a 1:100 (Figura 6).



Nota: As linhas em vermelho representam as amostras positivas e as linhas em azul as negativas. O limite mínimo inferior requerido para o conjunto de amostras positivas foi de 0,8 e o limite máximo exigido para o conjunto de amostras negativas foi de 0,15. A melhor condição foi destacada da figura (retângulo).

Legenda: DO (Densidade ótica); CAR (carbonato/bicarbonato); TRIS (TRIS HCl); PBS (*Phosphate Buffered Saline*).

Figura 6 - Análise gráfica das densidades óticas da padronização dos imunoenaios utilizando três sistemas-tampão.

Através do cálculo do SNR foi observado que o melhor sistema-tampão para sensibilização das microplacas foi o PBS, atingindo SNR de 20,6 e 14,8 para amostras diluídas 50 e 100 vezes, respectivamente. O carbonato apresentou o menor desempenho dentre os três sistemas-tampão (Tabela 2).

Tabela 2 - Análise do SNR dos tampões de sensibilização.

Sistemas-Tampão	SNR	SNR
	Amostras 1:50	Amostras 1:100
Carbonato	11,6	8,9
PBS	20,6	14,8
Tris HCl	17,7	12,9

Legenda: SRN (*Signal-to-noise ratio*); PBS (*Phosphate Buffered Saline*).

Fonte: Elaborado pela autora

5.2.1.3 Tempo de reação

Em seguida, foi realizada a avaliação considerando o tempo de reação (*time titration*) para mensurar o tempo de incubação ideal após adição da solução reveladora (TMB Plus). Para esta finalidade, o antígeno foi utilizado na quantidade de 100 ng/poço; anticorpo secundário anti-IgG nas diluições de 1:5.000 e 1:10.000; e as amostras séricas diluídas 50 e 100 vezes (Figura 7).

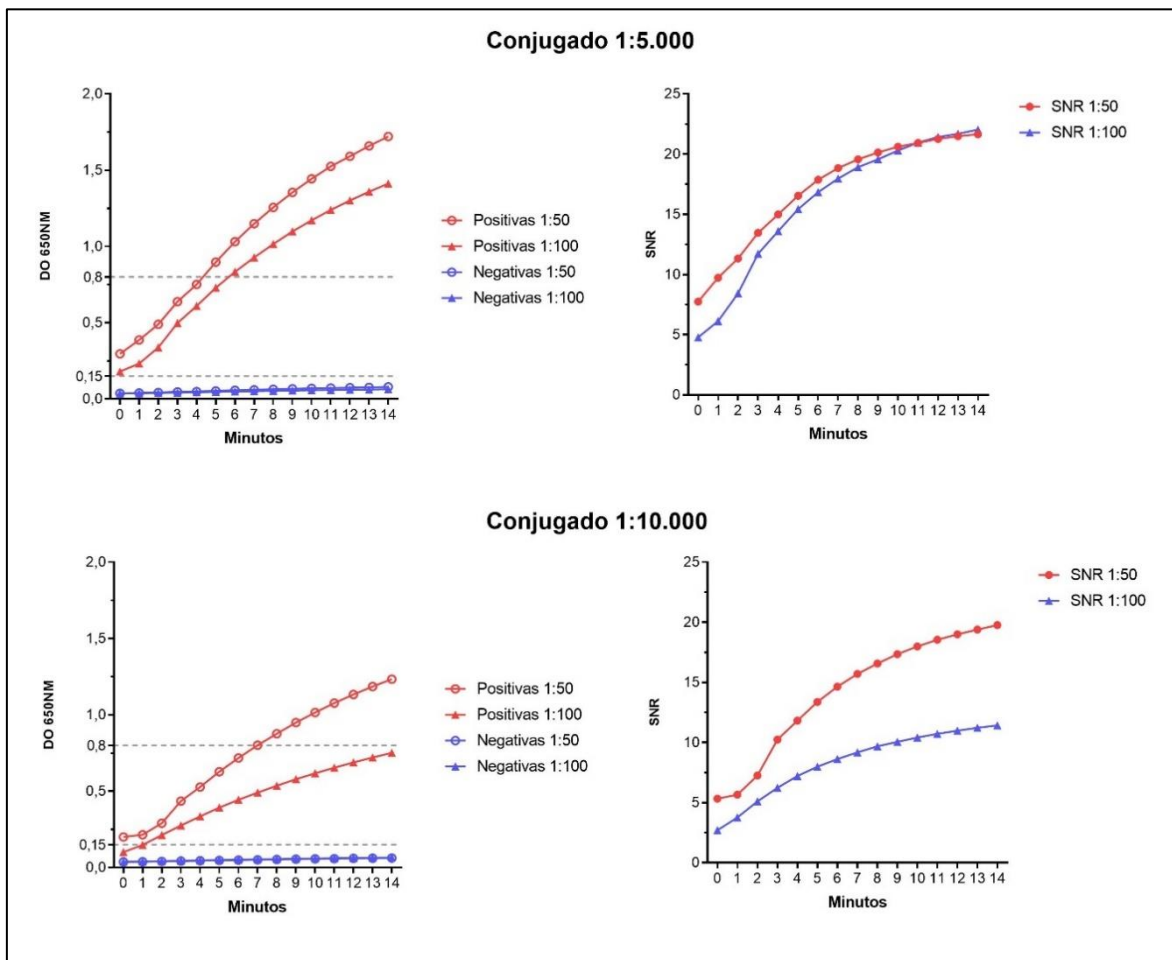


Figura 7 - Análise gráfica das densidades óticas obtidas na avaliação considerando o tempo de reação (*time titration*) para mensurar o tempo de incubação ideal após adição da solução reveladora (esquerda). Análise do SNR (direita).

Legenda: DO (Densidade Óptica); SRN (*Signal-to-noise ratio*).

Fonte: Elaborado pela autora

A partir da avaliação considerando o tempo de reação (*time titration*) foi definido que o melhor tempo de incubação com a solução reveladora foi de 15 minutos de reação, visto que o sinal obtido começa a se estabilizar.

5.2.1.4 Seleção das condições

Para padronização do ensaio RBD-ELISA IgG, o antígeno foi testado nas quantidades de 50, 100 e 200 ng/poço, o conjugado nas diluições de 1:5.000, 1:10.000, 1:20.000, 1:40.000 e 1:80.000 e amostras séricas diluídas 50 e 100 vezes (Figura 8).

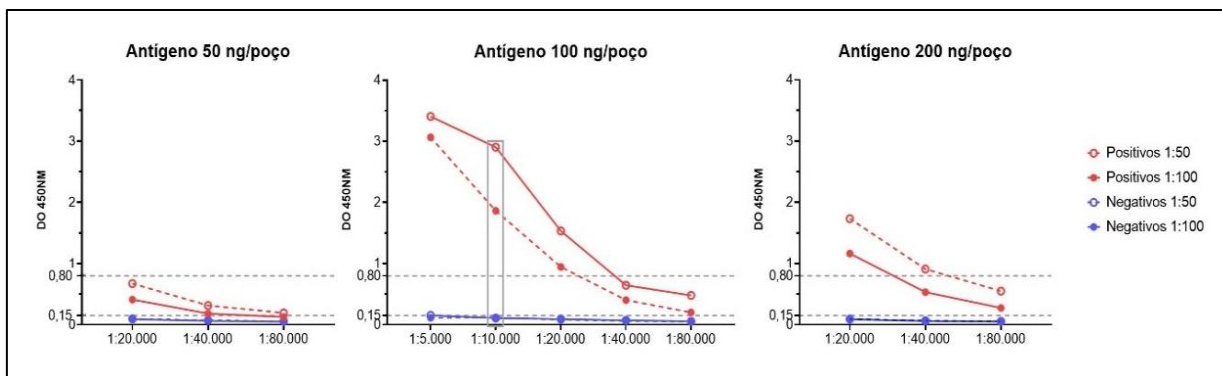


Figura 8 - Análise gráfica das densidades óticas das amostras séricas no RBD-ELISA IgG.

Legenda: DO (Densidade Óptica); SRN (*Signal-to-noise ratio*).

Fonte: Elaborado pela autora

A partir dos resultados obtidos, as condições foram selecionadas através da diferença entre a média aritmética das DOs dos *pools* das amostras positivas e a média aritmética das DOs dos *pools* das negativas, acrescida à três DP, e o SNR, de acordo com requisitos pré-estabelecidos (Tabela 3). Assim, foi estabelecido que a melhor condição para o RBD-ELISA IgG foi aquela utilizando 100 ng do antígeno por poço, conjugado na diluição de 1:10.000 e amostras séricas diluídas 50 vezes.

Tabela 3 - Avaliação das densidades óticas das amostras durante a padronização

Conjugado	Antígeno	Soro	X NEG	DP	X NEG+3DP	X POS	(X POS) – (X NEG+3S)	SNR
1:5.000	100 ng	1:50	0,153	0,030	0,243	3,407	3,164	22,233
		1:100	0,113	0,009	0,141	3,067	2,926	27,224
1:10.000	100 ng	1:50	0,109	0,011	0,141	2,905	2,764	26,614
		1:100	0,117	0,017	0,167	1,864	1,697	15,961
1:20.000	200 ng	1:50	0,092	0,013	0,13	1,733	1,603	18,907
		1:100	0,089	0,011	0,122	1,163	1,04	13,037
	100 ng	1:50	0,092	0,015	0,139	1,534	1,396	16,628
		1:100	0,084	0,009	0,112	0,946	0,834	11,256
	50 ng	1:50	0,096	0,011	0,129	0,672	0,543	6,994
		1:100	0,090	0,011	0,121	0,410	0,289	4,580
1:40.000	200 ng	1:50	0,065	0,006	0,083	0,909	0,826	14,008
		1:100	0,061	0,006	0,078	0,532	0,454	8,778
	100 ng	1:50	0,071	0,012	0,108	0,645	0,538	9,074
		1:100	0,062	0,007	0,083	0,404	0,321	6,535
	50 ng	1:50	0,072	0,009	0,097	0,313	0,216	4,379
		1:100	0,062	0,004	0,073	0,181	0,108	2,918
1:80.000	200 ng	1:50	0,055	0,004	0,066	0,549	0,483	10,054
		1:100	0,053	0,011	0,088	0,274	0,186	5,125
	100 ng	1:50	0,056	0,006	0,073	0,479	0,405	8,520
		1:100	0,051	0,005	0,065	0,2	0,135	3,923
	50 ng	1:50	0,055	0,003	0,065	0,193	0,128	3,518
		1:100	0,05	0,002	0,057	0,127	0,07	2,531

Legenda: DP (Desvio Padrão), X (Média), NEG (Negativo) e POS (Positivo), SRN (*Signal-to-noise ratio*).

Fonte: Elaborado pela autora

5.2.1.5 Seleção do *Cut-off* (Ponto de corte)

A partir das DOs encontradas para cada amostra, seis fórmulas foram utilizadas para definição do CO a ser usado no estudo. A sua definição foi baseada nos maiores valores de sensibilidade, especificidade e acurácia, conforme descrito na tabela 4. Foi observado que o melhor CO para ser utilizado foi da fórmula CO 6 descrita abaixo:

$$CO\ 6 = XNEG + 2DP$$

Tabela 4 - Parâmetros de desempenho dos valores de *cut-off*

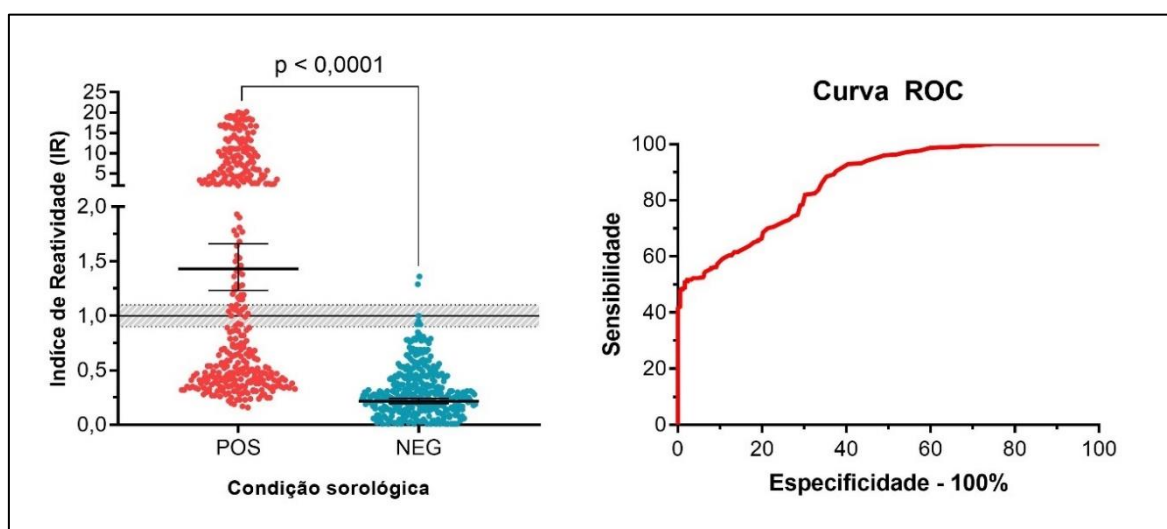
Parâmetros de desempenho	CO 1	CO 2	CO 3	CO 4	CO 5	CO 6
Sensibilidade	28,6%	39,5%	39,5%	33,9%	43,2%	44,9%
Especificidade	99,7%	98,9%	98,6%	99,4%	97,4%	97,1%
Acurácia	64,0%	69,0%	68,8%	66,4%	70,1%	70,8%

Legenda: CO (*Cut-off*; Ponto de corte); CO 1 (AUC); CO 2 (XNEG + 0,130); CO 3 (XNEG × 2) e CO 4 (XNEG × 3), CO 5 (XNEG + 3DP), CO 6 (XNEG + 2DP).

Fonte: Elaborado pela autora

5.2.2 Avaliação do potencial diagnóstico

A avaliação do potencial diagnóstico do RBD-ELISA IgG foi realizada utilizando 354 e 351 amostras séricas positivas e negativas para a COVID-19, respectivamente. Os dados brutos encontram-se disponíveis no Apêndice A. Foi observada uma área abaixo da curva ROC de 84,6% (IC95%: 81,8%-87,4%), demonstrando boa capacidade diagnóstica, sendo capaz de diferenciar amostras positivas de negativas ($p < 0,0001$) (Figura 9). A especificidade encontrada foi de 99,1%, mostrando capacidade de identificar pacientes não infectados. Já a sensibilidade foi de 48,0%. Nesta avaliação, 15 amostras ficaram na zona cinza (Tabela 5).



Legenda: Pos (Positivo); Neg (Negativo).

Figura 9 - Análise gráfica dos índices de reatividade da avaliação do potencial diagnóstico da fração RBD da proteína *Spike* do SARS-CoV-2 (IgG).

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 5 - Parâmetros de desempenho obtidos na avaliação do potencial diagnóstico do RBD-ELISA IgG.

Parâmetros de Desempenho	% (IC95%)
AUC	84,6 (81,8-87,4)
Sensibilidade	48,0 (42,9-53,2)
Especificidade	99,1 (97,5-99,7)
Acurácia	73,5 (70,1-76,6)
RV +	56,2 (18,1-174,3)
RV -	0,52 (0,47-0,58)
κ	0,47 (0,41-0,54)
DOR	107,2 (33,8-340,3)

Legenda: IC95% (Intervalo de confiança 95%); RV (Razão de verossimilhança); κ (Índice *Kappa* de Cohen); DOR (Razão de probabilidades diagnósticas).

Fonte: Elaborado pela autora

As razões de verossimilhança demonstraram aumento significativo da probabilidade de encontrar um resultado verdadeiro positivo do que um falso positivo, e uma diminuição da probabilidade de encontrar um falso negativo do que um verdadeiro negativo. O valor de DOR acusou uma probabilidade 100 vezes maior de um indivíduo ser corretamente diagnóstico ao ser submetido ao diagnóstico utilizando o RDB-ELISA IgG comparado a um indivíduo que não realizou o teste. Enquanto, o índice *Kappa* de Cohen indicou uma concordância regular entre o RBD-ELISA IgG e a RT-PCR (Tabela 5).

Em seguida, a estratificação das amostras positivas foi realizada em intervalos de acordo com a data da coleta após o início dos sintomas: 0-7, 8-14, 15-21, e >22. Os intervalos apresentaram diferença estatística ($p < 0,0001$) (Figura 10).

Ao estratificar as amostras positivas através da sua data de coleta foi possível observar aumentos dos valores de sensibilidade e acurácia, RV+ e DOR, principalmente em amostras coletadas a partir do 15º dia pós-início dos sintomas (Tabela 6).

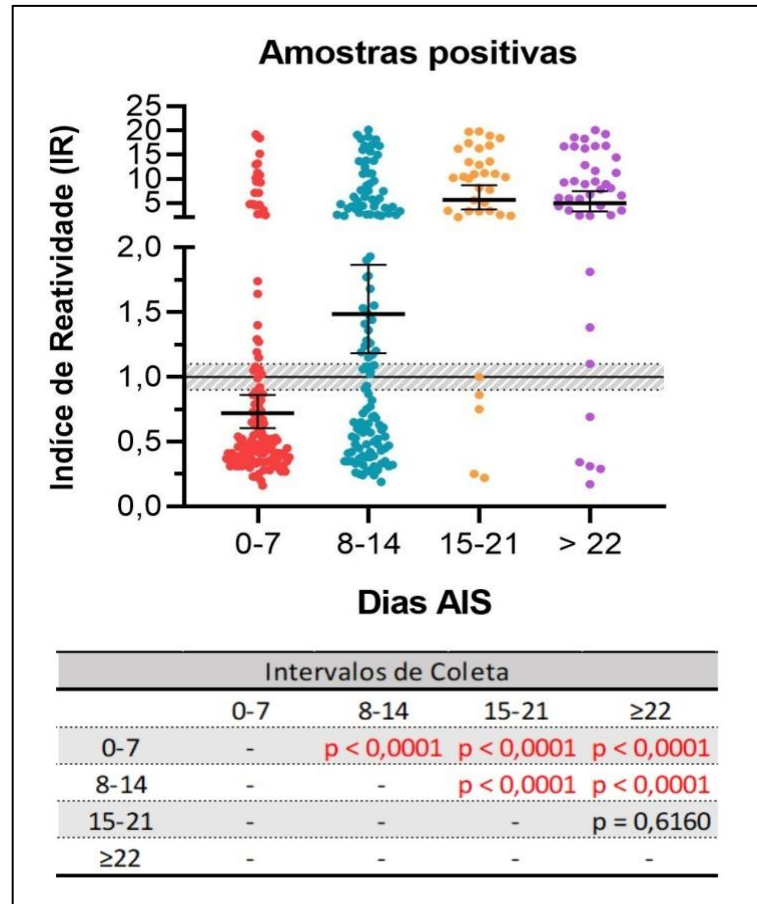


Figura 10 - Análise gráfica dos índices de reatividade do RBD-ELISA IgG estratificados a partir dos intervalos de coleta após início dos sintomas.

Legenda: AIS (Após início dos sintomas).

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 6 - Parâmetros de desempenho do RBD-ELISA IgG por intervalo de coleta.

Parâmetros de desempenho	Dias após o início dos sintomas			
	0-7	8-14	15-21	≥ 22
Sen (%)	22,4	54,1	88,2	87,5
(IC95%)	(16,5-29,8)	(45,7-62,4)	(73,4-95,3)	(73,9-94,5)
Esp (%)	99,1	99,1	99,1	99,1
(IC95%)	(97,5-99,7)	(97,5-99,7)	(97,5-99,7)	(97,5-99,7)
Acc (%)	76,5	86,8	98,2	98,0
(IC95%)	(72,6-80,0)	(83,5-89,5)	(96,3-99,1)	(96,0-99,0)
RV+	26,3	63,3	103,2	102,4
(IC95%)	(8,18-84,3)	(20,3-197,6)	(33,2-320,7)	(33,0-317,8)
RV-	0,78	0,46	0,12	0,13
(IC95%)	(0,71-0,86)	(0,38-0,46)	(0,05-0,30)	(0,06-0,29)
κ	0,27	0,60	0,88	0,88
(IC95%)	(0,15- 0,38)	(0,52-0,69)	(0,80-0,97)	(0,80-0,96)
DOR	33,6	136,9	870,0	812,0
(IC95%)	(10,1-111,6)	(41,8-448,5)	(186,0-4060,3)	(186,2-3542,1)

Legenda: Sen (Sensibilidade), Esp (Especificidade); Acc (Acurácia); RV (Razão de verossimilhança); κ (Índice Kappa de Cohen); DOR (Razão de probabilidades diagnósticas); IC95% (Intervalo de confiança 95%).

Fonte: Elaborado pela autora

5.2.3 Reatividade Cruzada

Inicialmente foram avaliadas 135 amostras de outras doenças infecto-parasitárias: dengue (n = 20), sífilis (n = 20), hepatite B (n = 20), hepatite C (n = 20), HIV-1/2 (n = 20), HTLV-1/2 (n = 20), leishmaniose tegumentar e visceral (n = 5), doença de Chagas (n = 5) e filariose (n = 5). Foi observada reatividade em 4,4% (6/135) das amostras avaliadas no RBD-ELISA IgG. Dentre elas, quatro foram reativas para as amostras de leishmaniose, uma para as amostras de dengue e uma para HIV-1/2. Levando em conta as amostras dentro da zona cinza foi encontrada reatividade de 2,96% (4/135) (Figura 11). Os dados brutos encontram-se disponíveis no Apêndice B.

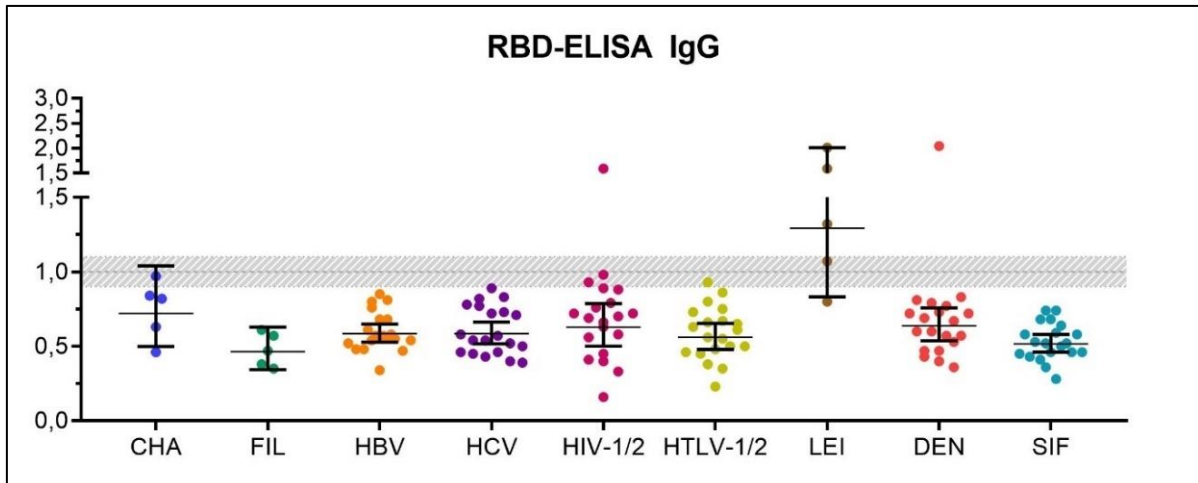


Figura 11 - Análise gráfica dos índices de reatividade das amostras doenças infecto-parasitárias para o RBD-ELISA IgG.

Legenda: CHA (Doença de Chagas); FIL (Filariose); HBV (Hepatite B); HCV (Hepatite C); HIV (Vírus da imunodeficiência humana); HTLV (Vírus linfotrófico de células T humanas); LEI (Leishmaniose); DEN (Dengue); SIF (Sífilis).

Fonte: Elaborado pela autora

5.2 RBD-ELISA IgM

5.3.1 Padronização do ELISA indireto IgM

5.3.1.1 Seleção das condições

Na padronização do RBD-ELISA-IgM, o antígeno foi testado nas quantidades de 50, 100 e 200 ng/poço, o conjugado nas diluições de 1:5.000, 1:10.000, 1:20.000, 1:40.000, 1:80.000 e 1:160.000 e amostras séricas diluídas 100 e 200 vezes (Figura 12).

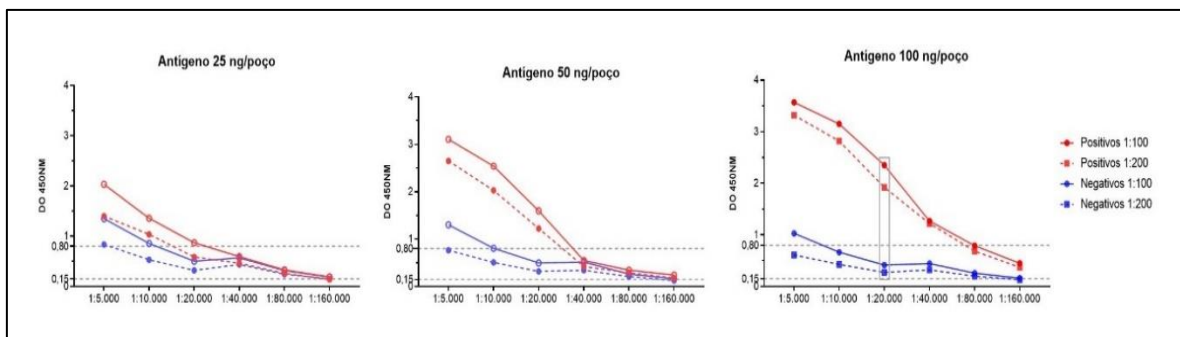


Figura 12 - Análise gráfica das densidades óticas das amostras séricas no RBD-ELISA IgM.

Legenda: DO (Densidade Óptica); SRN (*Signal-to-noise ratio*)

Fonte: Elaborado pela autora

A partir dos resultados obtidos, as condições foram selecionadas através da diferença entre a média aritmética das DOs dos *pools* positivos e a média aritmética das DOs dos *pools* negativos acrescida à três DP, e o SNR, de acordo com requisitos pré-estabelecidos (Tabela 7). A melhor condição para o RBD-ELISA IgM foi atingida utilizando 100 ng do antígeno por poço, conjugado na diluição de 1:20.000 e amostras séricas diluídas 200 vezes.

Tabela 7 - Avaliação das densidades óticas das amostras durante a padronização.

Conjugado	Antígeno	Soro	X NEG	DP	X NEG+3DP	X POS	(X POS) – (X NEG+3S)	SNR	
1:5.000	25 ng	1:100	1,35	0,19	1,93	2,03	0,11	1,51	
		1:200	0,84	0,12	1,19	1,40	0,21	1,68	
	50 ng	1:100	1,30	0,14	1,72	3,10	1,39	2,39	
		1:200	0,76	0,10	1,07	2,65	1,57	3,48	
	100 ng	1:100	1,03	0,18	1,57	3,57	2,00	3,47	
		1:200	0,61	0,13	0,99	3,32	2,33	5,43	
	1:10.000	25 ng	1:100	0,86	0,10	1,15	1,36	0,21	1,59
			1:200	0,53	0,08	0,78	1,04	0,26	1,95
50 ng		1:100	0,81	0,10	1,11	2,54	1,43	3,16	
		1:200	0,51	0,07	0,72	2,03	1,31	4,00	
100 ng		1:100	0,66	0,14	1,09	3,15	2,07	4,75	
		1:200	0,43	0,08	0,67	2,82	2,15	6,62	
1:20.000		25 ng	1:100	0,50	0,06	0,70	0,87	0,17	1,73
			1:200	0,32	0,05	0,47	0,59	0,12	1,83
	50 ng	1:100	0,50	0,06	0,68	1,60	0,91	3,21	
		1:200	0,32	0,03	0,41	1,22	0,81	3,86	
	100 ng	1:100	0,42	0,08	0,65	2,35	1,70	5,65	
		1:200	0,27	0,05	0,43	1,92	1,50	7,03	
	1:40.000	25 ng	1:100	0,57	0,10	0,86	0,59	-0,26	1,04
			1:200	0,44	0,08	0,69	0,46	-0,23	1,06
50 ng		1:100	0,52	0,12	0,87	0,55	-0,33	1,06	
		1:200	0,34	0,07	0,55	0,42	-0,13	1,23	
100 ng		1:100	0,45	0,09	0,71	1,27	0,56	2,85	
		1:200	0,32	0,07	0,54	1,22	0,68	3,78	
1:80.000		25 ng	1:100	0,32	0,05	0,46	0,33	-0,13	1,04
			1:200	0,25	0,03	0,34	0,26	-0,08	1,07
	50 ng	1:100	0,26	0,05	0,41	0,35	-0,06	1,31	
		1:200	0,21	0,03	0,31	0,29	-0,02	1,39	
	100 ng	1:100	0,26	0,05	0,39	0,79	0,40	3,07	
		1:200	0,20	0,04	0,32	0,68	0,37	3,41	
	1:160.000	25 ng	1:100	0,19	0,03	0,27	0,19	-0,08	1,01
			1:200	0,15	0,02	0,22	0,14	-0,08	0,92
50 ng		1:100	0,16	0,02	0,23	0,24	0,01	1,46	
		1:200	0,13	0,04	0,24	0,18	-0,06	1,40	
100 ng		1:100	0,16	0,03	0,24	0,45	0,21	2,81	
		1:200	0,13	0,02	0,19	0,37	0,18	2,81	

Legenda: DP (Desvio Padrão), X (Média), NEG (Negativo) e POS (Positivo), SRN (*Signal-to-noise ratio*).

Fonte: Elaborado pela autora

5.3.1.2 Sensibilização em temperatura ambiente

Com a finalidade de otimizar a sensibilização reduzindo o tempo de incubação, o tempo de incubação foi alterado para 15 minutos à temperatura ambiente (TA). Com isso, foi obtido um SNR de 8,93, valor superior àquele obtido quando o procedimento foi realizado *overnight* (SNR = 7,03).

5.3.1.3 Seleção do *Cut-Off*

A partir das DOs encontradas para cada amostra, seis fórmulas foram utilizadas para definição do CO a ser usado no estudo. A sua definição foi baseada nos maiores valores de sensibilidade, especificidade e acurácia, conforme descrito na tabela 8. Foi observado que o melhor CO para ser utilizado foi da fórmula CO 5 descrita abaixo:

$$CO\ 5 = XNEG + 3DP$$

Tabela 8 - Parâmetros de desempenho dos valores de *cut-off*

Parâmetro de desempenho	CO 1	CO 2	CO 3	CO 4	CO 5	CO 6
Sensibilidade	23,9%	33,2%	40,3%	28,7%	50,0%	46,0%
Especificidade	99,7%	84,3%	95,7%	99,4%	86,9%	91,7%
Acurácia	61,7%	58,8%	68,0%	64,0%	68,4%	68,9%

Legenda: CO (*Cut-off*; Ponto de corte); CO 1 (AUC); CO 2 (XNEG + 0,130); CO 3 (XNEG × 2) e CO 4 (XNEG × 3), CO 5 (XNEG + 3DP), CO 6 (XNEG + 2DP).

Fonte: Elaborado pela autora

5.3.2 Avaliação do potencial diagnóstico do RBD-ELISA IgM

A avaliação do potencial diagnóstico da RBD foi realizada utilizando 352 e 351 amostras séricas positivas e negativas para SARS-CoV-2, respectivamente. Detectando anticorpos IgM, a área abaixo da curva ROC da RBD foi 76,5% (72,9-80,1), demonstrando uma capacidade diagnóstica razoável, sendo capaz de diferenciar amostras positivas de negativas ($p < 0,0001$) (Figura 13). A especificidade encontrada foi de 94,6%, mostrando elevada capacidade de identificar pacientes não infectados. Já a sensibilidade encontrada foi de 51,1%. Trinta e seis amostras situaram-se na zona cinza. (Tabela 9).

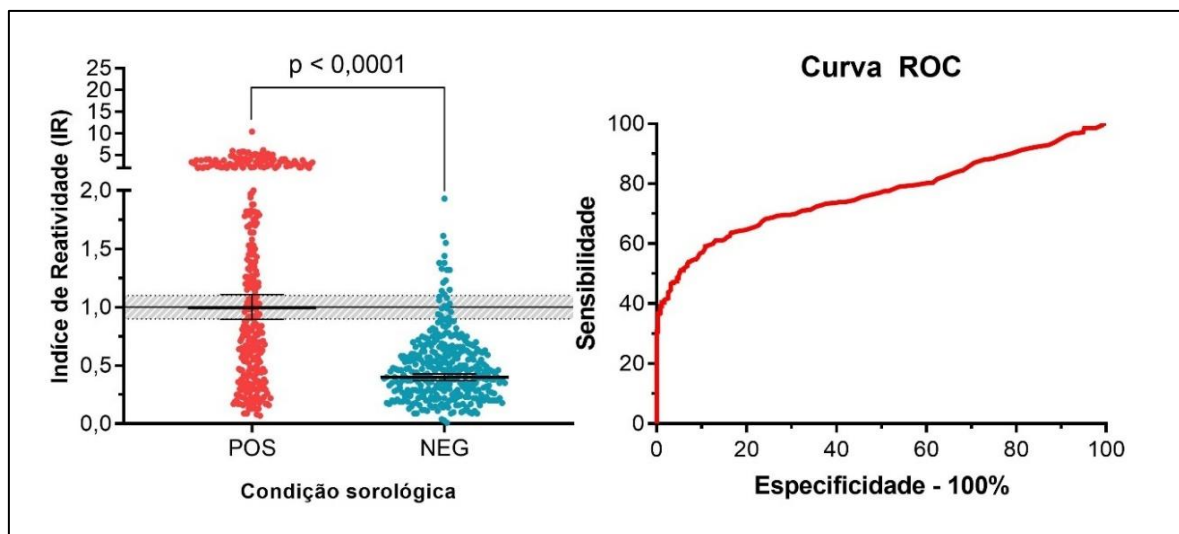


Figura 13 - Análise gráfica dos índices de reatividade da avaliação do potencial diagnóstico do RBD-ELISA IgM.

Legenda: Pos (Positiva); Neg (Negativa).

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 9 - Parâmetros de desempenho obtidos na avaliação do potencial diagnóstico do RBD-ELISA IgM.

Parâmetros de Desempenho	% (IC95%)
AUC	76,5 (72,9-80,1)
Sensibilidade	51,1 (45,9-56,3)
Especificidade	94,6 (91,7-96,5)
Acurácia	72,8 (69,4-76,0)
RV +	9,45 (6,03-14,80)
RV -	0,52 (0,46-0,58)
κ	0,46 (0,39-0,52)
DOR	18,29 (11,01-30,37)

Legenda: IC (Intervalo de Confiança); RV (Razão de verossimilhança); κ (Índice Kappa de Cohen); DOR (Razão de probabilidades diagnósticas); IC95 (Intervalo de confiança 95%).

Fonte: Elaborado pela autora

As razões de verossimilhança obtidas demonstraram um aumento moderado da probabilidade de encontrar um resultado verdadeiro positivo do que um falso positivo, e uma diminuição insignificante da probabilidade de encontrar um falso negativo do que um verdadeiro negativo. Enquanto, o índice Kappa de Cohen indicou uma concordância regular entre o RBD-ELISA IgM e o RT-PCR (Tabela 9).

Em seguida, foi realizada a estratificação das amostras positivas em intervalos de acordo com a data da coleta após o início dos sintomas, sendo observada uma diferença estatística entre os intervalos ($p < 0,0001$) (Figura 14).

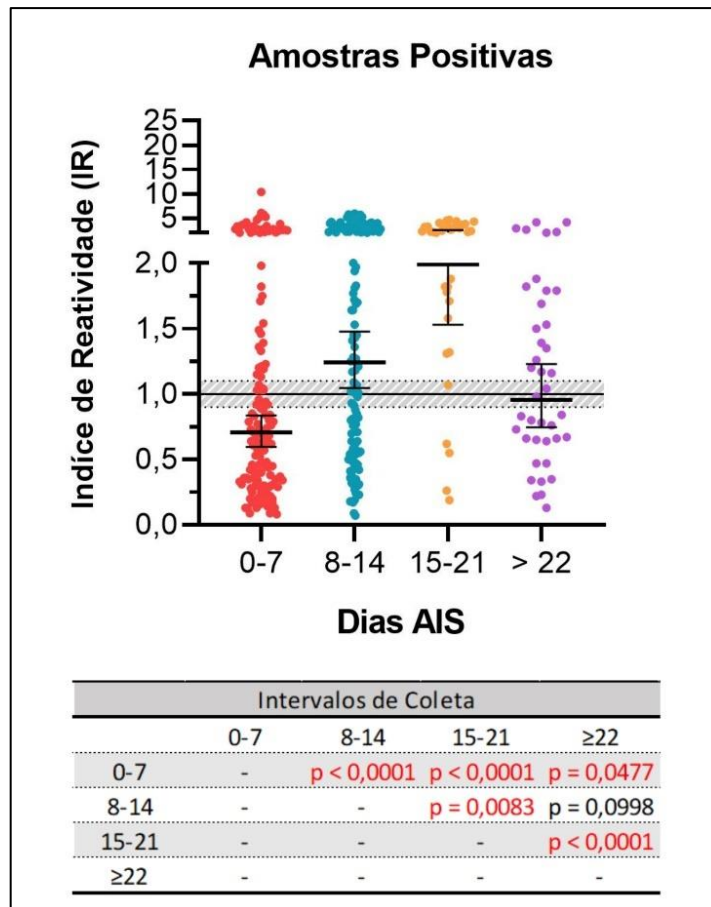


Figura 14 - Análise gráfica dos índices de reatividade do RBD-ELISA IgM estratificados a partir dos intervalos de coleta após início dos sintomas.

Legenda: AIS (Após início dos sintomas).

Fonte: Elaborado pela autora

Ao estratificar as amostras positivas através da sua data de coleta foi possível observar melhora nos valores dos parâmetros de desempenho a partir do 8º dia após o início dos sintomas. A maior sensibilidade e acurácia obtidos foram no intervalo de 15-21 dias, sendo seguida em ordem decrescente pelo intervalo de 8-14, 22> e 0-7 dias. A partir do 22º dia foi observada uma brusca queda nos parâmetros de desempenho. (Tabela 10).

Tabela 10 - Parâmetros de desempenho do RBD-ELISA IgM por intervalo de coleta.

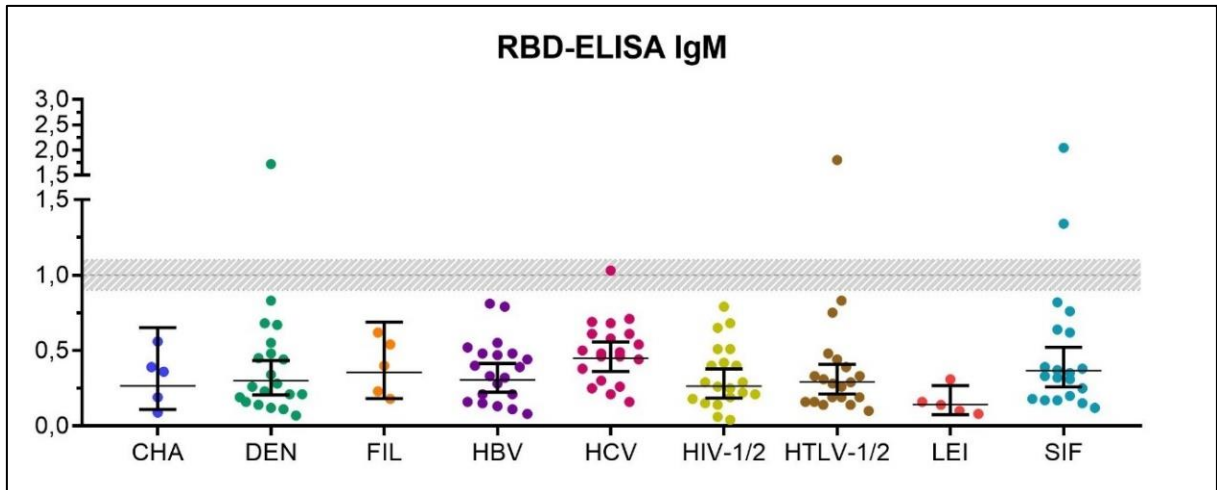
Parâmetros de desempenho	Dias após o início dos sintomas			
	0-7	8-14	15-21	≥ 22
Sen (%)	34,7	60,3	88,2	50,0
(IC95%)	(27,5-42,7)	(51,7-68,3)	(73,4-95,3)	(35,2-64,8)
Esp (%)	94,6	94,6	94,6	94,6
(IC95%)	(91,7-96,5)	(91,7-96,5)	(91,7-96,5)	(91,7-96,5)
Acc (%)	76,9	85,3	94,0	90,0
(IC95%)	(73,0-80,4)	(81,8-88,2)	(91,2-96,0)	(86,7-92,6)
RV+	6,4	11,1	16,3	9,2
(IC95%)	(3,9-10,5)	(7,0-17,6)	(10,4-25,7)	(5,4-15,8)
RV-	0,69	0,42	0,12	0,53
(IC95%)	(0,61-0,79)	(0,34-0,52)	(0,05-0,31)	(0,38-0,73)
κ	0,35	0,60	0,69	0,45
(IC95%)	(0,24-0,45)	(0,51-0,68)	(0,57-0,81)	(0,29-0,61)
DOR	9,3	26,6	131,1	17,5
(IC95%)	(5,2-16,5)	(14,8-47,4)	(41,8-410,2)	(8,1-37,9)

Legenda: Sen (Sensibilidade), IC (Intervalo de Confiança); AIS (Após Início dos Sintomas); Esp (Especificidade); Acc (Acurácia); J (Índice de Youden); RV (Razão de verossimilhança); κ (Índice Kappa de Cohen); ORD (Razão de probabilidades diagnósticas); IC95 (Intervalo de confiança 95%).

Fonte: Elaborado pela autora

5.3.3 Reatividade Cruzada RBD-ELISA IgM

O RBD-ELISA IgM também foi avaliado quanto a reatividade cruzada, usando 135 amostras de outras doenças infecto-parasitárias: dengue (n = 20), sífilis (n = 20), hepatite B (n = 20), hepatite C (n = 20), HIV-1/2 (n = 20), HTLV-1/2 (n = 20), leishmaniose tegumentar e visceral (n = 5), doença de Chagas (n = 5) e filariose (n = 5). Foi observado reatividade em 3,7% delas. As amostras foram reativas para dengue (n = 1), HCV (n = 1), sífilis (n = 2) e HTLV-1/2 (n = 1). Levando em conta as amostras dentro da zona cinza foi encontrada reatividade de 0,74% (1/135) de amostras com resultados inconclusivos (Figura 15).



Legenda: CHA (Doença de Chagas); FIL (Filariose); HBV (Hepatite B); HCV (Hepatite C); HIV (Vírus da imunodeficiência humana); HTLV (Vírus linfotrófico de células T humanas); LEI (Leishmaniose); DEN (Dengue); SIF (Sífilis)

Figura 15: Análise gráfica dos índices de reatividade das amostras doenças infecto-parasitárias para o RBD-ELISA IgM.

Fonte: Elaborado pela autora

5.4 ANÁLISE COMBINATÓRIA

Foi realizada análise combinatória dos resultados obtidos no RBD-ELISA IgG e RBD-ELISA IgM, através da abordagem em série e paralelo, com a finalidade de aumentar a sensibilidade e acurácia na detecção da COVID-19. Os valores obtidos na análise em paralelo apresentaram sensibilidade e acurácia superior a análise em série e ao uso dos testes de forma individual (Tabela 11).

Tabela 11 - Análise combinatória do RBD-ELISA IgG e IgM.

Abordagem	Sensibilidade (IC95%)	Especificidade (IC95%)	Acurácia (IC95%)
Em série	24,5% (19,7-30,0)	100% (99,8-100)	62,1% (59,6-64,8)
Em paralelo	74,6% (69,1-79,5)	93,8% (89,4-96,2)	84,1% (79,2-87,8)

Legenda: Intervalo de confiança (IC).

Fonte: Elaborado pela autora

Em seguida realizamos a análise combinatória de ambos os testes por intervalo de coleta, por meio da abordagem em série e paralelo (Tabela 12). Através da análise por intervalo foi possível observar que a abordagem em paralelo obteve os maiores valores de sensibilidade e acurácia, independente do intervalo. No intervalo de 15-21 dias os valores de sensibilidade e

acurácia por meio da abordagem em paralelo atingiu um valor máximo de 98,6% e 96,2%, respectivamente.

Tabela 12 - Análise combinatória do RBD-ELISA IgG e IgM por intervalo de coleta das amostras.

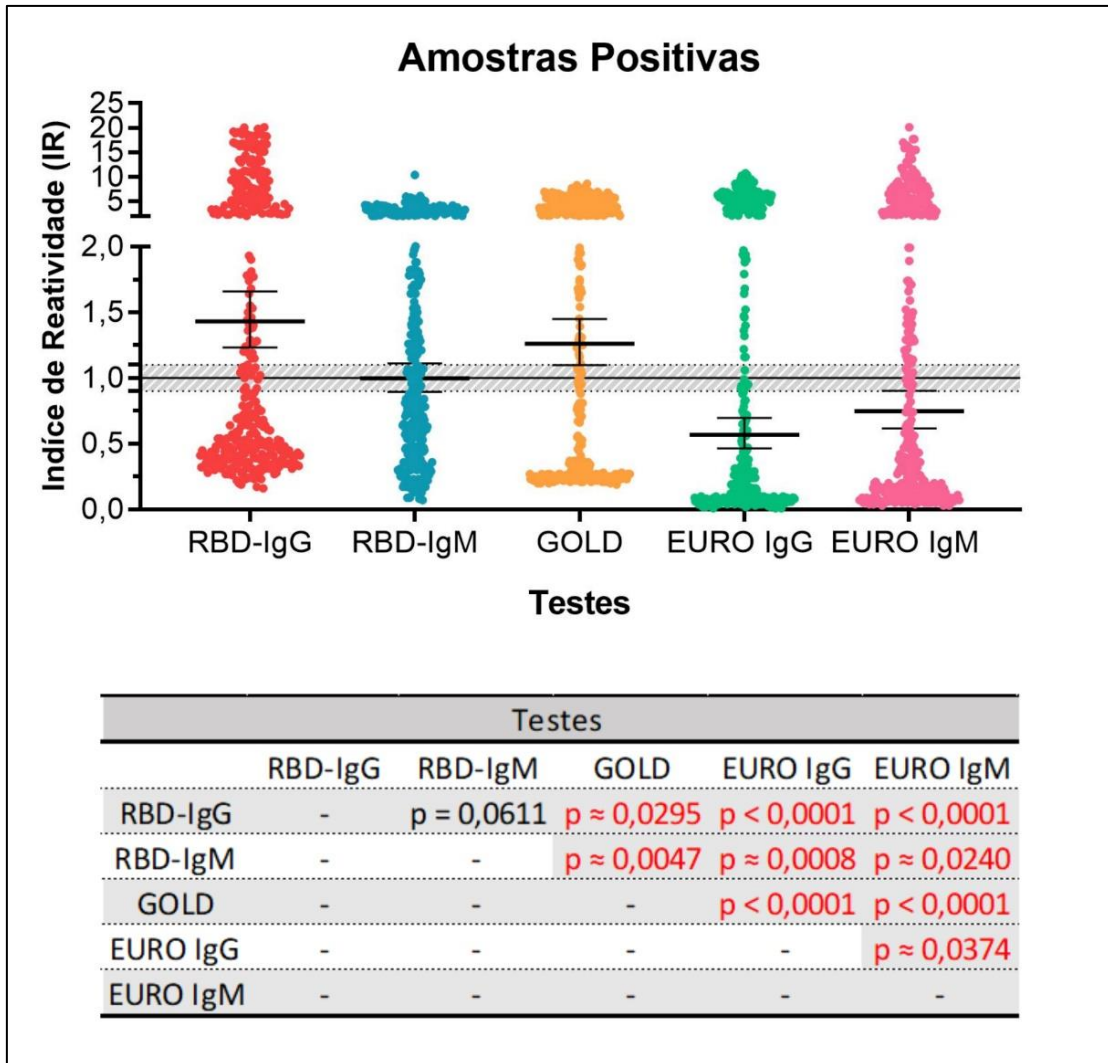
Intervalo	Abordagem	Sensibilidade (IC95%)	Especificidade (IC95%)	Acurácia (IC95%)
0-7	Em série	7,8% (4,5-12,7)	99,5% (99,8-100)	53,7% (52,0-56,2)
	Em paralelo	49,3% (39,5-59,8)	93,7% (89,4-96,2)	71,4% (64,3-77,9)
8-14	Em série	33,6% (23,6-42,6)	99,5% (99,8-100)	66,1% (61,5-71,2)
	Em paralelo	81,8% (73,8-88,1)	93,7% (89,4-96,2)	87,7% (81,6-92,1)
15-21	Em série	77,8% (53,9-90,8)	99,5% (99,8-100)	88,2% (76,7-95,4)
	Em paralelo	98,6% (92,9-99,8)	93,7% (89,4-96,2)	96,2% (91,1-98,0)
≥22	Em série	43,7% (26,0-61,2)	99,5% (99,8-100)	71,7% (62,7-80,5)
	Em paralelo	93,7% (83,1-98,1)	93,7% (89,4-96,2)	93,7% (86,2-97,1)

Legenda: Intervalo de confiança (IC).

Fonte: Elaborado pela autora

5.5 COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO DOS RBD-ELISA COM TESTES COMERCIAIS

As amostras positivas também foram avaliadas utilizando três testes comerciais, e seus resultados comparados aos do RBD-ELISA IgG e IgM (Figura 16).



Legenda: EURO IgM (Anti-SARS-CoV-2 NCP ELISA (IgM)); EURO IgG (Euroimmun Anti-SARS-CoV-2 IgG ELISA); GOLD (GOLD ELISA COVID-19 IgG+IgM).

Figura 16 - Análise gráfica dos índices de reatividade dos testes comerciais.

Fonte: Elaborado pela autora

Através desta análise, foi possível observar que o GOLD ELISA COVID-19 IgG+IgM apresentou a maior sensibilidade, com sobreposição dos IC95% com o RBD-ELISA IgG e o RBD-ELISA IgM. Todos os testes apresentaram elevada especificidade, com RV- e *Kappa* de Cohen com sobreposição dos IC95%. O Anti-SARS-CoV-2 NCP ELISA (IgG) e o Euroimmun Anti-SARS-CoV-2 NCP ELISA (IgM) apresentaram valores de desempenho inferiores, principalmente a sensibilidade e a acurácia (Tabela 13).

Tabela 13 - Parâmetros de desempenho dos RBD-ELISA e dos testes comerciais.

Parâmetros de desempenho	Testes				
	RBD IgG	RDB IgM	GOLD	EURO G	EURO M
Sen (%)	48,0	51,1	57,6	41,4	46,5
(IC95%)	(42,9-53,2)	(45,9-56,3)	(52,4-62,7)	(36,3-46,6)	(41,3-51,7)
Esp (%)	99,1	94,6	99,4	99,4	96,2
(IC95%)	(97,5-99,7)	(91,7-96,5)	(96,6-99,9)	(96,5-99,9)	(92,0-98,3)
Acc (%)	73,5	72,8	70,7	59,4	61,9
(IC95%)	(70,1-76,6)	(69,4-76,0)	66,7-74,5)	(55,1-63,5)	(57,6-66,0)
RV+	56,2	9,5	93,4	65,7	12,3
(IC95%)	(18,1-174,3)	(6,0-14,8)	(13,2-660,1)	(9,3-465,8)	(5,8-27,2)
RV-	0,52	0,52	0,43	0,59	0,56
(IC95%)	(0,47-0,58)	(0,46-0,58)	(0,38-0,48)	(0,54-0,64)	(0,50-0,62)
κ	0,47	0,52	0,46	0,30	0,32
(IC95%)	(0,41-0,54)	(0,46-0,58)	(0,38-0,53)	(0,23-0,37)	(0,25-0,40)
DOR	107,2	18,3	219,0	111,4	22,1
(IC95%)	(33,8-340,3)	(11,0-30,8)	(30,3-1581, 7)	(15,4-805,2)	(9,5-51,4)

Legenda: Sen (Sensibilidade), IC (Intervalo de Confiança); Esp (Especificidade); Acc (Acurácia); RV (Razão de verossimilhança); κ (Índice Kappa de Cohen); DOR (Razão de probabilidades diagnósticas); IC95 (Intervalo de confiança 95%); GOLD (GOLD ELISA COVID-19 IgG+IgM); EURO G (Anti-SARS-CoV-2 NCP ELISA IgG); EURO M (Anti-SARS-CoV-2 NCP ELISA IgM); RBD IgG (RBD-ELISA IgG); RBD IgM (RBD-ELISA IgM).

Figura 16 - Análise gráfica dos índices de reatividade dos testes comerciais.

Fonte: Elaborado pela autora

5.6 DINÂMICA DOS ANTICORPOS

O painel sorológico utilizado na avaliação do potencial diagnóstico da COVID-19 foi composto por 354 amostras SARS-CoV-2-positivas oriundas de 128 pacientes internados, RT-PCR +, e com clínica compatível com a doença. Deste quantitativo, 80 pacientes tiveram amostras coletadas pelo menos duas vezes e quatro pacientes tiveram pelo menos seis amostras coletas em dias diferentes. As características destes quatro pacientes encontram-se disponíveis na Tabela 14.

Tabela 14 - Características dos pacientes.

ID	Idade	Sexo	UTI	Desfecho	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
50	69	F	Yes	Óbito	8	9	10	11	13	14	-*	-*
60	-*	-*	Yes	Óbito	6	7	8	9	12	16	18	20
61	31	M	Yes	Alta	3	4	5	6	9	13	15	17
64	43	M	Yes	Alta	6	5	8	8	12	14	15	21

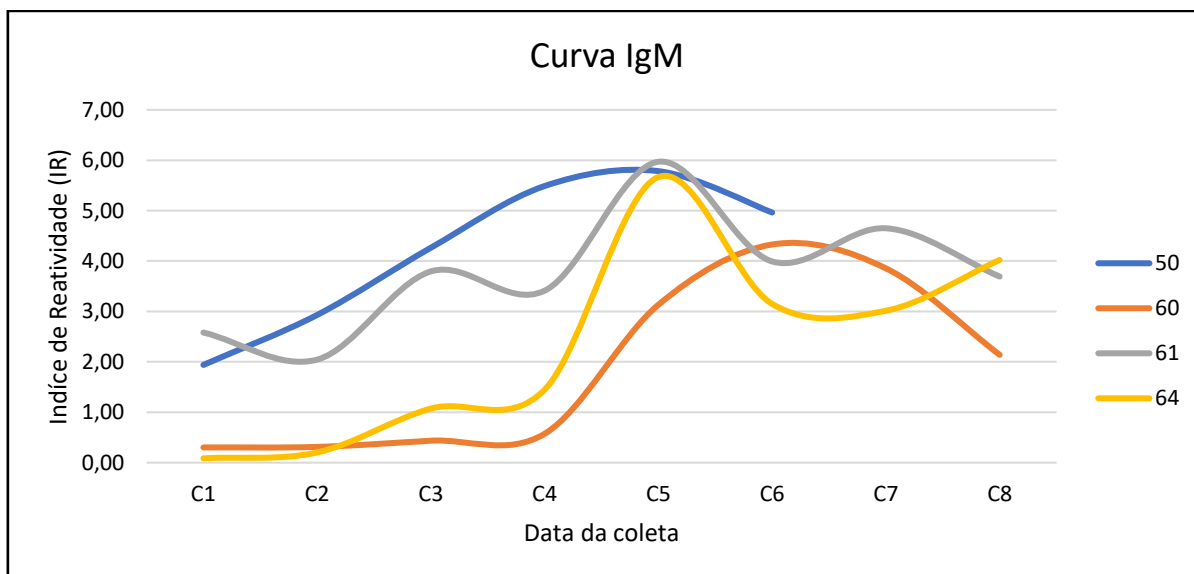
Nota: Coletas realizadas dias após o início dos sintomas.

Legenda: Identidade (ID); C1 (Coleta 1); C2 (Coleta 2); C3 (Coleta 3); C4 (Coleta 4); C5 (Coleta 5); C6 (Coleta 6); C7 (Coleta 7); C8 (Coleta 8); *Dado desconhecido.

Fonte: A autora.

Fonte: Elaborado pela autora

A análise gráfica dos IR obtidos para cada dia de coleta, considerando o RBD-ELISA IgG e RBD-ELISA IgM, mostrou diferença na detecção de anticorpos IgG e IgM. No RBD-ELISA IgM, o paciente ID 61 apresentou IgM detectável na primeira semana de sintomas, enquanto os demais só positivaram a partir da segunda semana. Não foi possível observar uma tendência da curva entre os quatro pacientes, observando variação entre as diferentes datas (Figura 17).



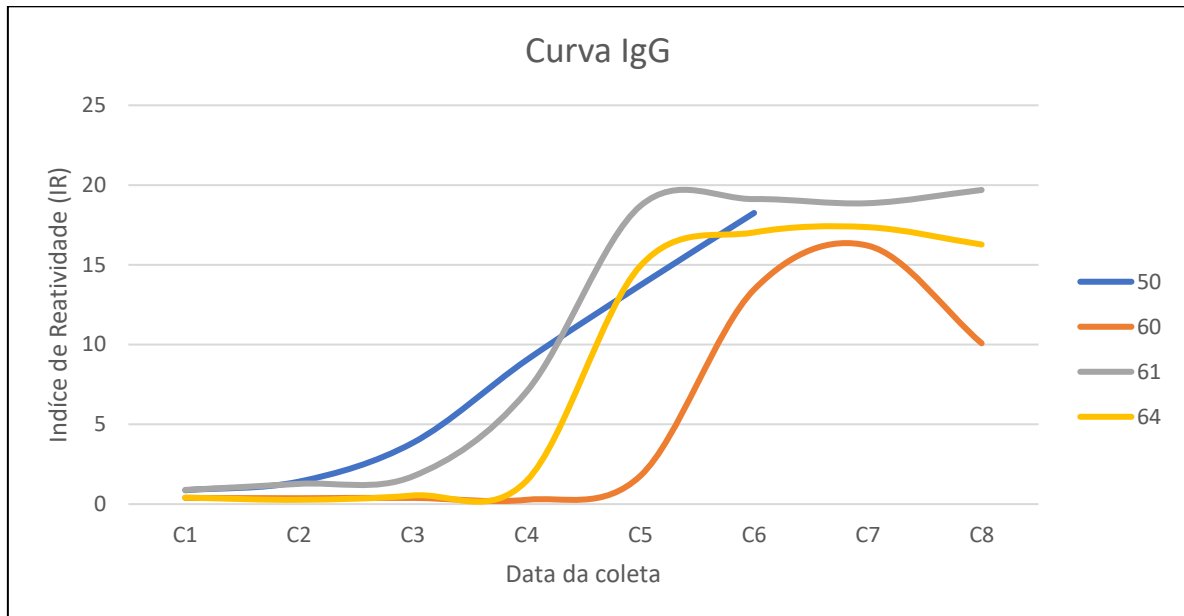
Legenda: C1 (Coleta 1); C2 (Coleta 2); C3 (Coleta 3); C4 (Coleta 4); C5 (Coleta 5); C6 (Coleta 6); C7 (Coleta 7); C8 (Coleta 8).

Figura 17 - Análise gráfica da curva dos índices de reatividade do RBD-ELISA IgM com quatro pacientes (#50, #60, #61 e #64) para COVID-19.

Fonte: Elaborado pela autora

No RBD-ELISA IgG (Figura 18) o paciente ID 61 apresentou IgG detectável logo na primeira semana, os demais foram detectáveis a partir da segunda semana. Entretanto todos tiveram aumento dos IR a cada coleta até aproximadamente o final da segunda semana de sintomas, ocorrendo, então, estabilização do sinal. O paciente ID 60 foi o único que apresentou

perda de sinal próximo à terceira semana de sintomas. A partir das amostras disponibilizadas não foi possível observar a decaída de sinal do IgG.



Legenda: C1 (Coleta 1); C2 (Coleta 2); C3 (Coleta 3); C4 (Coleta 4); C5 (Coleta 5); C6 (Coleta 6); C7 (Coleta 7); C8 (Coleta 8).

Figura 18 - Análise gráfica da curva dos índices de reatividade do RBD-ELISA IgG com quatro pacientes (#50, #60, #61 e #64) para COVID-19.

Fonte: Elaborado pela autora

6 DISCUSSÃO

O diagnóstico da COVID-19 não é uma tarefa simples, necessitando a combinação das características epidemiológicas, quadro clínico e exames laboratoriais. O RT-PCR é frequentemente utilizado como teste diagnóstico devido sua elevada sensibilidade e especificidade para detecção do vírus ainda na fase inicial da doença (KHATAMI et al., 2020). Todavia o uso de testes moleculares para detecção direta do material genético do vírus é laborioso, oneroso e demanda infraestrutura e mão de obra especializadas (PERVEEN et al., 2022). Assim, o uso conjunto de testes moleculares e testes sorológicos eleva a sensibilidade do diagnóstico (WHITMAN et al., 2020). Entretanto, o diagnóstico preciso ainda é um obstáculo devido a presença de indivíduos assintomáticos, bem como ausência de sintomas específicos naqueles sintomáticos, dificultando a identificação e rastreamento de casos, além da inviabilidade em estudos epidemiológicos. Por este motivo, existe a necessidade de ensaios complementares que consigam preencher a lacuna deixada pelos testes moleculares (AMANAT et al., 2020; UDUGUMA et al., 2020). Os ensaios imunológicos indiretos permitem identificar infecções ativas e passadas, situação vacinal e solucionar resultados inconclusivos (ONG et al., 2021).

A fração RBD da proteína S do SARS-CoV-2 possui importante papel na infecção, visto que é responsável pela ligação do vírus ao receptor ACE2 das células hospedeiras. Este mecanismo sinaliza o processo de fusão de membranas, chamando atenção dos pesquisadores para seu possível potencial alvo terapêutico e no diagnóstico da infecção (OKBA et al., 2020; PREMKUMAR et al., 2020). Com base no exposto, o presente estudo se dedicou a avaliar e validar o potencial diagnóstico da RBD para detecção de anticorpos IgG e IgM anti-SARS-CoV-2 para o diagnóstico da COVID-19, utilizando o ELISA indireto como plataforma.

6.1 PADRONIZAÇÃO DO ELISA INDIRETO

O RBD-ELISA IgG e o RBD-ELISA IgM foram padronizados de acordo com as melhores condições de antígeno, anticorpo secundário e amostra sérica, obtendo um protocolo ideal para resultados confiáveis (MINIĆ e ZIVKOVIC, 2021). As condições de padronização foram selecionadas considerando a maior diferença de sinal entre as amostras positivas e negativas. Na padronização do RBD-ELISA IgG e do RBD-ELISA IgM observamos que a maior diferença entre as DOs dos controles positivos e negativos foi obtida utilizando 100 ng

da RBD por poço. Todavia, são observadas na literatura diferentes quantidades de antígeno para sensibilização das microplacas. De fato, foram encontradas quantidades de 20 ng/mL (RAMÍREZ-REVECO et al., 2023), 640 ng/mL (RAOUFI et al., 2023), 1 µg/mL (INDENBAUM et al., 2020; OVED et al., 2020), 1,5 µg/mL (LOU et al., 2021), 2 µg/mL (MARTÍNEZ-BARNETCHE et al., 2022; AMANAT et al., 2020), 2,5 µg/mL (HAMORSKY et al., 2021), 5 µg/mL e 50 ng/mL (AYÓN-NÚÑEZ et al., 2022). O estudo realizado por Raoudi e cols. (2023) avaliou diferentes quantidades de antígenos (RBD) 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 e 1280 ng/poço. Através dos valores de SNR encontrados, a quantidade de 640 ng obteve o maior SNR (SNR = 4,08) na detecção de anticorpos IgG. Por outro lado, utilizamos uma menor quantidade de antígeno (100 ng) em nosso estudo, e alcançamos um valor de SNR quase sete vezes maior (26,61) que o relatado por estes autores.

A detecção de diferentes subtipos de anticorpos anti-RBD exige diferentes protocolos. No RBD-ELISA IgG o anticorpo conjugado foi utilizado na diluição de 1:10.000, enquanto o RBD-ELISA IgM foi a diluição de 1:20.000. As diluições encontradas na literatura para detecção de IgG variam de 1:2.000 a 1:20.000, enquanto para IgM foram de 1:3.000 e 1:15.000 (RAOUFI et al., 2023; AYÓN-NÚÑEZ et al., 2022; MARTÍNEZ-BARNETCHE et al., 2022; AMANAT et al., 2020; INDENBAUM et al., 2020). A variação encontrada para detecção dos subtipos de anticorpo foi pequena, semelhante a variação nas diluições das amostras. Na literatura, notamos que a maioria dos estudos utilizam amostras mais concentradas (RAMÍREZ-REVECO et al., 2023; MARTÍNEZ-BARNETCHE et al., 2022). Excepcionalmente, Luo e cols. (2021) utilizaram as amostras diluíram 1.500 vezes.

6.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DIAGNÓSTICO

A avaliação de desempenho dos RBD-ELISA IgG e o RBD-ELISA IgM foi realizada através do cálculo da sensibilidade, especificidade, acurácia, dentre outros. Os testes desenvolvidos no presente estudo obtiveram baixa sensibilidade e elevada especificidade. Todavia, os valores da AUC encontrados para ambos os testes mostraram boa capacidade diagnóstica da RBD. Na literatura, diversos estudos avaliaram a RBD como matriz antigênica para o diagnóstico da COVID-19, sendo encontrados valores de desempenho variados. O desempenho dos ELISAs *in-house* usando RBD variam em termos de sensibilidade, dependendo do protocolo usado, do anticorpo secundário detectado, do vetor usado para a expressão da proteína recombinante e do tempo entre o aparecimento dos sintomas e coleta da

amostra biológica (AYÓN-NÚÑEZ et al., 2022). Dentre os estudos encontrados, a sensibilidade da RBD variou de 76,3% a 94,7% na detecção de anticorpos IgG e 47,0% a 81,6% para a detecção de IgM. Por outro lado, todos os estudos demonstraram valores de especificidade superiores a 95% (LUO et al., 2022; GUEVARA et al., 2021; HAMORSKY et al., 2021; INDENBAUM et al., 2020; MEIRA et al., 2022; OVED et al., 2020). Entretanto, a avaliação do potencial diagnóstico baseado somente na sensibilidade, especificidade e acurácia não é suficiente para avaliar a eficácia de um teste. Por meio das razões de verossimilhança foi possível calcular a razão da probabilidade diagnóstica (DOR) (SACKETT; STRAUS, 1998). A DOR é a razão das chances de positividade da doença em indivíduos doentes em relação às chances de positividade nos indivíduos não-doentes (GLAS et al., 2001). O RBD-ELISA IgG e o RBD-ELISA IgM apresentaram valores de DOR elevados, com probabilidades de 100 e 18 vezes, respectivamente. A determinação das razões de verossimilhança e DOR dos ensaios é importante para estudos de avaliação e validação de um antígeno, visto que não dependem da prevalência da doença na população, sendo para considerados, juntamente com a sensibilidade, especificidade e acurácia, parâmetros intrínsecos de um teste diagnóstico.

Testes comerciais usando a RBD também foram desenvolvidos, incluindo o VIDAS® SARS-COV-2 RBD IgG (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, França), o Siemens SARS-CoV-2 RBD Total (COV2T) (Siemens, NY, EUA) e o ensaio Access SARS-CoV-2 RBD IgG (Beckman-Coulter, CA, EUA). De acordo com os manuais dos fabricantes, estes testes apresentam especificidade de 99,9%, 99,8% e 99,8%, respectivamente, mas estimam a sensibilidade levando em consideração o número de dias após a positividade da PCR, inferindo sua variação quando posta em prática. Tal variação foi demonstrada por Oved et al. (2022), cuja sensibilidade foi de 89,3% para o sistema VIDAS, 81,5% para o Access e 85,9% para o Siemens.

As variações encontradas na literatura quanto o desempenho dos ensaios sorológicos estão associados aos diferentes perfis de anticorpos encontrados durante o processo infeccioso (DEEKS et al., 2020; OKBA et al., 2020). Diversos autores reportaram aumento na reatividade e sensibilidade dos imunoenaios ao utilizarem amostras de indivíduos com mais de 10 dias de sintomas (NILSSON et al., 2021; GUO et al., 2020; TUAILLON et al., 2020). Os indivíduos infectados pelo SARS-CoV-2 soroconvertem para os diferentes isotipos de anticorpos, contrário ao padrão clássico de outras doenças, podendo levar até 20 dias para soroconversão de anticorpos, principalmente do subtipo IgG (IYER et al., 2020).

Estes dados corroboram com os nossos resultados. Com a estratificação das amostras positivas para COVID-19 de acordo com a data da coleta após o início dos sintomas foi possível

observar elevação nos parâmetros de desempenho dos imunoenaios. Os valores de sensibilidade e acurácia encontrados aumentaram a cada intervalo de coleta tanto para o RBD-ELISA IgG e RBD-ELISA IgM, atingindo valores de 88,2% e 88,2% para a sensibilidade e 98,2% a 94% para a acurácia, respectivamente. Em amostras oriundas de pacientes com mais de quinze dias após o início dos sintomas a DOR mostrou valores superior a 800,0 na detecção de anticorpos IgG. Ou seja, um indivíduo testado pelo RBD-ELISA IgG possui oitocentas vezes mais chance de ser diagnosticado corretamente para a COVID-19. Contudo, o RBD-ELISA IgM mostrou perda nos valores de sensibilidade e DOR no intervalo com mais de 22 dias após o início dos sintomas.

O uso da análise combinatória tem como objetivo elevar a qualidade de um teste, para obtenção de valores elevados independente do intervalo da coleta da amostra. Através da abordagem em paralelo, utilizando os resultados do RBD-ELISA IgG e do RBD-ELISA IgM, foi possível elevar a capacidade do teste em detectar os pacientes positivos para a COVID-19, sendo no nosso estudo observado um valor de sensibilidade de 74,6% e acurácia de 84,1%, independente do tempo de coleta após o início dos sintomas. Portanto, um algoritmo diagnóstico utilizando os resultados do RBD-ELISA IgG e RBD-ELISA IgM em paralelo se mostra uma promissora ferramenta para auxiliar o diagnóstico da COVID-19 e fornecer informações complementares quanto a resposta humoral de indivíduos infectados. O desenvolvimento de um RBD-ELISA IgG + IgM pode fornecer resultados primários, dispensando a realização em paralelo do RBD-ELISA IgG e RBD-ELISA IgM. Contudo, esta estratégia não foi abordada em nosso estudo.

6.3 REATIVIDADE CRUZADA

O RBD-ELISA IgG e o RBD-ELISA IgM, quando utilizados para avaliar amostras positivas para outras doenças infecto-parasitárias de importância epidemiológica do Brasil, apresentaram baixa taxa de reatividade cruzada. Dentre as amostras que apresentaram reatividade, a maioria tinha origem viral com exceção das amostras de leishmaniose e sífilis. Poucos estudos avaliam a existência de reações cruzadas com o SARS-CoV-2, no entanto alguns descrevem a existência de reatividade cruzada com arbovírus, como o vírus da dengue (HUNSAWONG et al., 2022; LUSTIG et al., 2021). Enquanto outros estudos também relatam a existência de reatividade cruzada com o vírus da Zika (FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2020) e para as hepatites A e B (PAIVA et al., 2020). Estas reatividades mostram-se um problema de

saúde pública em áreas endêmicas para arboviroses, devido os sintomas serem semelhantes e inespecíficos (SRI MASYENI et al., 2021). Todavia, duas hipóteses para a presença de reatividade cruzada podem ser aventadas. A primeira delas refere-se à presença de anticorpos contra outros HCoV circulantes no ambiente responsáveis por resfriados comuns e sazonais (AGUILAR-BRETONES et al., 2021; MA et al., 2020). E a segunda hipótese refere-se à formação de ligações inespecíficas oriundas de semelhanças conformacionais (LEDER et al., 1994; SILVA, 2007). Anticorpos conseguem formar ligações com diferentes proteínas em virtude do reconhecimento de cadeias tridimensionais semelhantes causando reações cruzadas (WILLIAMS JUNIOR et al., 1997). Novos estudos são necessários para elucidar a existência de reatividade cruzada do SARS-CoV-2 com outros patógenos, principalmente coronavírus e arboviroses.

No entanto, o atual estudo apresenta algumas limitações visto que não analisamos amostras obtidas após o surgimento das novas variantes do SARS-CoV-2, não incluímos no nosso painel sorológico amostras de indivíduos assintomáticos ou vacinados para a validação dos testes, e nem amostras de outras arboviroses como febre amarela, Zika, influenza e Chikungunya. Além disso, o painel amostral utilizado nesta etapa foi composto por amostras de conveniência tendo variação no quantitativo das amostras usadas para cada doença.

6.4 COMPARAÇÃO DO DESEMPENHO DOS RBD-ELISA COM TESTES COMERCIAIS

O desempenho diagnóstico do RBD-ELISA IgG e RBD-ELISA IgM foram comparados ao desempenho de testes comerciais disponíveis no Brasil. O GOLD ELISA COVID-19 IgG+IgM possui matriz antigênica composta por três antígenos recombinantes (S1 + S2 + N) e detecta anticorpos IgG e IgM. Este ensaio apresentou valores de sensibilidade, especificidade e acurácia semelhantes aos encontrados pelo nosso grupo utilizando o RBD-ELISA IgG e o RBD-ELISA IgM, com sobreposição dos intervalos de confiança a 95%, indicando que não houve diferença de desempenho diagnóstico entre eles. Tais achados são de extrema relevância, visto que os testes de ELISA desenvolvidos no presente estudo obtiveram o mesmo desempenho diagnóstico de um teste comercial mesmo utilizando a detecção de somente uma classe de anticorpo (IgG ou IgM) e apenas uma proteína como antígeno de captura.

O Anti-SARS-CoV-2 NCP ELISA (IgG) utiliza o domínio S1 da proteína S para detecção de anticorpos IgG contra o SARS-CoV-2 e o Euroimmun Anti-SARS-CoV-2 NCP ELISA (IgM) utiliza a proteína N para detecção de anticorpos IgM. Estes ensaios apresentaram

sensibilidades inferiores aos obtidos nos RBD-ELISA, mas com sobreposição do IC95%. O Anti-SARS-CoV-2 NCP ELISA (IgG) obteve a menor acurácia dentre os demais, contudo a DOR encontrada é similar à do RBD-ELISA IgG. Na literatura estudos relataram valores variados da sensibilidade do Euroimmun Anti-SARS-CoV-2 IgG ELISA variando de 37,8% a 93,9% (NILSSON et al., 2021; GUETIÉRREZ-COBOS et al., 2020; TUAILLON et al., 2020; VAN ESLAND et al., 2020). Os diferentes desempenhos podem ser associados a painéis sorológicos composto por amostras coletadas em diferentes períodos da COVID-19. A síntese de anticorpos varia de acordo com a fase da infecção, interferindo no desempenho dos ensaios sorológicos (DEEKS et al., 2020). Ao utilizar o Anti-SARS-CoV-2 NCP ELISA (IgG) em amostras coletadas a partir da segunda semana após o início dos sintomas foram relatados valores de sensibilidade superiores a 90,0% (MONTESINOS et al., 2020; NICOL et al., 2020).

A análise combinatoria na abordagem em paralelo surpreendentemente obteve valores de sensibilidade e acurácia superiores ao dos testes comerciais empregados no estudo. Este achado fortalece o potencial do uso do RBD-ELISA IgG e do RBD-ELISA IgM em paralelo como ferramenta diagnóstica, bem como a necessidade do desenvolvimento de um teste RBD-ELISA IgG + IgM.

6.5 DINÂMICA DOS ANTICORPO

O perfil de anticorpos produzidos por indivíduos infectados pelo SARS-CoV-2 é heterogêneo, fugindo do padrão clássico e apresentando variação entre eles (IYER et al., 2020; GUO et al., 2020). Contudo, é possível observar algumas tendências por meio da análise da dinâmica dos anticorpos. A estratificação das amostras positivas para COVID-19 de acordo com a data da coleta após o início dos sintomas permitiu investigar o comportamento do RBD-ELISA IgG e RBD-ELISA IgM para soroconversão da COVID-19. Entre os quatro pacientes cujas amostras foram analisadas, não se observou qualquer tendência na detecção de IgM. No entanto, o paciente ID 61 foi o único a apresentar detecção precoce de anticorpos, principalmente IgM. Por outro lado, na detecção de anticorpos IgG, observou-se um aumento gradual do sinal até sua estabilização. Uma exceção ocorreu no caso do paciente ID 60, cuja amostra coletada no vigésimo dia após o início dos sintomas demonstrou um declínio no sinal em comparação com a coleta anterior.

A literatura relata que resposta imune humoral contra o SARS-CoV-2 varia entre indivíduos e é influenciada por diversos fatores como idade (O'DRISCOLL et al., 2020),

comorbidades (BENNETT et al., 2021), coinfeções (WOLDAY et al., 2021) e a variante do SARS-CoV-2 (LAURING et al., 2022). Resultados discordantes são observados na literatura quanto ao tempo de decaimento dos anticorpos, com relatos de queda rápida ou lenta (BEAUDOIN-BUSSIÈRES et al., 2020; IYER et al., 2020). Contudo, foi observado que o decaimento de anticorpos anti-SARS-CoV-2 acontece mais rapidamente que anticorpos anti-SARS-CoV (IBARRANDO et al., 2020). Associação entre o prognóstico e resposta imune humoral de paciente com COVID-19 é relatada na literatura (RÖLTGEN et al., 2020). Similarmente, a relação entre a quantidade de anticorpos e possibilidade de reinfeção também é descrita na literatura (LI et al., 2020). Entretanto nossos resultados não evidenciaram nenhuma das relações anteriores.

Nossa análise é limitada devido ao baixo número de coletas realizadas não permitindo um acompanhamento a longo prazo, impedindo realizar relações entre sinal e desfecho. Portanto, torna-se essencial aprofundar o entendimento acerca da persistência dos anticorpos durante e após o processo infeccioso, com relevância tanto para fins diagnósticos quanto para a condução de estudos epidemiológicos, pesquisas sorológicas e a investigação da síntese de anticorpos de caráter protetor.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A fração RBD da proteína S dos SARS-CoV-2 é capaz de diferenciar amostras positivas e negativas para COVID-19, com boa e regular capacidade diagnóstica;
- Apesar da baixa sensibilidade do RBD-ELISA IgG e do RBD-ELISA IgM, ambos os testes apresentaram capacidade diagnóstica em virtude dos valores de AUC;
- O RBD-ELISA IgG e o RBD-ELISA IgM apresentam elevada especificidade, podendo ser úteis na exclusão de casos suspeitos de infecção assintomática;
- Os testes RBD-ELISA IgG e o RBD-ELISA IgM apresentam valor diagnóstico para detecção de casos positivos a partir de 15 após o aparecimento dos sintomas;
- Os testes RBD-ELISA IgG e o RBD-ELISA IgM podem ser utilizados em áreas co-endêmicas para doença de Chagas, dengue, HIV-1/2, HTLV-1/2, HBV, HCV sífilis e leishmaniose e filariose devido ao baixo índice de reatividade cruzada;
- A análise em paralelo deve ser estimulada ao utilizar RBD-ELISA IgG e o RBD-ELISA IgM por aumentar a sua capacidade e por apresentar maior sensibilidade comparada a testes comerciais disponíveis no Brasil.
- A dinâmica de anticorpos encontrada entre os pacientes que tiveram múltiplas amostras coletadas não mostrou um padrão específico, no entanto foi possível observar que no RBD-ELISA IgM as amostras positivaram logo nas primeiras amostras, ao contrário do RBD-ELISA IgG.

8 PERSPECTIVAS

- Avaliar a reatividade do RBD-ELISA IgG e do RBD-ELISA IgM ao soro de indivíduos infectados por diferentes variantes do SARS-CoV-2;
- Avaliar a reatividade do RBD-ELISA IgG e do RBD-ELISA IgM ao soro de indivíduos vacinados contra o SARS-CoV-2;
- Avaliar a reatividade do RBD-ELISA IgG e do RBD-ELISA IgM ao soro de indivíduos assintomáticos infectados pelo SARS-CoV-2;
- Desenvolver e avaliar um teste sorológico para detecção conjunta do IgG e IgM: RBD-ELISA IgG + IgM;
- Aumentar o número amostral de pacientes com acompanhamento clínico para estabelecimento da dinâmica de produção de anticorpos anti-SARS-CoV-2;
- Avaliar a reatividade cruzada do RBD-ELISA IgG e do RBD-ELISA IgM ao soro de indivíduos positivos para outras doenças infecciosas: Zika, Chikungunya, febre amarela, influenza e outros coronavírus humanos.

REFERÊNCIAS

ADIL, M. T. et al. SARS-CoV-2 and the pandemic of COVID-19. **Postgraduate Medical Journal**, London, v. 97, n. 1144, p. 110–116, Feb. 2020.

AGUILAR-BRETONES M. et al. Seasonal coronavirus-specific B cells with limited SARS-CoV-2 cross-reactivity dominate the IgG response in severe COVID-19. **The Journal of clinical investigation**, New Haven, v. 131, n. 21, Sept. 2021.

ALSHAMMARY, A. F. et al. T-Cell subsets and interleukin-10 levels are predictors of severity and mortality in COVID-19: A systematic review and meta-analysis. **Frontiers in Medicine**, Lausanne, v. 9, p. 852749, Apr. 2022.

AMANAT, F. et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. **Nature Medicine**, New York, v. 26, n. 7, p. 1033-1036, May. 2020.

AYÓN-NÚÑEZ, D. A. et al. An RBD-Based Diagnostic Method Useful for the Surveillance of Protective Immunity against SARS-CoV-2 in the Population. **Diagnostics (Basel, Switzerland)**, Basel, v. 12, n. 7, p. 1629–1629, July. 2022.

BEAUDOIN-BUSSIÈRES, G. et al. Decline of Humoral Responses against SARS-CoV-2 Spike in Convalescent Individuals. **mBio**, Washington, v. 11, n. 5, Oct. 2020.

BEAVIS, K. G. et al. Evaluation of the EUROIMMUN Anti-SARS-CoV-2 ELISA Assay for detection of IgA and IgG antibodies. **Journal of clinical virology**, Amsterdam, v. 129, p. 104468–104468, May. 2020.

BENNETT, T. D. et al. Clinical characterization and prediction of clinical severity of SARS-CoV-2 infection among us adults using data from the US National COVID cohort collaborative. **JAMA network open**, Chigaco, v. 4, n. 7, p. e2116901, July. 2020.

BERRY, J. D. et al. Neutralizing epitopes of the SARS-CoV S-protein cluster independent of repertoire, antigen structure or mAb technology. **mAbs**, Austin, v. 2, n. 1, p. 53–66, Jan. 2010.

BOGOCH, I. I. et al. Pneumonia of unknown aetiology in Wuhan, China: potential for international spread via commercial air travel. **Journal of Travel Medicine**, Hamilton, v. 27, n. 2, p. taaa008, Mar. 2020.

CAO, Y. et al. Potent Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 Identified by High-Throughput Single-Cell Sequencing of Convalescent Patients' B Cells. **Cell**, Cambridge, v. 182, n. 1, p. 73-84.e16, July. 2020.

CHAU, C. H.; STROPE, J. D.; FIGG, W. D. COVID-19 clinical diagnostics and testing technology. **Pharmacotherapy**, Carlisle, v. 40, n. 8, p. 857–868, Aug. 2020.

CHEN, J. et al. Emerging Dominant SARS-CoV-2 Variants. **Journal of Chemical Information and Modeling**, Washington, v. 63, n. 1, p. 335-342, Dec. 2022

DEAN, A. G. et al. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention (CDC); 2013. Available: www.OpenEpi.com

DEEKS, J. J. et al. Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, Oxford, v. 6, n. 6, p. CD013652, June. 2020.

EMERGENCIAS PREPAREDNESS. **Diagnostic testing for SARS-CoV-2**. Who.int. World Health Organization; 2020. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/diagnostic-testing-for-sars-cov-2>. Acesso em: 25 jan. 2021.

FACCINI-MARTÍNEZ, Á. A. et al. Serological cross-reactivity using a SARS-CoV-2 ELISA test in acute Zika virus infection, Colombia. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 101, p. 191–193, Sept. 2020.

FEHR, A. R.; PERLMAN, S. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 1282, p. 1–23, Feb. 2015.

FERNANDES-SIQUEIRA, L. O. et al. On the caveats of a multiplex test for SARS-CoV-2 to detect seroconversion after infection or vaccination. **Scientific reports**, London, v. 12, n. 1, June. 2022.

FIOLET, T. et al. Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: a narrative review. **Clinical Microbiology and Infection**, London, v. 28, n. 2, p. 202–221, Oct. 2021.

FURUKAWA, N. W.; BROOKS, J. T.; SOBEL, J. Evidence Supporting Transmission of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 While Presymptomatic or Asymptomatic. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 26, n. 7, p. e201595, June. 2020.

GATTINGER, P. et al. Neutralization of SARS-CoV-2 requires antibodies against conformational receptor-binding domain epitopes. **Allergy**, Copenhagen, v. 77, n. 1, p. 230–242, Sept. 2021.

GLAS, A. S. et al. The diagnostic odds ratio: a single indicator of test performance. **Journal of Clinical Epidemiology**, Oxford, v. 56, n. 11, p. 1129–1135, Nov. 2003.

GOLOB, J. L.; LUGOGO, N.; LAURING, A. S.; LOK, A. S. SARS-CoV-2 vaccines: a triumph of science and collaboration. **JCI Insight**, Michigan, v. 6, n. 9, p. e149187, May. 2021.

GORDON, D. E. et al. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. **Nature**, London, v. 583, n. 7816, p. 459–468, Apr. 2020.

GUAN, W. et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. **The New England Journal of Medicine**, New York, v. 58, n. 4, p. 711–712, Apr. 2020.

GUTIÉRREZ-COBOS A. et al. Evaluation of diagnostic accuracy of 10 serological assays for detection of SARS-CoV-2 antibodies. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Berlin, v. 40, n. 5, p. 955–961, Nov. 2020.

GUEVARA, A. et al. A Low-Cost SARS-CoV-2 rRBD ELISA to Detect Serostatus in Ecuadorian Population with COVID-19. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 104, n. 4, p. 1513–1515, Feb. 2021.

GUO, L. et al. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 71, n. 15, p. 778–785, Mar. 2020.

GUPTA, A. et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. **Nature Medicine**, New York, v. 26, n. 7, p. 1017–1032, July. 2020.

HAMORSKY, K. T. et al. Serological assessment of SARS-CoV-2 infection during the first wave of the pandemic in Louisville Kentucky. **Scientific Reports**, London, v. 11, n. 1, Sept. 2021.

HARRITSH, L. H. et al. Comparison of 16 Serological SARS-CoV-2 Immunoassays in 16 Clinical Laboratories. **Journal of Clinical Microbiology**, Washintong, v.59, n.5, p. e02596-20, Apr. 2021

HUNSAWONG, T. et al. Anti-Arbovirus Antibodies Cross-React with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. **Microbiology Spectrum**, Washington, v. 10, n. 6, Nov. 2022.

IBARRONDO, F. J. et al. Rapid Decay of Anti-SARS-CoV-2 Antibodies in Persons with Mild Covid-19. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 383, n. 11, p. 1085–1087, July. 2020.

INDENBAUM, V. et al. Testing IgG antibodies against the RBD of SARS-CoV-2 is sufficient and necessary for COVID-19 diagnosis. **PLoS One**, San Francisco, v. 15, n. 11, p. e0241164, Nov. 2020.

IYER, A. S. et al. Persistence and decay of human antibody responses to the receptor binding domain of SARS-CoV-2 spike protein in COVID-19 patients. **Science Immunology**, Washington, v. 5, n. 52, Oct. 2020.

JONSDOTTIR, H. R.; DIJKMAN, R. Coronaviruses and the human airway: a universal system for virus-host interaction studies. **Virology Journal**, London, v. 13, n. 24, Feb. 2016.

KADAM, S. B. et al. SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 61, n. 3, p. 180–202, Mar. 2021.

KEVADIYA, B. D. et al. Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. **Nature Materials**, London, v. 20, n. 5, p. 593–605, Feb. 2021.

KHATAMI, F. et al. A meta-analysis of accuracy and sensitivity of chest CT and RT-PCR in COVID-19 diagnosis. **Scientific Reports**, London, v. 10, n. 1, Dec. 2020.

KORBER, B. et al. Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. **Cell**, Cambridge, v. 182, n. 4, p. 812-827.e19, Aug. 2020

KUCIRKA, L. M. et al. Variation in False-Negative Rate of Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction–Based SARS-CoV-2 Tests by Time Since Exposure. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 173, n. 4, p. 262–267, Aug. 2020.

KUMAR, M.; AL KHODOR, S. Pathophysiology and treatment strategies for COVID-19. **Journal of Translational Medicine**, London, v. 18, n. 1, p. 353, Sept. 2020.

LAN, J. et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. **Nature**, London, v. 581, n. 7807, p. 215–220, May. 2020.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, Washington, v. 33, n. 1, p. 159–174, Mar. 1977.

LAURING, A. S. et al. Clinical severity of, and effectiveness of mRNA vaccines against, covid-19 from omicron, delta, and alpha SARS-CoV-2 variants in the United States: prospective observational study. **BMJ: British Medical Journal**, London, v. 376, Mar. 2022.

LEDER, L. et al. Genuine and apparent cross-reaction of polyclonal antibodies to proteins and peptides. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 219, n. 1-2, p. 73–81, Jan. 1994.

LENHARO, M. WHO declares end to COVID-19's emergency phase. **Nature**, London. 2023. Doi:10.1038/d41586-023-01559-z

LI, F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. **Annual Review of Virology**, Palo Alto, v. 3, n. 1, p. 237–261, Sept. 2016.

LI, K. et al. Dynamic changes in anti-SARS-CoV-2 antibodies during SARS-CoV-2 infection and recovery from COVID-19. **Nature Communications**, London, v. 11, n. 1, Nov. 2020.

LI, Q. An Outbreak of NCIP (2019-nCoV) Infection in China — Wuhan, Hubei Province, 2019–2020. **China CDC Weekly**, Beijing, v. 2, n. 5, p. 79–80, Jan. 2020.

LI, Y. et al. Stability issues of RT-PCR testing of SARS-CoV-2 for hospitalized patients clinically diagnosed with COVID-19. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 92, n. 7, p. 903–908, July. 2020.

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

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

LUO, S. et al. Quantitative Detection of Anti-SARS-CoV-2 Antibodies Using Indirect ELISA. **Laboratory Medicine**, Philadelphia v. 53, n. 3, p. 225–234, May. 2022.

LUPALA, C. S. et al. Mutations on RBD of SARS-CoV-2 Omicron variant result in stronger binding to human ACE2 receptor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 590, p. 34–41, Jan. 2022.

LUSTIG, Y. et al. Potential Antigenic Cross-reactivity Between Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and Dengue Viruses. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 73, n. 7, p. e2444–e2449, Oct. 2021.

MA, Z. et al. Cross-reactivity towards SARS-CoV-2: the potential role of low-pathogenic human coronaviruses. **The Lancet. Microbe**, Oxford, v. 1, n. 4, p. e151–e151, Aug. 2020.

MARTÍNEZ-BARNETCHE, J. et al. Comparable diagnostic accuracy of SARS-CoV-2 Spike RBD and N-specific IgG tests to determine pre-vaccination nation-wide baseline seroprevalence in Mexico. **Scientific Reports**, London, v. 12, n. 1, Oct. 2022.

MASYENI, S. et al. Serological cross-reaction and coinfection of dengue and COVID-19 in Asia: Experience from Indonesia. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 102, p. 152–154, Jan. 2021.

MEIRA, C. et al. Diagnostic Performance of Three ELISAs for Detection of Antibodies against SARS-CoV-2 in Human Samples. **The Scientific World Journal**, Boynton Beach, v. 2022, p. 1–7, Aug. 2022.

MEYEROWITZ, E. A. et al. Transmission of SARS-CoV-2: A Review of Viral, Host, and Environmental Factors. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 174, n. 1, p. 69–79, Jan. 2021.

MINIĆ, R.; ZIVKOVIC, I. Optimization, Validation and Standardization of ELISA. **Norovirus**, IntechOpen, Sept. 2021.

MONTESINOS, I.; GRUSON, D.; Kabamba, B. et al. Evaluation of two automated and three rapid lateral flow immunoassays for the detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies. **Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, Amsterdam, v. 128, p. 104413, July. 2020

MULLIGAN, M. J. et al. Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults. **Nature**, London, v. 586, n. 7830, p. 589–593, Oct. 2020.

NAQVI, A. A. T. et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. **Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease**, Amsterdam, v. 1866, n. 10, p. 165878, Oct. 2020.

NICOL, T. et al. Assessment of SARS-CoV-2 serological tests for the diagnosis of COVID-19 through the evaluation of three immunoassays: Two automated immunoassays (Euroimmun and Abbott) and one rapid lateral flow immunoassay (NG Biotech). **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 129, p. 104511, Aug. 2020.

NILSSON, A. C. et al. Comparison of six commercially available SARS-CoV-2 antibody assays—Choice of assay depends on intended use. v. 103, p. 381–388, Feb. 2021.

O'DRISCOLL, M. et al. Age-specific mortality and immunity patterns of SARS-CoV-2. **Nature**, London, v. 590, p. 140–145, Nov. 2020

OJA, A. E. et al. Divergent SARS-CoV-2-specific T- and B-cell responses in severe but not mild COVID-19 patients. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 50, n. 12, p. 1998–2012, Dec. 2020.

OKBA, N. M. A. et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2–Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 26, n. 7, p. 1478–1488, June. 2020.

ONG, D. E. et al. How to interpret and use COVID-19 serology and immunology tests. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 27, n. 7, p. 981–986, July. 2021.

OUCHCHANE, L.; RABILLOUD, M.; BOIRE, J. Y. Sensibilité, spécificité et valeurs prédictives. In: BEUSCART, R. (Org.). **Évaluation des méthodes d'analyse appliquées aux sciences de la vie et de la santé Biostatistique**. Paris: Omniscience, 2009. P. 49-78.

OVED, K. et al. Multi-center nationwide comparison of seven serology assays reveals a SARS-CoV-2 non-responding seronegative subpopulation. **E Clinical Medicine**, London, v. 29-30, p. 100651–100651, Nov. 2020.

PAIVA, K. J. et al. Validation and performance comparison of three SARS-CoV-2 antibody assays. **Journal of medical virology**, New York, v. 93, n. 2, p. 916–923, Feb. 2021.

PERRINE, G. SARS-CoV-2 B.1.1.529 (Omicron) Variant: United States, december 1–8, 2021. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 70, n. 50, p. 1731–1734, Dec. 2021.

PERVEEN, S. et al. COVID-19 diagnostics: Molecular biology to nanomaterials. **International Journal of Clinical Chemistry**, Amsterdam, v. 538, p. 139–156, Nov. 2022.

PETERHOFF, D. et al. A highly specific and sensitive serological assay detects SARS-CoV-2 antibody levels in COVID-19 patients that correlate with neutralization. **Infection**, München, v. 49, n. 1, p. 75–82, Feb. 2021.

PICCOLI, L. et al. Mapping Neutralizing and Immunodominant Sites on the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain by Structure-Guided High-Resolution Serology. **Cell**, Cambridge, v. 183, n. 4, p. 1024-1042.e21, Sept. 2022.

PREMKUMAR, L. et al. The receptor-binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. **Science Immunology**, Washington, v. 5, n. 48, p. eabc8413, June. 2020.

QURAIISHI, M.; UPADHYAY, S. K.; NIGAM, A. COVID-19 Diagnostics: A Panoramic View on Its Present Scenario, Challenges and Solutions. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India. Section B**, Allahabad, v. 92, n. 4, p. 709–721, May. 2022.

RAMÍREZ-REVECO, A. et al. Performance estimation of two in-house ELISA assays for COVID-19 surveillance through the combined detection of anti-SARS-CoV-2 IgA, IgM, and IgG immunoglobulin isotypes. **PloS One**, San Francisco, v. 18, n. 2, p. e0270388–e0270388, Feb. 2023.

RAOUFI, E. et al. Designing and developing a sensitive and specific SARS-CoV-2 RBD IgG detection kit for identifying positive human samples. **International Journal of Clinical Chemistry**, Amsterdam, v. 542, p. 117279–117279, Mar. 2023.

RAVICHANDRAN, S. et al. Antibody signature induced by SARS-CoV-2 spike protein immunogens in rabbits. **Science Translational Medicine**, Washington, v. 12, n. 550, July. 2020.

RÖLTGEN, K. et al. Defining the features and duration of antibody responses to SARS-CoV-2 infection associated with disease severity and outcome. **Science Immunology**, Washington, v. 5, n. 54, Dec. 2020

ROTONDO, J. C. et al. Advanced Molecular and Immunological Diagnostic Methods to Detect SARS-CoV-2 Infection. **Microorganisms**, Basel, v. 10, n. 6, p. 1193–1193, June. 2022.

SACKETT, D. L.; STRAUS, S. On some clinically useful measures of the accuracy of diagnostic tests. **ACP Journal Club**, Philadelphia, v. 129, p. A17-9. 1998

SAMUDRALA, P. K. et al. Virology, pathogenesis, diagnosis and in-line treatment of COVID-19. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 883, p. 173375, Sept. 2020.

SANTOS, F. L. N. **Caracterização do potencial diagnóstico de poliantígenos para detecção do Trypanosoma cruzi na fase crônica da doença de Chagas**. Tese (Doutorado) – Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2016.

SAPONARO, F. et al. ACE2 in the Era of SARS-CoV-2: Controversies and Novel Perspectives. **Frontiers in Molecular Biosciences**, Lausanne v. 7, p. 588618, Sept. 2020.

SATARKER, S.; NAMPOOTHIRI, M. Structural Proteins in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2. **Archives of Medical Research**, Mexico, v. 51, n. 6, p. 482–491, Aug. 2020.

SILVA, M. Z. O. **Padronização de um ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando uma proteína multiepítipo recombinante para produção de um kit para diagnóstico da hepatite C**. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação e Pesquisa em Ciências Ambientais e Saúde, Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2007.

SIU, Y. L. et al. The M, E, and N Structural Proteins of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Are Required for Efficient Assembly, Trafficking, and Release of Virus-Like Particles. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 82, n. 22, p. 11318–11330, Nov. 2008.

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

TUAILLON, E. et al. Detection of SARS-CoV-2 antibodies using commercial assays and seroconversion patterns in hospitalized patients. **The Journal of Infection**, London, v. 81, n. 2, p. e39–e45, Aug. 2020.

UDUGAMA, B. et al. Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. **ACS**

Nano, Washington, v. 14, n. 4, p. 3822–3835, Mar. 2020.

VAN ELSLANDE, J. et al. Antibody response against SARS-CoV-2 spike protein and nucleoprotein evaluated by four automated immunoassays and three ELISAs. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 26, n. 11, p. 1557.e1–1557.e7, Nov. 2020.

VANNABOUATHONG, C. et al. Novel Coronavirus COVID-19. **Journal of Bone and Joint Surgery**, Boston, v. 102, n. 9, p. 734–744, May. 2020.

VITIELLO, A.; FERRARA, F.; TROIANO, V.; LA PORTA, R. COVID-19 vaccines and decreased transmission of SARS-CoV-2. **Inflammopharmacology**, Switzerland, v. 29, n. 5, p. 1357–1360. July. 2021.

WALLS, A. C. et al. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. **Cell**, Cambridge, v. 181, n. 2, p. 281–292.e6, Apr. 2020.

WANG, M. et al. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 10, p. 587269, Nov. 2020.

WHITMAN, J. D. et al. Evaluation of SARS-CoV-2 serology assays reveals a range of test performance. **Nature Biotechnology**, New York, v. 38, n. 10, p. 1174–1183, Jan. 2020

WIKRAMARATNA, P. S. et al. Estimating the false-negative test probability of SARS-CoV-2 by RT-PCR. **Eurosurveillance**, Saint-Maurice, v. 25, n. 50, p. 2000568, Dec. 2020.

WILLIAMS JUNIOR, R. C. et al. Antigenic determinants reacting with rheumatoid factor: Epitopes with different primary sequences share similar conformation. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 34, n. 7, p. 543–556, May. 1997.

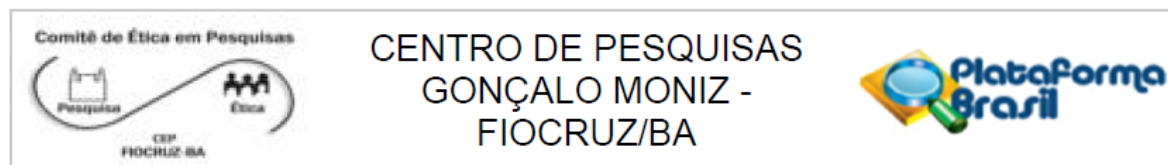
WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Statement on the fifteenth meeting of the IHR (2005) Emergency Committee on the COVID-19 pandemic**. WHO, 2023. Disponível em: <[https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-\(covid-19\)-pandemic](https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-(covid-19)-pandemic)>

WRAPP, D. et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. **Science**, New York, v. 367, n. 6483, p. 1260–1263, Mar. 2020.

WU, J. et al. Identification of RT-PCR-Negative Asymptomatic COVID-19 Patients via Serological Testing. **Frontiers in Public Health**, Lausanne, v. 8, p. 267 June. 2020.

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

ZHU, N. et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 382, n. 8, p. 727–733, Jan. 2020.

Anexo A – Parecer consubstanciado do CEP**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Enfrentamento da COVID-19: desenvolvimento de métodos de diagnóstico in vitro de alto desempenho

Pesquisador: FRED LUCIANO NEVES SANTOS

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 33552720.0.0000.0040

Instituição Proponente: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM/ FIOCRUZ/ BA

Patrocinador Principal: Fundação Oswaldo Cruz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.206.957

Apêndice A

AMOSTRAS	INTERVALO DA COLETA AIS	RECARACTERIZAÇÃO			IN-HOUSE	
		GOLD ¹	EI IgG ²	EI IgM ³	RBD IgG ⁴	RBD IgM ⁵
LIBCOV_PL-001	0-7 dias	0,27	0,05	0,04	0,65	1,03
LIBCOV_PL-002	0-7 dias	0,27	0,06	0,05	0,47	0,09
LIBCOV_PL-003	0-7 dias	0,27	0,04	0,09	0,41	0,52
LIBCOV_PL-004	0-7 dias	0,26	0,04	0,05	0,44	0,23
LIBCOV_PL-006	8-14 dias	0,23	0,05	0,05	0,25	0,46
LIBCOV_PL-007	8-14 dias	0,30	0,11	0,08	0,59	0,27
LIBCOV_PL-008	22-mais dias	5,37	4,02	2,25	16,83	0,98
LIBCOV_PL-009	22-mais dias	5,18	4,93	2,75	16,71	0,80
LIBCOV_PL-010	22-mais dias	5,31	5,64	3,37	16,77	0,84
LIBCOV_PL-011	22-mais dias	5,57	7,53	2,95	18,53	0,66
LIBCOV_PL-012	22-mais dias	5,39	5,36	1,99	18,27	0,73
LIBCOV_PL-013	8-14 dias	0,21	0,08	0,19	0,45	0,85
LIBCOV_PL-014	8-14 dias	0,22	0,02	0,15	0,63	0,63
LIBCOV_PL-015	8-14 dias	0,25	0,14	0,58	0,65	1,02
LIBCOV_PL-019	8-14 dias	0,27	0,1	0,12	0,65	0,38
LIBCOV_PL-020	15-21 dias	4,63	6,37	9,83	10,16	0,55
LIBCOV_PL-021	8-14 dias	4,04	3,24	3,17	5,21	0,23
LIBCOV_PL-022	0-7 dias	3,25	2,18	1,28	3,54	0,30
LIBCOV_PL-023	15-21 dias	2,85	1,16	0,24	2,30	0,62
LIBCOV_PL-024	8-14 dias	0,67	0,27	4,48	0,57	1,03
LIBCOV_PL-025	0-7 dias	3,62	2,91	1,46	4,57	0,16
LIBCOV_PL-026	22-mais dias	5,13	5,53	9,48	7,79	0,34
LIBCOV_PL-027	8-14 dias	4,47	4,86	1,49	6,27	0,55
LIBCOV_PL-028	8-14 dias	0,97	0,58	2,31	0,93	0,60
LIBCOV_PL-029	0-7 dias	0,21	0,07	0,06	0,47	0,46
LIBCOV_PL-030	0-7 dias	0,22	0,05	0,05	0,69	0,20
LIBCOV_PL-031	0-7 dias	0,26	0,09	0,13	0,53	0,57
LIBCOV_PL-032	8-14 dias	1,54	0,96	2,94	1,17	0,80
LIBCOV_PL-033	8-14 dias	0,27	0,08	0,03	0,43	1,41
LIBCOV_PL-034	8-14 dias	2,59	1,94	5,57	1,26	0,93
LIBCOV_PL-035	8-14 dias	0,29	0,07	0,05	0,37	0,98
LIBCOV_PL-036	0-7 dias	0,22	0,07	0,07	0,47	0,69
LIBCOV_PL-037	8-14 dias	3,28	3,35	6,42	1,68	0,48
LIBCOV_PL-038	8-14 dias	0,24	0,04	0,32	0,32	1,00
LIBCOV_PL-039	8-14 dias	2,47	1,64	3,28	2,31	3,82
LIBCOV_PL-040	8-14 dias	0,31	0,08	0,06	0,35	0,19
LIBCOV_PL-041	8-14 dias	3,86	3,44	5,47	5,71	5,17
LIBCOV_PL-042	0-7 dias	0,24	0,05	0,08	0,73	0,29
LIBCOV_PL-043	8-14 dias	0,25	0,01	0,82	0,24	0,09
LIBCOV_PL-044	8-14 dias	4,17	4,25	6,25	4,21	2,17

LIBCOV_PL-045	8-14 dias	4,50	6,29	8,61	7,60	2,76
LIBCOV_PL-046	8-14 dias	4,43	5,15	7,69	7,42	5,59
LIBCOV_PL-047	8-14 dias	0,25	0,06	2,27	0,28	0,18
LIBCOV_PL-048	22-mais dias	5,42	6,47	0,91	9,44	2,19
LIBCOV_PL-050	22-mais dias	5,50	7,11	0,15	8,01	1,50
LIBCOV_PL-053	22-mais dias	7,03	5,92	6,65	14,41	0,22
LIBCOV_PL-056	15-21 dias	2,89	2,7	14,35	3,30	2,38
LIBCOV_PL-057	15-21 dias	3,58	4,29	14,52	5,55	4,53
LIBCOV_PL-058	15-21 dias	3,72	4,72	2,53	3,22	1,71
LIBCOV_PL-059	0-7 dias	0,21	0,04	0,09	0,35	0,46
LIBCOV_PL-060	8-14 dias	0,19	0,06	0,12	0,31	0,55
LIBCOV_PL-061	0-7 dias	2,56	1,9	1,41	0,87	2,38
LIBCOV_PL-069	8-14 dias	1,68	5,06	0,26	8,61	0,76
LIBCOV_PL-070	8-14 dias	0,23	0,04	0,05	0,42	0,30
LIBCOV_PL-071	22-mais dias	5,84	5,08	0,03	1,81	0,83
LIBCOV_PL-072	22-mais dias	5,40	4,85	0,08	4,35	0,78
LIBCOV_PL-077	0-7 dias	1,31	0,14	0,31	0,51	0,36
LIBCOV_PL-078	0-7 dias	0,45	0,09	0,16	0,27	0,30
LIBCOV_PL-079	0-7 dias	0,80	0,1	0,17	0,41	0,31
LIBCOV_PL-080	0-7 dias	0,37	0,1	0,18	0,35	0,40
LIBCOV_PL-081	0-7 dias	3,31	2,54	1,01	2,73	0,92
LIBCOV_PL-082	0-7 dias	3,23	3,44	1,37	4,72	0,94
LIBCOV_PL-083	0-7 dias	1,61	2,15	0,55	4,47	2,08
LIBCOV_PL-084	8-14 dias	3,86	5,93	1,29	13,64	3,19
LIBCOV_PL-085	8-14 dias	4,33	5,36	1,01	15,62	3,62
LIBCOV_PL-086 / LIBCOV_SR359	0-7 dias	0,26	0,06	0,07	0,41	0,18
LIBCOV_PL-087	0-7 dias	0,26	0,06	0,05	0,38	0,14
LIBCOV_PL-088	0-7 dias	0,25	0,06	0,05	0,39	0,16
LIBCOV_PL-090	8-14 dias	0,25	0,06	0,07	0,33	0,18
LIBCOV_PL-091	0-7 dias	1,16	0,08	0,11	0,47	0,33
LIBCOV_PL-092	0-7 dias	2,86	0,24	0,65	0,82	0,72
LIBCOV_PL-093	0-7 dias	3,27	0,41	1,17	1,05	0,96
LIBCOV_PL-094	8-14 dias	2,75	0,89	1,27	1,44	2,14
LIBCOV_PL-095	15-21 dias	3,58	2,07	0,78	2,03	3,18
LIBCOV_PL-096	15-21 dias	4,54	4,08	0,95	5,07	1,58
LIBCOV_PL-097	15-21 dias	5,22	5,89	1,28	8,11	3,30
LIBCOV_PL-098	15-21 dias	4,84	5,37	1,22	3,36	3,07
LIBCOV_PL-100	8-14 dias	3,74	3,5	0,42	2,52	2,13
LIBCOV_PL-101	22-mais dias	6,57	4,42	5,76	2,41	2,67
LIBCOV_PL-102	22-mais dias	6,28	4,73	7,30	2,42	4,16
LIBCOV_PL-104	22-mais dias	6,39	5,19	8,12	2,32	4,18
LIBCOV_PL-105	8-14 dias	7,42	1,68	7,60	2,51	2,12
LIBCOV_PL-106	8-14 dias	4,05	5,05	10,83	1,78	2,80
LIBCOV_PL-107	8-14 dias	5,24	4,96	9,66	2,53	2,97

LIBCOV_PL-108	8-14 dias	5,43	5,83	4,70	2,90	-
LIBCOV_PL-109	8-14 dias	5,67	6,85	5,65	3,77	4,10
LIBCOV_PL-110	8-14 dias	5,73	6,96	5,99	3,94	4,12
LIBCOV_PL-118	0-7 dias	4,00	0,75	0,38	0,85	1,98
LIBCOV_PL-119	8-14 dias	4,59	1,52	0,45	1,04	1,25
LIBCOV_PL-120	8-14 dias	4,70	1,97	0,56	1,19	1,43
LIBCOV_PL-121	8-14 dias	4,49	-	-	1,20	1,36
LIBCOV_PL-122	8-14 dias	1,27	0,83	2,61	1,24	1,53
LIBCOV_PL-123	8-14 dias	1,90	1,46	2,18	1,50	1,69
LIBCOV_PL-124	8-14 dias	3,82	5,17	1,74	2,58	2,90
LIBCOV_PL-125	15-21 dias	4,26	5,55	2,04	2,52	2,14
LIBCOV_SR-001	0-7 dias	2,44	0,23	0,37	0,89	2,58
LIBCOV_SR-002	0-7 dias	0,28	0,13	0,10	0,39	0,30
LIBCOV_SR-004	8-14 dias	0,27	0,25	0,06	0,64	0,35
LIBCOV_SR-005	0-7 dias	3,39	0,33	1,14	1,27	2,04
LIBCOV_SR-006	0-7 dias	0,25	0,26	0,11	0,37	0,31
LIBCOV_SR-007	8-14 dias	0,26	0,29	0,04	0,50	0,42
LIBCOV_SR-008	8-14 dias	0,26	0,17	0,10	0,39	0,44
LIBCOV_SR-009	0-7 dias	4,59	0,94	2,23	1,74	3,79
LIBCOV_SR-010	8-14 dias	0,23	0,11	0,09	0,27	0,57
LIBCOV_SR-012	0-7 dias	5,41	2,32	4,94	7,05	3,41
LIBCOV_SR-013	8-14 dias	0,36	0,34	0,07	0,69	1,09
LIBCOV_SR-014	8-14 dias	2,25	0,56	0,60	1,77	3,13
LIBCOV_SR-015	8-14 dias	1,95	0,88	0,35	5,37	4,96
LIBCOV_SR-016	8-14 dias	7,01	6,52	10,43	18,69	5,97
LIBCOV_SR-017	8-14 dias	6,85	6,94	10,38	19,12	3,99
LIBCOV_SR-018	15-21 dias	5,23	4,15	1,41	13,45	4,33
LIBCOV_SR-019	8-14 dias	5,05	5,42	8,05	18,16	5,23
LIBCOV_SR-020	0-7 dias	0,22	0,27	0,06	0,38	0,62
LIBCOV_SR-021	15-21 dias	6,95	7,37	10,59	18,86	4,65
LIBCOV_SR-022	15-21 dias	5,51	5,91	1,74	16,20	3,85
LIBCOV_SR-023	8-14 dias	5,45	7,51	7,86	20,16	4,77
LIBCOV_SR-027	15-21 dias	6,91	0,04	9,44	19,69	3,69
LIBCOV_SR-029	15-21 dias	4,80	3,66	1,52	10,08	2,14
LIBCOV_SR-031	0-7 dias	0,26	0,19	0,13	0,41	0,20
LIBCOV_SR-033	0-7 dias	0,24	0,28	0,19	0,27	0,09
LIBCOV_SR-035	0-7 dias	0,55	0,38	0,06	0,54	0,30
LIBCOV_SR-036	0-7 dias	0,23	0,31	0,55	0,43	0,68
LIBCOV_SR-037	8-14 dias	0,94	0,26	0,99	0,54	1,07
LIBCOV_SR-039	8-14 dias	2,12	0,52	2,31	1,46	1,45
LIBCOV_SR-044	8-14 dias	5,35	5,51	5,49	14,93	5,67
LIBCOV_SR-048	0-7 dias	0,25	0,39	0,21	0,31	0,29
LIBCOV_SR-049	8-14 dias	6,23	6,42	4,47	17,03	3,15
LIBCOV_SR-050	0-7 dias	0,25	0,09	0,17	0,29	0,22

LIBCOV_SR-052	15-21 dias	6,09	6,55	3,97	17,36	3,01
LIBCOV_SR-053	0-7 dias	0,26	0,13	0,20	0,30	0,29
LIBCOV_SR-054	8-14 dias	0,33	0,07	0,29	0,26	0,31
LIBCOV_SR-055	8-14 dias	0,71	0,08	0,31	0,28	0,24
LIBCOV_SR-057	0-7 dias	0,26	0,09	0,20	0,34	0,21
LIBCOV_SR-059	8-14 dias	1,86	0,09	1,46	0,41	0,53
LIBCOV_SR-060	8-14 dias	2,79	0,14	2,78	0,53	0,76
LIBCOV_SR-061	8-14 dias	0,70	0,02	0,16	0,35	0,54
LIBCOV_SR-062	8-14 dias	2,28	0,44	3,72	1,36	1,70
LIBCOV_SR-063	15-21 dias	6,50	6,34	2,87	16,27	4,02
LIBCOV_SR-064	0-7 dias	0,23	0,06	0,16	0,44	0,45
LIBCOV_SR-065	0-7 dias	0,22	0,06	0,13	0,28	0,79
LIBCOV_SR-066	0-7 dias	0,22	0,08	0,16	0,23	0,66
LIBCOV_SR-068	0-7 dias	0,26	0,06	0,16	0,53	0,16
LIBCOV_SR-069	0-7 dias	0,21	0,05	0,24	0,36	0,53
LIBCOV_SR-070	0-7 dias	0,25	0,07	0,16	0,31	0,34
LIBCOV_SR-071	0-7 dias	0,54	0,05	0,13	0,46	0,34
LIBCOV_SR-072	0-7 dias	0,81	0,07	0,17	0,38	0,29
LIBCOV_SR-073	0-7 dias	1,08	0,07	0,13	0,49	0,42
LIBCOV_SR-074	0-7 dias	1,18	0,1	0,27	0,41	1,46
LIBCOV_SR-075	8-14 dias	1,95	0,12	1,04	0,54	1,72
LIBCOV_SR-076	0-7 dias	1,65	0,07	0,18	0,52	0,80
LIBCOV_SR-077	0-7 dias	2,33	0,06	0,26	0,64	1,75
LIBCOV_SR-078	8-14 dias	0,23	0,07	0,63	0,68	0,23
LIBCOV_SR-079	8-14 dias	0,27	0,08	0,54	0,77	0,70
LIBCOV_SR-080	0-7 dias	0,21	0,08	0,35	0,41	0,71
LIBCOV_SR-081	8-14 dias	3,29	0,28	4,70	1,28	3,11
LIBCOV_SR-082	0-7 dias	0,20	0,09	0,25	0,71	0,48
LIBCOV_SR-083	0-7 dias	0,22	0,07	0,13	0,36	0,45
LIBCOV_SR-084	0-7 dias	0,22	0,08	0,30	0,31	0,57
LIBCOV_SR-085	0-7 dias	0,33	0,06	1,89	0,46	0,79
LIBCOV_SR-086	0-7 dias	0,22	0,09	1,14	0,52	0,73
LIBCOV_SR-087	0-7 dias	2,81	0,15	7,88	0,65	1,20
LIBCOV_SR-088	8-14 dias	0,25	0,14	0,21	0,87	1,94
LIBCOV_SR-089	0-7 dias	2,15	0,26	11,82	1,15	3,63
LIBCOV_SR-090	8-14 dias	0,88	0,24	1,15	1,41	2,93
LIBCOV_SR-091	0-7 dias	0,22	0,1	1,44	0,63	0,74
LIBCOV_SR-092	8-14 dias	2,09	0,78	3,25	3,84	4,26
LIBCOV_SR-093	8-14 dias	2,26	1,92	6,20	9,03	5,49
LIBCOV_SR-094	8-14 dias	0,56	0,11	1,30	0,72	0,92
LIBCOV_SR-095	8-14 dias	1,75	0,19	5,71	1,90	1,18
LIBCOV_SR-096	0-7 dias	0,23	0,13	3,28	0,67	2,81
LIBCOV_SR-097	8-14 dias	4,23	6,29	7,64	13,72	5,78
LIBCOV_SR-098	22-mais dias	1,32	0,94	10,30	3,40	1,17

LIBCOV_SR-100	0-7 dias	0,20	0,04	0,39	0,31	1,54
LIBCOV_SR-101	0-7 dias	0,22	0,02	0,19	0,36	1,19
LIBCOV_SR-103	8-14 dias	0,23	0,1	0,49	0,19	1,07
LIBCOV_SR-104	8-14 dias	0,22	0,03	0,07	0,48	0,81
LIBCOV_SR-105	8-14 dias	0,24	0,1	0,12	0,70	1,24
LIBCOV_SR-106	0-7 dias	0,25	0,03	0,13	0,74	0,84
LIBCOV_SR-107	8-14 dias	2,03	0,06	0,98	0,32	0,55
LIBCOV_SR-108	0-7 dias	0,23	0,07	0,47	0,20	0,64
LIBCOV_SR-109	8-14 dias	0,38	0,08	0,15	0,48	0,88
LIBCOV_SR-110	0-7 dias	0,76	0,08	2,77	0,33	0,61
LIBCOV_SR-111	8-14 dias	2,78	0,32	1,30	0,48	0,64
LIBCOV_SR-112	8-14 dias	0,30	0,07	0,16	0,59	0,82
LIBCOV_SR-113	0-7 dias	0,25	0,1	0,05	0,35	0,41
LIBCOV_SR-114	8-14 dias	2,08	0,5	1,35	0,61	0,64
LIBCOV_SR-115	0-7 dias	0,24	0,08	0,05	0,48	0,47
LIBCOV_SR-116	0-7 dias	0,20	0,07	0,07	0,48	0,71
LIBCOV_SR-117	8-14 dias	2,56	2,72	13,08	4,36	3,06
LIBCOV_SR-118	0-7 dias	2,59	0,23	8,06	0,92	1,39
LIBCOV_SR-119	15-21 dias	4,00	3,44	15,75	11,03	2,21
LIBCOV_SR-120	8-14 dias	0,81	0,24	0,18	1,09	1,17
LIBCOV_SR-121	0-7 dias	0,24	0,01	0,05	0,32	0,77
LIBCOV_SR-122	8-14 dias	0,21	0,09	0,08	0,33	0,41
LIBCOV_SR-123	15-21 dias	4,47	4,08	17,04	11,16	2,33
LIBCOV_SR-124	8-14 dias	1,00	0,29	0,23	1,06	1,27
LIBCOV_SR-125	0-7 dias	3,57	0,72	5,85	1,64	1,33
LIBCOV_SR-126	0-7 dias	0,25	0,08	0,06	0,34	0,61
LIBCOV_SR-127	8-14 dias	0,24	0,08	0,32	0,38	0,47
LIBCOV_SR-128	8-14 dias	5,03	1,06	5,65	4,72	1,26
LIBCOV_SR-130	8-14 dias	0,22	0,09	1,50	0,38	0,31
LIBCOV_SR-131	8-14 dias	0,28	0,14	4,73	0,47	0,71
LIBCOV_SR-133	15-21 dias	2,97	3,93	13,66	10,31	3,28
LIBCOV_SR-135	8-14 dias	0,32	0,2	0,38	0,35	0,81
LIBCOV_SR-138	0-7 dias	0,22	0,19	0,06	0,16	0,35
LIBCOV_SR-139	0-7 dias	2,77	3,08	1,99	7,09	2,79
LIBCOV_SR-140	8-14 dias	1,68	0,47	8,29	2,32	1,64
LIBCOV_SR-142	8-14 dias	4,86	5,91	16,25	16,02	3,94
LIBCOV_SR-143	8-14 dias	5,38	7,58	7,47	18,25	4,96
LIBCOV_SR-144	8-14 dias	3,45	1,47	17,73	4,23	4,17
LIBCOV_SR-145	8-14 dias	5,51	5,32	15,68	16,80	3,60
LIBCOV_SR-146	0-7 dias	6,39	8,85	7,49	19,17	10,40
LIBCOV_SR-147	8-14 dias	5,37	6,56	16,37	16,79	2,24
LIBCOV_SR-149	22-mais dias	2,08	1,32	3,07	1,38	1,35
LIBCOV_SR-150	8-14 dias	1,23	0,45	0,29	2,82	1,45
LIBCOV_SR-151	8-14 dias	0,27	0,23	0,11	0,52	0,91

LIBCOV_SR-152	8-14 dias	2,34	0,66	6,26	1,08	1,28
LIBCOV_SR-153	0-7 dias	1,85	0,31	0,13	0,79	2,56
LIBCOV_SR-154	0-7 dias	0,27	0,08	0,59	0,41	1,03
LIBCOV_SR-155	0-7 dias	0,25	0,04	0,07	0,41	2,72
LIBCOV_SR-156	8-14 dias	0,36	0,44	0,22	0,60	1,21
LIBCOV_SR-157	8-14 dias	2,42	1,79	7,64	4,23	2,27
LIBCOV_SR-158	0-7 dias	2,10	0,92	0,27	2,46	2,40
LIBCOV_SR-159	8-14 dias	1,86	3,58	0,74	12,43	3,93
LIBCOV_SR-160	0-7 dias	1,03	0,17	4,81	0,57	2,78
LIBCOV_SR-161	8-14 dias	1,99	0,95	0,36	1,53	1,77
LIBCOV_SR-162	0-7 dias	0,28	0,05	0,07	0,39	2,01
LIBCOV_SR-163	0-7 dias	3,55	2,34	0,39	4,70	4,63
LIBCOV_SR-164	8-14 dias	3,90	4,21	8,40	7,50	2,34
LIBCOV_SR-165	0-7 dias	0,30	0,04	0,10	0,45	3,37
LIBCOV_SR-166	0-7 dias	4,38	4,02	0,45	9,34	6,13
LIBCOV_SR-167	0-7 dias	0,25	0,09	0,08	0,35	0,65
LIBCOV_SR-168	8-14 dias	4,26	5,11	6,60	11,04	3,65
LIBCOV_SR-169	8-14 dias	2,50	4,91	1,34	13,75	5,27
LIBCOV_SR-170	8-14 dias	1,11	0,41	1,71	0,75	0,42
LIBCOV_SR-171	15-21 dias	5,45	6,93	6,81	13,56	4,37
LIBCOV_SR-172	0-7 dias	2,17	0,14	0,40	0,99	5,78
LIBCOV_SR-173	8-14 dias	5,22	6,56	0,65	5,88	3,48
LIBCOV_SR-174	0-7 dias	2,01	0,27	1,14	1,40	5,06
LIBCOV_SR-175	0-7 dias	0,27	0,16	0,11	0,36	0,91
LIBCOV_SR-176	8-14 dias	2,61	3,94	4,34	1,93	1,97
LIBCOV_SR-177	0-7 dias	0,41	0,35	0,39	0,51	0,38
LIBCOV_SR-178	15-21 dias	1,29	0,65	0,95	0,86	1,82
LIBCOV_SR-180	0-7 dias	0,22	0,06	0,08	0,23	0,25
LIBCOV_SR-182	22-mais dias	8,63	10,22	0,15	12,78	0,66
LIBCOV_SR-183	22-mais dias	2,63	0,99	0,74	0,69	1,88
LIBCOV_SR-184	0-7 dias	0,46	0,34	0,12	0,40	1,04
LIBCOV_SR-186	8-14 dias	2,63	0,92	0,24	1,02	2,00
LIBCOV_SR-188	15-21 dias	7,68	8,89	20,14	10,37	2,03
LIBCOV_SR-191	0-7 dias	0,21	0,06	0,05	0,44	0,37
LIBCOV_SR-192	22-mais dias	5,88	5,35	9,07	3,45	2,94
LIBCOV_SR-195	0-7 dias	0,32	3,76	0,03	0,39	0,13
LIBCOV_SR-196	8-14 dias	0,21	3,59	0,13	0,39	1,01
LIBCOV_SR-197	0-7 dias	0,37	4,41	0,06	0,45	0,28
LIBCOV_SR-200	0-7 dias	0,24	3,48	0,04	0,32	0,21
LIBCOV_SR-201	0-7 dias	6,31	6,48	9,97	11,20	2,64
LIBCOV_SR-202	0-7 dias	6,78	6,66	9,24	10,76	2,20
LIBCOV_SR-203	0-7 dias	1,00	4,1	2,03	0,48	0,85
LIBCOV_SR-204	0-7 dias	0,22	3,3	0,13	0,34	0,39
LIBCOV_SR-205	0-7 dias	0,25	3,79	0,05	0,34	0,08

LIBCOV_SR-206	0-7 dias	0,31	2,1	0,09	0,34	0,63
LIBCOV_SR-207	0-7 dias	0,81	1,4	0,21	0,48	0,17
LIBCOV_SR-208	8-14 dias	0,26	0,65	0,16	0,45	0,58
LIBCOV_SR-209	0-7 dias	1,39	0,6	1,71	0,71	1,23
LIBCOV_SR-211	0-7 dias	0,49	0,72	0,43	0,52	0,92
LIBCOV_SR-212	15-21 dias	5,50	6,48	5,24	3,34	1,32
LIBCOV_SR-213	0-7 dias	0,25	1,94	0,06	0,25	0,27
LIBCOV_SR-215	8-14 dias	0,54	0,01	0,16	0,82	-
LIBCOV_SR-216	0-7 dias	0,27	0,05	0,06	0,34	0,13
LIBCOV_SR-217	0-7 dias	7,17	7,35	7,64	9,21	1,82
LIBCOV_SR-220	0-7 dias	0,29	0,07	0,05	0,34	0,17
LIBCOV_SR-221	0-7 dias	6,88	7,72	7,33	13,14	2,52
LIBCOV_SR-224	0-7 dias	1,06	0,19	0,99	0,57	1,13
LIBCOV_SR-225	0-7 dias	0,27	0,07	0,08	0,35	0,71
LIBCOV_SR-226	0-7 dias	0,95	0,23	1,05	0,79	1,49
LIBCOV_SR-228	0-7 dias	0,73	0,09	0,18	0,41	0,17
LIBCOV_SR-229	0-7 dias	1,90	0,44	1,59	1,08	1,21
LIBCOV_SR-230	8-14 dias	0,49	0,07	0,29	0,57	2,21
LIBCOV_SR-231	0-7 dias	2,65	0,68	11,54	1,02	2,78
LIBCOV_SR-232	0-7 dias	0,31	0,16	0,13	0,41	0,36
LIBCOV_SR-233	8-14 dias	1,65	0,1	2,11	0,29	0,56
LIBCOV_SR-235	0-7 dias	0,37	0,09	0,10	0,64	0,17
LIBCOV_SR-236	8-14 dias	3,13	1,22	9,25	1,55	3,78
LIBCOV_SR-237	0-7 dias	2,25	0,56	1,66	1,19	2,06
LIBCOV_SR-238	0-7 dias	2,13	0,74	2,10	1,29	2,39
LIBCOV_SR-239	8-14 dias	0,78	0,29	6,51	0,42	0,17
LIBCOV_SR-240	0-7 dias	0,51	0,11	0,18	0,43	0,57
LIBCOV_SR-242	0-7 dias	6,30	0,2	0,11	10,17	3,82
LIBCOV_SR-245	15-21 dias	8,31	6,48	8,01	18,37	2,46
LIBCOV_SR-247	22-mais dias	6,64	8,58	15,82	9,50	1,39
LIBCOV_SR-248	15-21 dias	6,43	6,86	6,72	7,73	2,95
LIBCOV_SR-250	15-21 dias	7,74	7,73	15,52	16,85	1,82
LIBCOV_SR-251	8-14 dias	5,80	6,23	7,03	11,13	3,30
LIBCOV_SR-258	0-7 dias	0,27	0,05	0,04	0,31	0,13
LIBCOV_SR-259	0-7 dias	2,07	2,11	0,36	2,64	1,15
LIBCOV_SR-262	8-14 dias	1,45	0,19	0,87	0,91	1,64
LIBCOV_SR-263	0-7 dias	0,29	0,11	0,20	0,31	0,19
LIBCOV_SR-266	8-14 dias	4,02	3,56	4,76	6,22	3,38
LIBCOV_SR-268	0-7 dias	0,21	0,09	0,19	0,28	0,76
LIBCOV_SR-270	0-7 dias	1,06	0,19	4,50	0,86	4,15
LIBCOV_SR-271	0-7 dias	0,34	0,15	0,18	0,45	0,73
LIBCOV_SR-272	0-7 dias	3,26	0,39	3,63	0,49	1,07
LIBCOV_SR-273	15-21 dias	3,66	0,6	5,66	0,75	1,31
LIBCOV_SR-274	0-7 dias	0,53	0,11	0,60	0,54	0,89

LIBCOV_SR-275	15-21 dias	3,07	1,36	8,06	1,00	1,07
LIBCOV_SR-276	0-7 dias	0,24	0,04	0,05	0,43	0,25
LIBCOV_SR-277	0-7 dias	0,35	0,08	0,16	0,48	0,63
LIBCOV_SR-280	15-21 dias	0,23	0,03	0,68	0,22	0,26
LIBCOV_SR-281	0-7 dias	0,26	0,08	0,09	0,23	0,44
LIBCOV_SR-283	0-7 dias	5,58	6,65	17,72	12,95	5,31
LIBCOV_SR-285	8-14 dias	0,66	0,33	0,74	0,59	0,36
LIBCOV_SR-289	8-14 dias	0,20	0,06	0,06	0,24	0,07
LIBCOV_SR-291	8-14 dias	0,24	0,05	7,95	0,31	0,32
LIBCOV_SR-292	8-14 dias	0,27	0,07	15,45	0,35	0,50
LIBCOV_SR-295	0-7 dias	3,28	1,88	0,10	1,06	0,84
LIBCOV_SR-302	22-mais dias	0,27	0,05	0,15	0,34	0,13
LIBCOV_SR-303	22-mais dias	0,25	0,02	0,07	0,17	0,23
LIBCOV_SR-304	22-mais dias	7,14	9,48	3,41	16,26	1,53
LIBCOV_SR-305	15-21 dias	6,93	9,5	4,06	19,80	1,78
LIBCOV_SR-306	22-mais dias	6,79	9,48	3,60	16,67	1,26
LIBCOV_SR-307	15-21 dias	6,07	7,84	2,50	12,85	1,88
LIBCOV_SR-308	8-14 dias	6,36	7,64	3,54	11,07	3,74
LIBCOV_SR-309	15-21 dias	6,58	7,64	3,57	10,97	2,64
LIBCOV_SR-310	8-14 dias	6,37	5,81	3,45	9,54	3,99
LIBCOV_SR-311	8-14 dias	1,73	0,31	8,66	0,63	1,81
LIBCOV_SR-312	8-14 dias	2,84	1,16	12,52	1,15	2,02
LIBCOV_SR-313	22-mais dias	0,90	0,11	0,17	0,29	0,67
LIBCOV_SR-314	22-mais dias	2,74	0,94	11,38	1,10	1,82
LIBCOV_SR-319	22-mais dias	7,07	9,3	0,20	9,21	0,47
LIBCOV_SR-320	22-mais dias	7,36	9,89	0,17	5,85	0,35
LIBCOV_SR-321	22-mais dias	7,48	10,43	0,20	8,87	0,64
LIBCOV_SR-322	22-mais dias	7,58	9,8	0,19	8,86	0,47
LIBCOV_SR-323	22-mais dias	7,46	8,91	6,57	11,21	2,04
LIBCOV_SR-324	22-mais dias	7,67	10,39	5,92	11,62	1,79
LIBCOV_SR-325	22-mais dias	7,32	10,77	7,15	19,22	1,79
LIBCOV_SR-326	0-7 dias	7,55	10,04	1,10	18,38	0,88
LIBCOV_SR-327	0-7 dias	7,86	9,89	1,07	18,75	1,03
LIBCOV_SR-331	0-7 dias	2,21	0,05	0,10	0,45	0,36
LIBCOV_SR-332	8-14 dias	4,38	3,08	1,11	3,29	0,77
LIBCOV_SR-349	8-14 dias	2,20	0,82	1,21	2,58	1,83
LIBCOV_SR-350	22-mais dias	6,33	6,94	0,53	6,54	1,04
LIBCOV_SR-351	0-7 dias	0,76	0,46	3,25	0,89	1,71
LIBCOV_SR-353	0-7 dias	6,09	7,96	4,84	15,16	3,37
LIBCOV_SR-358	0-7 dias	1,24	0,07	0,13	0,38	0,35
LIBCOV_SR-359	0-7 dias	0,31	0,06	0,06	0,41	0,13
LIBCOV_SR-362	15-21 dias	0,24	0,02	0,11	0,25	0,19
LIBCOV_SR-367	22-mais dias	0,25	0,05	0,50	0,31	0,33
LIBCOV_SR-368	22-mais dias	6,66	9,63	0,47	20,08	1,69

LIBCOV_SR-369	22-mais dias	6,05	6,44	0,40	5,93	1,20
LIBCOV_SR-370	22-mais dias	5,78	5,92	0,38	4,31	0,65
LIBCOV_SR-371	22-mais dias	5,75	6,13	0,38	6,74	1,16
LIBCOV_SR-372	0-7 dias	5,71	5,42	0,30	4,71	0,83
LIBCOV_SR-373	22-mais dias	5,58	6,35	0,48	6,06	0,76
LIBCOV_SR-386	0-7 dias	1,25	0,29	2,29	0,55	1,36
HEMOBA-2542	-	-	-	-	0,14	0,69
HEMOBA-2543	-	-	-	-	0,61	0,23
HEMOBA-2544	-	-	-	-	0,03	0,10
HEMOBA-2545	-	-	-	-	0,24	0,67
HEMOBA-2546	-	-	-	-	0,14	0,40
HEMOBA-2547	-	-	-	-	0,11	0,68
HEMOBA-2548	-	-	-	-	0,22	0,16
HEMOBA-2549	-	-	-	-	0,1	0,59
HEMOBA-2550	-	-	-	-	0,08	0,18
HEMOBA-2551	-	-	-	-	0,29	0,28
HEMOBA-2552	-	-	-	-	0,22	0,17
HEMOBA-2553	-	-	-	-	0,45	0,45
HEMOBA-2554	-	-	-	-	0,03	0,29
HEMOBA-2555	-	-	-	-	0,08	0,14
HEMOBA-2556	-	-	-	-	0,02	0,14
HEMOBA-2557	-	-	-	-	-0,07	0,29
HEMOBA-2558	-	-	-	-	0	0,24
HEMOBA-2559	-	-	-	-	0,18	0,62
HEMOBA-2560	-	-	-	-	0,33	0,70
HEMOBA-2561	-	-	-	-	0,1	0,71
HEMOBA-2562	-	-	-	-	-0,03	0,10
HEMOBA-2563	-	-	-	-	-0,01	0,13
HEMOBA-2564	-	-	-	-	0,02	0,57
HEMOBA-2565	-	-	-	-	0,06	0,21
HEMOBA-2566	-	-	-	-	0,23	0,14
HEMOBA-2567	-	-	-	-	0,01	0,35
HEMOBA-2568	-	-	-	-	0,09	0,19
HEMOBA-2569	-	-	-	-	0,05	0,18
HEMOBA-2570	-	-	-	-	0,07	0,20
HEMOBA-2571	-	-	-	-	0,18	0,49
HEMOBA-2572	-	-	-	-	-0,03	0,12
HEMOBA-2573	-	-	-	-	0	0,77
HEMOBA-2574	-	-	-	-	0,1	0,40
HEMOBA-2575	-	-	-	-	0,26	0,34
HEMOBA-2576	-	-	-	-	0,22	0,36
HEMOBA-2577	-	-	-	-	0,58	0,22
HEMOBA-2578	-	-	-	-	0,04	0,70
HEMOBA-2579	-	-	-	-	-0,02	0,65

HEMOBA-2580	-	-	-	-	0,06	0,62
HEMOBA-2581	-	-	-	-	0,16	0,30
HEMOBA-2582	-	-	-	-	0,06	0,45
HEMOBA-2583	-	-	-	-	0,18	0,22
HEMOBA-2584	-	-	-	-	0,38	0,46
HEMOBA-2585	-	-	-	-	0,04	0,32
HEMOBA-2586	-	-	-	-	-0,1	0,03
HEMOBA-2587	-	-	-	-	-0,02	0,77
HEMOBA-2588	-	-	-	-	0,21	0,42
HEMOBA-2589	-	-	-	-	0	0,38
HEMOBA-2590	-	-	-	-	0,12	0,33
HEMOBA-2591	-	-	-	-	0,06	0,29
HEMOBA-2592	-	-	-	-	0,16	0,20
HEMOBA-2593	-	-	-	-	0,27	0,50
HEMOBA-2594	-	-	-	-	0,02	0,57
HEMOBA-2595	-	-	-	-	0,28	0,78
HEMOBA-2623	-	0,27	0,07	0,08	0,55	0,51
HEMOBA-2624	-	0,28	0,08	0,12	0,35	0,62
HEMOBA-2625	-	0,29	0,13	0,16	0,43	0,42
HEMOBA-2626	-	0,23	0,09	0,12	0,46	0,37
HEMOBA-2627	-	0,23	0,14	0,29	0,46	0,16
HEMOBA-2628	-	0,23	0,1	0,14	0,15	0,51
HEMOBA-2629	-	0,24	0,08	0,11	0,17	0,26
HEMOBA-2630	-	0,25	0,09	0,17	0,42	0,54
HEMOBA-2631	-	0,22	0,07	0,04	0,16	0,20
HEMOBA-2632	-	0,32	0,15	0,16	0,34	0,46
HEMOBA-2633	-	0,26	0,11	0,07	0,21	0,48
HEMOBA-2634	-	0,24	0,1	0,2	0,49	0,43
HEMOBA-2635	-	0,23	0,09	0,16	0,17	0,66
HEMOBA-2636	-	0,23	0,13	0,18	0,16	0,35
HEMOBA-2637	-	0,31	0,1	0,12	0,29	0,16
HEMOBA-2638	-	0,28	0,16	0,54	1,36	0,73
HEMOBA-2639	-	0,24	0,09	0,13	0,69	0,39
HEMOBA-2640	-	0,23	0,13	0,05	0,16	0,34
HEMOBA-2641	-	0,22	0,11	3,27	0,20	0,55
HEMOBA-2642	-	0,29	0,1	0,04	0,17	0,19
HEMOBA-2643	-	0,24	0,12	0,16	0,28	0,17
HEMOBA-2644	-	0,23	0,1	1,09	0,23	0,85
HEMOBA-2645	-	0,23	0,17	0,72	0,49	0,66
HEMOBA-2646	-	0,23	0,08	0,22	0,26	0,47
HEMOBA-2647	-	0,21	0,08	0,2	0,28	0,88
HEMOBA-2648	-	0,25	0,08	0,29	0,30	1,21
HEMOBA-2649	-	0,28	0,1	0,12	0,31	0,52
HEMOBA-2650	-	0,23	0,09	0,18	0,14	0,27

HEMOBA-2651	-	0,23	0,12	0,21	0,31	0,75
HEMOBA-2652	-	0,24	0,18	0,59	0,49	0,11
HEMOBA-2653	-	0,22	0,13	0,57	0,20	0,11
HEMOBA-2654	-	0,22	0,1	0,36	0,31	1,14
HEMOBA-2655	-	0,21	0,08	0,11	0,53	0,46
HEMOBA-2656	-	0,27	0,24	0,06	0,31	0,21
HEMOBA-2657	-	0,23	0,07	0,53	0,08	0,47
HEMOBA-2658	-	0,23	0,15	0,8	0,22	0,30
HEMOBA-2659	-	0,27	0,13	0,35	0,69	1,61
HEMOBA-2660	-	0,23	0,11	0,21	0,46	0,39
HEMOBA-2661	-	0,20	0,09	0,1	0,19	0,99
HEMOBA-2662	-	0,24	0,12	0,12	0,24	0,60
HEMOBA-2663	-	-	-	-	0,78	1,93
HEMOBA-2664	-	-	-	-	0,81	0,09
HEMOBA-2665	-	0,26	0,08	0,37	0,26	0,40
HEMOBA-2666	-	0,24	0,36	0,12	0,45	1,32
HEMOBA-2667	-	0,24	0,09	0,15	0,24	0,52
HEMOBA-2668	-	0,23	0,14	0,15	0,64	0,32
HEMOBA-2669	-	0,22	0,14	0,32	0,54	0,67
HEMOBA-2670	-	0,34	0,15	0,15	0,24	0,22
HEMOBA-2671	-	0,22	0,12	0,15	0,17	0,56
HEMOBA-2672	-	0,26	0,09	0,21	0,53	0,29
HEMOBA-2673	-	0,22	0,08	0,32	0,29	0,52
HEMOBA-2674	-	0,22	0,11	0,09	0,14	1,09
HEMOBA-2675	-	0,21	0,1	0,25	0,14	1,08
HEMOBA-2676	-	0,21	0,08	0,38	0,11	0,47
HEMOBA-2677	-	0,20	0,12	0,26	0,37	0,90
HEMOBA-2678	-	0,22	0,12	0,23	0,21	0,11
HEMOBA-2679	-	0,23	0,27	0,3	0,44	0,82
HEMOBA-2680	-	0,22	0,12	0,08	0,20	0,01
HEMOBA-2681	-	0,26	0,1	0,09	0,22	0,68
HEMOBA-2682	-	0,23	0,14	0,18	0,12	0,53
HEMOBA-2683	-	0,22	0,07	2,69	0,63	0,41
HEMOBA-2684	-	0,23	0,08	0,08	0,79	0,37
HEMOBA-2685	-	0,24	0,11	0,25	0,20	0,68
HEMOBA-2686	-	0,23	0,14	0,52	0,35	0,82
HEMOBA-2687	-	0,18	0,12	0,2	0,70	0,42
HEMOBA-2688	-	0,23	0,07	0,12	0,15	0,25
HEMOBA-2689	-	0,25	0,12	0,27	0,45	0,88
HEMOBA-2690	-	0,22	0,09	0,19	0,33	0,17
HEMOBA-2691	-	0,22	0,07	0,54	0,14	0,33
HEMOBA-2692	-	0,26	0,2	0,15	0,17	0,88
HEMOBA-2693	-	0,21	0,07	0,04	0,13	0,64
HEMOBA-2694	-	0,25	0,15	0,08	0,27	0,16

HEMOBA-2695	-	0,23	0,13	0,18	0,18	0,91
HEMOBA-2696	-	0,23	0,13	0,08	0,71	0,56
HEMOBA-2697	-	0,23	0,12	0,35	0,67	0,81
HEMOBA-2698	-	0,54	0,08	0,12	0,13	0,60
HEMOBA-2699	-	0,25	0,12	0,3	0,24	0,94
HEMOBA-2700	-	0,24	0,1	0,15	0,30	0,60
HEMOBA-2701	-	0,27	0,09	0,07	0,28	0,18
HEMOBA-2702	-	1,37	0,16	0,2	0,57	0,57
HEMOBA-2703	-	0,26	0,11	1,06	0,14	0,57
HEMOBA-2704	-	0,22	0,09	0,21	0,16	0,44
HEMOBA-2705	-	0,25	0,1	0,04	0,17	0,25
HEMOBA-2706	-	0,27	0,21	0,03	1,29	0,36
HEMOBA-2707	-	0,27	0,08	0,15	0,23	0,63
HEMOBA-2708	-	0,23	0,08	0,18	0,26	0,78
HEMOBA-2709	-	0,23	0,1	0,4	0,47	0,62
HEMOBA-2710	-	0,23	0,11	0,26	0,25	0,28
HEMOBA-2711	-	0,22	0,08	0,78	0,44	1,01
HEMOBA-2712	-	0,17	0,07	0,37	0,45	0,37
HEMOBA-2713	-	0,23	0,11	0,06	0,43	0,59
HEMOBA-2714	-	0,24	0,09	0,11	0,16	0,27
HEMOBA-2715	-	0,30	0,05	2,33	0,27	0,72
HEMOBA-2716	-	0,24	0,13	0,11	0,78	0,21
HEMOBA-2717	-	0,23	0,08	0,20	0,31	0,40
HEMOBA-2718	-	0,22	0,05	0,28	0,20	0,35
HEMOBA-2719	-	0,24	0,27	0,23	0,21	0,46
HEMOBA-2720	-	0,17	0,07	0,28	0,23	0,44
HEMOBA-2721	-	0,24	0,06	0,22	0,15	0,31
HEMOBA-2722	-	0,23	0,07	0,07	0,16	0,20
HEMOBA-2723	-	0,23	0,13	2,40	0,56	1,23
HEMOBA-2724	-	0,24	0,10	0,22	0,52	0,38
HEMOBA-2725	-	0,24	0,11	0,13	0,54	0,10
HEMOBA-2726	-	0,22	0,16	0,84	0,79	1,38
HEMOBA-2727	-	0,21	0,07	0,26	0,32	0,35
HEMOBA-2728	-	0,22	0,05	0,14	0,51	0,25
HEMOBA-2729	-	0,22	0,07	0,19	0,34	1,03
HEMOBA-2730	-	0,24	0,10	0,05	0,47	0,49
HEMOBA-2731	-	0,23	0,05	0,09	0,25	0,57
HEMOBA-2732	-	0,23	0,06	0,06	0,37	0,29
HEMOBA-2733	-	0,22	0,06	0,07	0,26	0,21
HEMOBA-2734	-	0,24	0,09	0,48	0,52	0,60
HEMOBA-2735	-	0,24	0,11	0,14	0,92	0,66
HEMOBA-2736	-	0,24	0,08	0,08	0,64	0,53
HEMOBA-2737	-	0,20	0,06	0,11	0,19	0,66
HEMOBA-2738	-	0,23	0,09	0,15	0,69	1,38

HEMOBA-2739	-	0,19	0,10	0,09	0,67	0,45
HEMOBA-2740	-	0,21	0,08	0,05	0,21	0,39
HEMOBA-2741	-	0,21	0,06	0,07	0,45	0,74
HEMOBA-2742	-	0,20	0,05	0,11	0,35	0,53
HEMOBA-2743	-	0,21	0,07	0,05	0,22	0,40
HEMOBA-2785	-	0,31	0,10	0,04	0,78	0,42
HEMOBA-2786	-	0,28	0,07	0,08	0,13	0,64
HEMOBA-2787	-	0,24	0,08	0,15	0,03	1,32
HEMOBA-2788	-	0,23	0,05	0,07	0,02	0,75
HEMOBA-2789	-	0,24	0,15	0,15	0,15	0,74
HEMOBA-2790	-	0,27	0,07	0,06	0,04	0,47
HEMOBA-2791	-	0,31	0,22	0,07	0,12	0,53
HEMOBA-2792	-	0,38	0,10	0,11	0,25	1,44
HEMOBA-2793	-	0,32	0,13	0,11	0,28	0,61
HEMOBA-2794	-	0,24	0,06	0,13	0,21	0,76
HEMOBA-2795	-	0,25	0,08	0,16	0,05	0,77
HEMOBA-2796	-	0,24	0,05	0,08	0,04	0,55
HEMOBA-2797	-	0,26	0,14	0,11	0,08	0,76
HEMOBA-2798	-	0,24	0,12	0,33	0,04	0,61
HEMOBA-2799	-	0,24	0,08	0,09	0,03	0,70
HEMOBA-2800	-	0,28	0,09	0,05	0,09	0,66
HEMOBA-2801	-	0,23	0,06	0,05	0,08	0,54
HEMOBA-2802	-	0,23	0,05	0,41	0,05	0,63
HEMOBA-2803	-	0,29	0,08	0,13	0,04	0,75
HEMOBA-2804	-	0,25	0,55	0,29	0,14	1,06
HEMOBA-2805	-	0,45	0,24	0,31	0,14	1,33
HEMOBA-2806	-	0,24	0,07	0,06	0,03	0,80
HEMOBA-2807	-	0,21	0,08	0,11	0,06	0,39
HEMOBA-2808	-	0,24	0,09	0,20	0,01	0,58
HEMOBA-2809	-	0,26	0,55	0,18	0,23	0,52
HEMOBA-2810	-	0,27	0,07	0,08	0,13	0,29
HEMOBA-2811	-	0,28	0,06	0,53	0,01	0,83
HEMOBA-2812	-	0,23	0,09	0,28	0,01	0,93
HEMOBA-2813	-	0,36	0,43	0,28	0,24	0,35
HEMOBA-2814	-	0,22	0,08	0,25	0,01	1,55
HEMOBA-2815	-	0,26	0,08	0,04	0,06	0,11
HEMOBA-2816	-	0,37	0,25	0,32	0,18	0,33
HEMOBA-2817	-	0,47	0,09	0,10	0,09	0,37
HEMOBA-2818	-	0,24	0,05	0,10	0,09	0,17
HEMOBA-2819	-	0,24	0,06	0,22	0,02	0,56
HEMOBA-2820	-	0,23	0,05	0,21	0,05	0,58
HEMOBA-2821	-	0,22	0,04	0,07	0,10	0,26
HEMOBA-2822	-	0,26	0,09	0,05	0,04	0,30
HEMOBA-2823	-	0,24	0,13	0,15	0,13	1,11

HEMOBA-2824	-	0,26	0,12	0,12	0,10	0,56
HEMOBA-2825	-	0,31	-	-	0,09	0,40
HEMOBA-2826	-	-	-	-	0,33	0,28
HEMOBA-2827	-	-	-	-	0,11	0,49
HEMOBA-2828	-	-	-	-	0,18	0,29
HEMOBA-2829	-	-	-	-	0,28	0,22
HEMOBA-2830	-	-	-	-	0,14	0,22
HEMOBA-2831	-	-	-	-	0,11	0,17
HEMOBA-2832	-	-	-	-	0,16	0,21
HEMOBA-2833	-	-	-	-	0,18	0,30
HEMOBA-2834	-	-	-	-	0,80	0,38
HEMOBA-2835	-	-	-	-	0,34	0,29
HEMOBA-2836	-	-	-	-	0,22	0,09
HEMOBA-2837	-	-	-	-	0,20	0,38
HEMOBA-2838	-	-	-	-	0,26	0,34
HEMOBA-2839	-	-	-	-	0,13	0,40
HEMOBA-2840	-	-	-	-	0,08	0,25
HEMOBA-2841	-	-	-	-	0,21	0,38
HEMOBA-2842	-	-	-	-	0,31	0,04
HEMOBA-2843	-	-	-	-	0,08	0,21
HEMOBA-2844	-	-	-	-	0,20	0,67
HEMOBA-2845	-	-	-	-	0,25	0,28
HEMOBA-2846	-	-	-	-	0,25	0,15
HEMOBA-2847	-	-	-	-	0,22	0,25
HEMOBA-2848	-	-	-	-	0,28	0,23
HEMOBA-2849	-	-	-	-	0,95	0,15
HEMOBA-2850	-	-	-	-	0,36	0,43
HEMOBA-2851	-	-	-	-	0,13	0,47
HEMOBA-2852	-	-	-	-	0,30	0,49
HEMOBA-2853	-	-	-	-	0,30	0,31
HEMOBA-2854	-	-	-	-	0,41	0,20
HEMOBA-2855	-	0,62	-	-	0,44	0,44
HEMOBA-2856	-	-	-	-	0,40	0,39
HEMOBA-2857	-	-	-	-	0,30	0,23
HEMOBA-2858	-	-	-	-	0,32	0,54
HEMOBA-2859	-	-	-	-	0,14	0,42
HEMOBA-2860	-	-	-	-	0,24	0,15
HEMOBA-2861	-	-	-	-	0,26	0,37
HEMOBA-2862	-	-	-	-	0,47	0,31
HEMOBA-2863	-	-	-	-	0,26	0,28
HEMOBA-2864	-	-	-	-	0,30	0,32
HEMOBA-2865	-	-	-	-	0,25	0,43
HEMOBA-2866	-	-	-	-	0,07	0,25
HEMOBA-2867	-	-	-	-	0,25	0,35

HEMOBA-2868	-	-	-	-	0,21	0,24
HEMOBA-2869	-	-	-	-	0,25	0,39
HEMOBA-2870	-	-	-	-	0,20	0,17
HEMOBA-2871	-	-	-	-	0,37	0,35
HEMOBA-2872	-	-	-	-	0,57	0,09
HEMOBA-2873	-	-	-	-	0,26	0,19
HEMOBA-2874	-	-	-	-	0,18	0,61
HEMOBA-2875	-	-	-	-	0,54	0,46
HEMOBA-2876	-	-	-	-	0,27	0,20
HEMOBA-2877	-	-	-	-	0,27	0,47
HEMOBA-2878	-	-	-	-	0,24	0,14
HEMOBA-2879	-	-	-	-	0,75	0,31
HEMOBA-2880	-	-	-	-	0,26	0,19
HEMOBA-2881	-	-	-	-	0,31	0,58
HEMOBA-2882	-	-	-	-	0,30	0,99
HEMOBA-2883	-	-	-	-	0,30	0,56
HEMOBA-2884	-	-	-	-	0,24	0,38
HEMOBA-2885	-	-	-	-	0,51	0,28
HEMOBA-2886	-	0,28	-	-	0,27	0,68
HEMOBA-2887	-	-	-	-	0,33	0,72
HEMOBA-2888	-	-	-	-	0,76	0,20
HEMOBA-2889	-	-	-	-	0,60	0,48
HEMOBA-2890	-	-	-	-	0,69	0,48
HEMOBA-2891	-	-	-	-	0,46	0,77
HEMOBA-2892	-	-	-	-	0,92	0,09
HEMOBA-2893	-	-	-	-	0,30	0,52
HEMOBA-2894	-	-	-	-	0,54	0,23
HEMOBA-2895	-	-	-	-	1,00	0,46
HEMOBA-2896	-	-	-	-	0,37	0,27
HEMOBA-2897	-	-	-	-	0,81	0,55
HEMOBA-2898	-	-	-	-	0,41	0,50
HEMOBA-2899	-	-	-	-	0,40	0,75
HEMOBA-2900	-	-	-	-	0,37	0,37
HEMOBA-2901	-	-	-	-	0,23	0,12
HEMOBA-2902	-	-	-	-	0,45	0,45
HEMOBA-2903	-	-	-	-	0,85	0,38
HEMOBA-2904	-	-	-	-	0,42	0,75
HEMOBA-2905	-	-	-	-	0,37	0,38
HEMOBA-2906	-	-	-	-	0,24	0,55
HEMOBA-2907	-	-	-	-	0,23	0,23
HEMOBA-2908	-	-	-	-	0,34	0,30
HEMOBA-2909	-	-	-	-	0,18	0,62
HEMOBA-2910	-	-	-	-	0,29	0,87
HEMOBA-2911	-	-	-	-	0,37	0,16

HEMOBA-2912	-	-	-	-	0,77	0,34
HEMOBA-2913	-	-	-	-	0,65	0,55
HEMOBA-2914	-	-	-	-	0,66	0,60
HEMOBA-2915	-	-	-	-	0,30	0,46
HEMOBA-2916	-	-	-	-	0,23	0,20
HEMOBA-2917	-	-	-	-	0,31	0,57
HEMOBA-2918	-	-	-	-	0,28	0,60
HEMOBA-2919	-	-	-	-	0,63	1,15
HEMOBA-2920	-	-	-	-	0,30	0,58
HEMOBA-2921	-	-	-	-	0,33	0,89
HEMOBA-2922	-	-	-	-	0,77	0,69
HEMOBA-2923	-	-	-	-	0,36	0,48
HEMOBA-2924	-	-	-	-	0,54	0,41
HEMOBA-2925	-	-	-	-	0,53	0,65
HEMOBA-2926	-	-	-	-	0,56	0,44
HEMOBA-2927	-	-	-	-	0,31	0,41
HEMOBA-2928	-	-	-	-	0,19	0,35
HEMOBA-2929	-	-	-	-	0,25	0,65
HEMOBA-2930	-	-	-	-	0,77	0,20
HEMOBA-2931	-	-	-	-	0,52	0,96
HEMOBA-2932	-	-	-	-	0,59	0,84
HEMOBA-2933	-	-	-	-	0,56	0,23
HEMOBA-2934	-	-	-	-	0,45	0,23
HEMOBA-2935	-	-	-	-	0,42	0,33
HEMOBA-2936	-	-	-	-	0,17	0,48
HEMOBA-2937	-	-	-	-	0,39	0,34
HEMOBA-2938	-	-	-	-	0,36	0,48
HEMOBA-2939	-	-	-	-	0,42	0,73
HEMOBA-2940	-	-	-	-	0,44	0,48
HEMOBA-2941	-	-	-	-	0,53	0,36
HEMOBA-2942	-	-	-	-	0,43	0,46
HEMOBA-2943	-	-	-	-	0,37	0,16
HEMOBA-2944	-	-	-	-	0,24	0,28
HEMOBA-2945	-	-	-	-	0,48	0,63
HEMOBA-2946	-	-	-	-	0,44	0,22
HEMOBA-2947	-	-	-	-	0,28	0,56
HEMOBA-2948	-	-	-	-	0,14	0,50
HEMOBA-2949	-	-	-	-	0,47	0,60
HEMOBA-2950	-	-	-	-	0,51	0,23
HEMOBA-2951	-	-	-	-	0,59	0,59
HEMOBA-2952	-	-	-	-	0,31	0,70
HEMOBA-2953	-	-	-	-	0,51	0,50
HEMOBA-2954	-	-	-	-	0,59	0,45
HEMOBA-2955	-	-	-	-	0,78	0,66

HEMOBA-2956	-	-	-	-	0,33	0,19
HEMOBA-2957	-	-	-	-	0,58	0,46
HEMOBA-2958	-	-	-	-	0,59	0,26
HEMOBA-2959	-	-	-	-	0,46	0,62
HEMOBA-2960	-	-	-	-	0,67	0,09

Nota: ¹GOLD ELISA COVID-19 IgG+IgM; ²Euroimmun Anti-SARS-CoV-2 IgG ELISA; ³Anti-SARS-CoV-2 NCP ELISA (IgM); ⁴RBD-ELISA IgG; ⁵RBD-ELISA IgM.

Fonte: Elaborada pela autora.

Apêndice B

AMOSTRA	DOENÇA	RBD-ELISA IgG	RBD-ELISA IgM	SOROLOGIA
DEN-01	Dengue	0,60	0,19	NEGATIVO
DEN-02	Dengue	0,72	1,72	NEGATIVO
DEN-03	Dengue	0,73	0,67	NEGATIVO
DEN-04	Dengue	2,04	0,83	POSITIVO
DEN-05	Dengue	0,67	0,48	NEGATIVO
DEN-07	Dengue	0,36	0,16	NEGATIVO
DEN-06	Dengue	0,69	0,45	NEGATIVO
DEN-09	Dengue	0,79	0,21	POSITIVO
DEN-10	Dengue	0,47	0,23	NEGATIVO
DEN-11	Dengue	0,57	0,28	NEGATIVO
DEN-08	Dengue	0,53	0,21	NEGATIVO
DEN-12	Dengue	0,83	0,34	NEGATIVO
DEN-14	Dengue	0,60	0,11	NEGATIVO
DEN-15	Dengue	0,40	0,55	NEGATIVO
DEN-13	Dengue	0,43	0,26	NEGATIVO
DEN-17	Dengue	0,77	0,44	NEGATIVO
DEN-16	Dengue	0,72	0,12	NEGATIVO
DEN-19	Dengue	0,81	0,07	NEGATIVO
DEN-18	Dengue	0,47	0,68	NEGATIVO
DEN-20	Dengue	0,57	0,14	NEGATIVO
HEMOBA-5223	Chagas	0,82	0,09	NEGATIVO
HEMOBA-5240	Chagas	0,63	0,56	NEGATIVO
CHAG-42	Chagas	0,84	0,36	NEGATIVO
CHAG-53	Chagas	0,97	0,19	NEGATIVO
CHAG-54	Chagas	0,46	0,39	NEGATIVO
Fil-06	Filariose	0,61	0,54	NEGATIVO
Fil-11	Filariose	0,35	0,18	NEGATIVO
Fil-12	Filariose	0,47	0,40	NEGATIVO
Fil-13	Filariose	0,57	0,23	NEGATIVO
Fil-16	Filariose	0,38	0,62	NEGATIVO
HBV-02	HBV	0,54	0,81	NEGATIVO
HBV-04	HBV	0,48	0,39	NEGATIVO
HBV-05	HBV	0,34	0,21	NEGATIVO
HBV-06	HBV	0,76	0,16	NEGATIVO
HBV-07	HBV	0,47	0,21	NEGATIVO
HBV-09	HBV	0,57	0,08	NEGATIVO
HBV-10	HBV	0,58	0,15	NEGATIVO
HBV-11	HBV	0,57	0,48	NEGATIVO
HBV-12	HBV	0,85	0,52	NEGATIVO
HBV-13	HBV	0,55	0,13	NEGATIVO
HBV-14	HBV	0,81	0,32	NEGATIVO

HBV-15	HBV	0,54	0,44	NEGATIVO
HBV-16	HBV	0,61	0,55	NEGATIVO
HBV-18	HBV	0,80	0,28	NEGATIVO
HBV-19	HBV	0,68	0,11	NEGATIVO
HBV-20	HBV	0,48	0,79	NEGATIVO
HBV-21	HBV	0,56	0,48	NEGATIVO
HBV-22	HBV	0,68	0,33	NEGATIVO
HBV-23	HBV	0,52	0,40	NEGATIVO
HBV-24	HBV	0,56	0,47	NEGATIVO
HCV-01	HCV	0,46	0,25	NEGATIVO
HCV-03	HCV	0,89	0,46	NEGATIVO
HCV-04	HCV	0,46	0,69	NEGATIVO
HCV-06	HCV	0,72	0,48	NEGATIVO
HCV-07	HCV	0,71	0,49	NEGATIVO
HCV-09	HCV	0,58	0,54	NEGATIVO
HCV-10	HCV	0,73	0,38	NEGATIVO
HCV-11	HCV	0,57	1,03	NEGATIVO
HCV-12	HCV	0,43	0,68	NEGATIVO
HCV-14	HCV	0,52	0,21	NEGATIVO
HCV-16	HCV	0,78	0,46	NEGATIVO
HCV-18	HCV	0,54	0,71	NEGATIVO
HCV-19	HCV	0,77	0,44	NEGATIVO
HCV-20	HCV	0,83	0,61	NEGATIVO
HCV-22	HCV	0,45	0,61	NEGATIVO
HCV-26	HCV	0,39	0,58	NEGATIVO
HCV-27	HCV	0,82	0,30	NEGATIVO
HCV-28	HCV	0,54	0,50	NEGATIVO
HCV-29	HCV	0,50	0,16	NEGATIVO
HCV-30	HCV	0,40	0,26	NEGATIVO
HIV-87	HIV	0,98	0,26	NEGATIVO
HIV-89	HIV	0,76	0,68	NEGATIVO
HIV-92	HIV	0,56	0,40	NEGATIVO
HIV-93	HIV	0,72	0,65	NEGATIVO
HIV-109	HIV	0,33	0,25	NEGATIVO
HIV-110	HIV	0,40	0,29	NEGATIVO
HIV-111	HIV	0,63	0,51	NEGATIVO
HIV-112	HIV	0,93	0,42	NEGATIVO
HIV-113	HIV	0,69	0,40	NEGATIVO
HIV-114	HIV	0,66	0,19	NEGATIVO
HIV-115	HIV	0,70	0,21	NEGATIVO
HIV-116	HIV	0,79	0,51	NEGATIVO
HIV-117	HIV	1,59	0,29	NEGATIVO
HIV-119	HIV	0,41	0,79	NEGATIVO
HIV-120	HIV	0,45	0,18	NEGATIVO

HIV-123	HIV	0,16	0,06	NEGATIVO
HIV-124	HIV	0,88	0,14	NEGATIVO
HIV-127	HIV	0,89	0,22	NEGATIVO
HIV-128	HIV	0,72	0,04	NEGATIVO
HIV-131	HIV	0,58	0,15	NEGATIVO
HEMOBA-02	HTLV	0,46	0,26	NEGATIVO
HEMOBA-03	HTLV	0,38	0,44	NEGATIVO
HEMOBA-59	HTLV	0,73	0,28	NEGATIVO
HEMOBA-62	HTLV	0,45	0,29	NEGATIVO
HEMOBA-63	HTLV	0,66	1,80	NEGATIVO
HEMOBA-64	HTLV	0,50	0,16	NEGATIVO
HEMOBA-65	HTLV	0,35	0,39	NEGATIVO
HEMOBA-66	HTLV	0,61	0,83	NEGATIVO
HEMOBA-67	HTLV	0,55	0,19	NEGATIVO
HEMOBA-68	HTLV	0,48	0,48	NEGATIVO
HTLV-29	HTLV	0,75	0,31	NEGATIVO
HTLV-32	HTLV	0,56	0,33	NEGATIVO
HTLV-33	HTLV	0,63	0,33	NEGATIVO
HTLV-46	HTLV	0,50	0,19	NEGATIVO
HTLV-51	HTLV	0,80	0,14	NEGATIVO
HTLV-56	HTLV	0,23	0,10	NEGATIVO
HTLV-58	HTLV	0,67	0,14	NEGATIVO
HTLV-OD61	HTLV	0,85	0,16	NEGATIVO
HTLV-OD62	HTLV	0,86	0,75	NEGATIVO
HTLV-OD78	HTLV	0,65	0,19	NEGATIVO
LEISH-01	Leishmaniose	1,07	0,16	NEGATIVO
LEISH-02	Leishmaniose	0,80	0,31	NEGATIVO
LEISH-03	Leishmaniose	2,01	0,14	POSITIVO
LEISH-04	Leishmaniose	1,32	0,08	POSITIVO
LEISH-05	Leishmaniose	1,59	0,10	POSITIVO
FACFAR_4735	Sífilis	0,36	0,20	NEGATIVO
FACFAR_5114	Sífilis	0,74	0,17	NEGATIVO
FACFAR_5416	Sífilis	0,64	0,37	POSITIVO
FACFAR_5591	Sífilis	0,46	0,18	NEGATIVO
FACFAR_5602	Sífilis	0,43	0,62	NEGATIVO
FACFAR_5683	Sífilis	0,50	0,31	NEGATIVO
FACFAR_5755	Sífilis	0,74	0,38	POSITIVO
FACFAR_5993	Sífilis	0,68	0,15	POSITIVO
FACFAR_6148	Sífilis	0,68	0,35	POSITIVO
FACFAR_6278	Sífilis	0,52	0,32	NEGATIVO
FACFAR_6509	Sífilis	0,58	2,04	NEGATIVO
FACFAR_6671	Sífilis	0,46	0,25	NEGATIVO
FACFAR_6708	Sífilis	0,59	0,39	POSITIVO
FACFAR_6802	Sífilis	0,52	0,12	NEGATIVO

FACFAR_6858	Sífilis	0,41	0,82	NEGATIVO
FACFAR_7022	Sífilis	0,45	1,34	NEGATIVO
FACFAR_9526	Sífilis	0,58	0,64	NEGATIVO
FACFAR_10073	Sífilis	0,46	0,76	NEGATIVO
FACFAR_10151	Sífilis	0,28	0,33	NEGATIVO
FACFAR_10204	Sífilis	0,53	0,17	NEGATIVO

Fonte: Elaborado pela autora