



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ARAGUAÍNA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS - GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE ANIMAL
E SAÚDE PÚBLICA NOS TRÓPICOS (PPGSaspt)

ROGÉRIO FERNANDES CARVALHO

**VALIDAÇÃO DA PCR CONVENCIONAL COMO ALTERNATIVA
DE DIAGNÓSTICO DE SARS-COV-2 EM AMOSTRAS HUMANAS**

ARAGUAÍNA – TO
2022

ROGÉRIO FERNANDES CARVALHO

**VALIDAÇÃO DA PCR CONVENCIONAL COMO ALTERNATIVA
DE DIAGNÓSTICO DE SARS-COV-2 EM AMOSTRAS HUMANAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Tocantins – UFT, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos.

Orientador: Professor Doutor José Carlos Ribeiro Júnior

ARAGUAÍNA – TO

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

- C331v Carvalho, Rogério Fernandes.
Validação da PCR convencional como alternativa de diagnóstico de SARS-CoV-2 em amostras humanas. / Rogério Fernandes Carvalho. – Araguaína, TO, 2022.
71 f.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, 2022.
Orientador: José Carlos Ribeiro Júnior
1. COVID-19. 2. Reação em Cadeia da Polimerase. 3. Transcrição Reversa. 4. Detecção. I. Título

CDD 636.089

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

ROGÉRIO FERNANDES CARVALHO

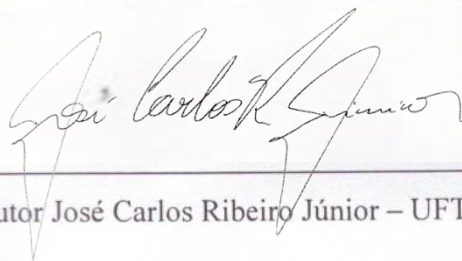
VALIDAÇÃO DA PCR CONVENCIONAL COMO ALTERNATIVA
DE DIAGNÓSTICO DE SARS-COV-2 EM AMOSTRAS HUMANAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

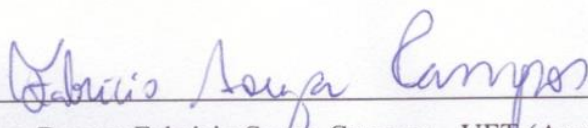
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos (PPGSaspt) como requisito para obtenção do Título de Mestre em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos e aprovada em sua forma final pelo orientador e pela Banca examinadora.

Aprovada em: 25 / 03 / 2022 .

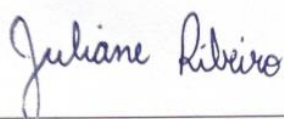
Banca Examinadora:



Professor Doutor José Carlos Ribeiro Júnior – UFT (Orientador)



Professor Doutor Fabrício Souza Campos – UFT (Avaliador Externo)



Professora Doutora Juliane Ribeiro – UEL (Avaliadora Externa)

Dedico este trabalho aos que se foram nessa pandemia, pois muitas mortes poderiam ter sido evitadas se os testes estivessem mais acessíveis.

“Deus é grande, Deus é forte, quando ele quer não tem quem não queira”.

Ayrton Senna

AGRADECIMENTOS

À Deus por me proporcionar uma família sensacional que me auxiliou durante todo o projeto e por me colocar nos caminhos do professor Dr. José Carlos.

À minha esposa Jeane que entendeu a minha ausência nesse período e em todo momento foi forte em casa e disposta a me ajudar sempre que possível nos estudos.

Às minhas filhas Rafaela e Raquel que por muitas vezes ficaram batendo na porta do quarto pedindo para brincar e o pai ausente fazendo pesquisas.

Ao meu professor Dr. José Carlos Ribeiro Júnior por me estender a mão e deixar que o auxiliasse nesse projeto tão rico e importante. Sempre busquei nos meios acadêmicos algo que me empolgasse e pudesse me trazer brilho aos olhos. Na graduação não encontrei, mas aqui no mestrado pude me realizar. Sou muito grato por isso.

Aos meus parceiros de laboratório: Monike, Isac e Cristiane que foram pacientes e me deram suporte e apoio nos dias de muita rotina e trabalho. Ninguém chega em lugar algum sem apoio e eu não conseguiria nada sem ajuda de todos vocês, sou grato por tudo.

RESUMO

O Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2) se espalhou pelo mundo e se tornou um problema de saúde global. Como resultado, a demanda de testes de diagnóstico aumentou dramaticamente, assim como o custo de equipamentos e insumos. Os países com infraestrutura laboratorial deficiente enfrentam dificuldades para expandir sua capacidade de testagem através da Reação em Cadeia de Polimerase precedida de Transcrição Reversa, em tempo real (RT-*q*PCR); portanto, o desenvolvimento de métodos alternativos sensíveis e específicos é essencial para expandir a rede de testagem, reduzindo subnotificações. Este estudo teve como objetivo desenvolver, padronizar, otimizar e validar a Reação em Cadeia de Polimerase convencional após a transcrição reversa (RT-PCR) direcionada ao gene *N* do SARS-CoV-2 em amostras de *swab* naso-orofaríngeo em comparação com a RT-*q*PCR. Usando ferramentas de bioinformática, *primers* para o gene *N* foram determinados e otimizados. As condições de reação foram otimizadas usando um controle comercial positivo e o limite de detecção foi determinado em 100 cópias virais. Na validação da RT-PCR convencional, foi determinada amostragem representativa de 346 amostras de pacientes com suspeita de infecção, cujo diagnóstico foi feito em paralelo com a RT-*q*PCR, sem acesso a valores de *Cycle Threshold* (Ct). Verificou-se sensibilidade de 92,1% e especificidade de 100%, acurácia de 95,6% e coeficiente de correlação de 0,913. Nas atuais condições brasileiras, este método gerou aproximadamente 60,0% de economia em comparação com os custos da RT-*q*PCR. A RT-PCR convencional, validada pelo presente trabalho, apresentou resultados suficientes para a detecção do SARS-CoV-2 e pode ser utilizada como alternativa para diagnósticos e estudos epidemiológicos.

PALAVRAS-CHAVE: COVID-19; Detecção; Reação em Cadeia da Polimerase; Transcrição Reversa

ABSTRACT

Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has spread around the world and has become a global health problem. As a result, the demand for diagnostic tests has increased dramatically, as has the cost of equipment and supplies. Countries with poor laboratory infrastructure face difficulties in expanding their testing capacity through Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-*q*PCR); therefore, the development of sensitive and specific alternative methods is essential to expand the testing network, reducing underreporting. This study aimed to develop, standardize, optimize and validate the conventional Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) targeted at the N gene of SARS-CoV-2 in naso-oropharyngeal swab samples compared to RT-*q*PCR. Using bioinformatics tools, primers for the N gene were determined and optimized. Reaction conditions were optimized using a commercial positive control and the detection limit was determined at 100 viral copies. In the validation of conventional RT-PCR, a representative sample of 346 samples from patients with suspected infection was determined, whose diagnosis was made in parallel with RT-*q*PCR, without access to Cycle Threshold (Ct) values. There was a sensitivity of 92.1% and specificity of 100%, an accuracy of 95.6% and a correlation coefficient of 0.913. Under current Brazilian conditions, this method generated approximately 60.0% savings compared to RT-*q*PCR costs. Conventional RT-PCR, validated by the present work, showed sufficient results for the detection of SARS-CoV-2 and can be used as an alternative for diagnoses and epidemiological studies.

Key Words: COVID-19; Detection; Polymerase Chain Reaction; Reverse Transcription

APÊNDICES

Apêndice 1 – Termo de aprovação do Comitê de Ética	51
Apêndice 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	60
Apêndice 3 – Tabulação dos resultados das amostras testadas	62
Apêndice 4 – Registro de sequência genômica no <i>Genbank</i>	68

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação do genoma e proteínas codificadas do SARS-CoV-2.....	18
Figura 2 - Estrutura da proteína <i>Spike</i> e sua ligação na célula hospedeira, receptor ACE2	19
Figura 3 - Distribuição dos casos confirmados de infecção por MERS-CoV.....	21
Figura 4 - Estágios da COVID-19	24
Figura 5 - Evolução da carga viral de antígenos e dos anticorpos do SARS-CoV-2 no hospedeiro humano	26
Figura 6 - Gráfico de quantificação de produtos de PCR em termociclador do tipo tempo real. 27	
Figura 7 - Esquema ilustrativo do ELISA sanduíche.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância em Saúde.
- CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças.
- CoV – Coronavírus.
- COVID-19 – Doença causada por coronavírus de 2019.
- Ct – *Cycle Threshold*.
- CTD – Domínio do Terminal C.
- E – Envelope.
- ACE2 – Enzima Conversora de Angiotensina 2.
- ELISA – Ensaio Imunoabsorção enzimático.
- FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz.
- GISAID – Iniciativa Global de compartilhamento de dados genômicos sobre Influenza.
- HCoV-229E – Coronavírus humano 229E.
- HCoV-HKU1 – Coronavírus humano HKU1.
- HCoV-NL63 – Coronavírus humano NL63.
- HCoV-OC43 – Coronavírus humano OC43.
- HRP – Enzima *Horseradish* Peroxidase.
- IAL – Instituto Adolfo Lutz.
- ICTV – Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus.
- IEC – Instituto Evandro Chagas.
- IgG – Imunoglobulina G.
- IgM – Imunoglobulina M.
- IL-2 – Interleucina 2 (citocina).
- IL-6 – Interleucina 6 (citocina).
- IL-7 – Interleucina 7 (citocina).
- LACEN – Laboratório Central de Referência em Saúde Pública.
- M – Membrana.
- MERS-CoV – Coronavírus de Síndrome Respiratória do Oriente Médio.
- N – Nucleocapsídeo.
- NCBI – Centro Nacional de Informação em Biotecnologia.
- NIC – Centros Nacionais de Influenza.
- NSP – Proteínas Não Estruturais.
- NTD – Domínio do Terminal N.

OMS – Organização Mundial de Saúde.

ORF – Fase Aberta de Leitura.

pb – Pares de base.

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase.

RdRp – RNA polimerase dependente de RNA.

RNA – Ácido Ribonucleico.

RT-PCR – Reação em Cadeia de Polimerase precedida de Transcrição Reversa.

RT-*q*PCR – Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa precedida de Transcrição Reversa.

S – *Spike*.

SARS – Síndrome Respiratória Aguda Grave.

SARS-CoV – Coronavírus de Síndrome Respiratória Aguda Grave.

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

STD – Domínio do Terminal S.

UFT – Universidade Federal do Tocantins.

Sumário

CAPÍTULO I	17
1.1 INTRODUÇÃO.....	15
1.2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
1.2.1 FAMÍLIA CORONAVIRIDAE.....	17
1.2.2 SURTOS VIRAIS POR CORONAVÍRUS.....	20
1.2.2.1 <i>Coronavírus de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV)</i>	20
1.2.2.2 <i>Coronavírus de Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV)</i>	21
1.2.2.3 <i>Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2)</i>	22
1.2.3 DIAGNÓSTICOS.....	25
1.2.3.1 <i>Diagnósticos Diretos</i>	26
1.2.3.2 <i>Diagnósticos Indiretos</i>	30
1.2.4 REDE BRASILEIRA.....	31
1.3 OBJETIVOS.....	34
1.3.1 <i>Objetivo Geral</i>	34
1.3.2 <i>Objetivos Específicos</i>	34
REFERÊNCIAS.....	35
CAPÍTULO II	41
2.1 TÍTULO DO ARTIGO TRADUZIDO PARA PORTUGUÊS.....	41
2.2 RESUMO DO ARTIGO TRADUZIDO PARA PORTUGUÊS.....	41
2.3 ARTIGO.....	42
CAPÍTULO III	50
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
APÊNDICES.....	51

1.1 INTRODUÇÃO

Os coronavírus (CoV) pertencem à família *Coronaviridae* e podem ser isolados em vários animais e em humanos. Em 2002, na China, surge um CoV denominado Coronavírus de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV), em 2012, na Arábia Saudita, surge um CoV denominado Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) (SU et al., 2016). Existem 6 espécies conhecidas de coronavírus que afetam o homem, são elas 229E, NL63, OC43, HKU1, SARS-CoV e MERS-CoV (ZHU et al., 2020).

No início de 2020, o agente etiológico da nova pneumonia de Wuhan, na China, foi identificado como Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2), sendo a doença originada por este vírus denominada, pela Organização Mundial de Saúde (OMS), por COVID-19 (WU et al., 2020b).

Após seu aparecimento, o SARS-CoV-2 se espalhou pelo mundo e se tornou um problema de saúde global. Trata-se de um vírus com material genético composto por Ácido Ribonucleico (RNA) envelopado que apresenta um contágio e uma morbidade relevante (WANG et al., 2020). Seu genoma é uma fita simples de RNA, tem sentido positivo, iniciando com a Fase Aberta de Leitura 1ab (ORF1ab), seguido dos genes que codificam as proteínas estruturais, *Spike* (S), Envelope (E), Membrana (M) e Nucleocapsídeo (N) (WU et al., 2020b).

Desde que o surto de SARS-CoV-2 se iniciou, muitos kits de detecção foram apresentados ao mercado mundial, podendo identificar: regiões genômicas específicas com ampliações de material genético (Reação em Cadeia de Polimerase - PCR); resposta imunológica quando houver suspeita de contato com o vírus (Sorologia); e ensaios de fluxo lateral para identificar antígenos (YÜCE; FILIZTEKIN; ÖZKAYA, 2021).

A partir do momento que a OMS publicou seu protocolo de diagnóstico para detecção do SARS-CoV-2, os insumos para a Reação em Cadeia de Polimerase precedida de Transcrição Reversa em tempo real (RT-qPCR) começaram a ficar escassos com o aumento da demanda mundial (ULLOA et al., 2020). E a falta do monitoramento da população com a testagem em massa leva a subnotificações e ao descontrole da doença (OLIVEIRA; ARAÚJO, 2020), havendo assim a necessidade de novas formas de diagnósticos para a doença.

Considerando os principais guias e protocolos de validação de métodos de diagnóstico, temos os seguintes parâmetros numa validação qualitativa: taxas de falsos positivos e negativos, sensibilidade e especificidade (seletividade), limite de detecção e robustez (TRULLOLS; RUISÁNCHEZ; RIUS, 2004; BRASIL, 2017).

Assim, o trabalho atual teve como objetivo desenvolver, padronizar e otimizar uma RT-PCR convencional para detectar o SARS-CoV-2 em amostras biológicas, bem como, validar uma RT-PCR convencional como método de diagnóstico da COVID-19 em amostras de *swab* nasofaríngeos, tendo como consequência um método financeiramente mais acessível para a sociedade, em relação a custos e insumos para execução.

Capítulo I

1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

1.2.1 Família *Coronaviridae*

O Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) publicou no início de 2020 o nome do novo coronavírus, o sétimo integrante da família *Coronaviridae* com capacidade de infectar humanos, chamado Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2). Pela taxonomia, esta família é subdividida em quatro gêneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus* e *Gammacoronavirus* (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV), 2019; RABAAN et al., 2020). O SARS-CoV-2, pelas semelhanças que seu genoma apresentou, foi incluído no gênero *Betacoronavirus* (MCBRIDE; VAN ZYL; FIELDING, 2014; BAEK et al., 2020).

De acordo com GORBALENYA et al. (2020), a taxonomia do SARS-CoV-2 é descrita como um vírus do reino *Riboviria*, Ordem *Nidovirales*, Subordem *Cornidovirineae*, Família *Coronaviridae*, Subfamília *Orthocoronavirinae*, Gênero *Betacoronavirus* e Subgênero *Sarbecovirus*.

Da família *Coronaviridae* destacam-se quatro espécies endêmicas: coronavírus humano 229E (HCoV-229E), coronavírus humano NL63 (HCoV-NL63), coronavírus humano OC43 (HCoV-OC43) e coronavírus humano HKU1 (HCoV-HKU1). As duas primeiras espécies pertencem ao gênero *Alphacoronavirus* e as duas seguintes ao gênero *Betacoronavirus*. Por fim, destacam-se duas espécies zoonóticas: SARS-CoV e MERS-CoV, sendo o SARS-CoV-2 uma espécie zoonótica a ser confirmada (BAEK et al., 2020; GUSSOW et al., 2020; YAN; CHANG; WANG, 2020; MILLET; JAIMES; WHITTAKER, 2021).

Os coronavírus apresentam RNA de fita simples com sentido positivo (ssRNA+) com tamanho médio de 30kb, podendo os genes serem divididos em estruturais e não estruturais (NYAYANIT et al., 2020). No SARS-CoV-2, temos 4 genes estruturais: o gene *S* que codifica a glicoproteína de superfície (*Spike*), o gene *E* que codifica a proteína de envelope, o gene *M* que codifica a glicoproteína da membrana e o gene *N* que codifica a fosfoproteína do nucleocapsídeo (GUSSOW et al., 2020; KHAILANY; SAFDAR; OZASLAN, 2020).

Já os genes não estruturais são os genes ORF3a, ORF6a, ORF7a, ORF7b e ORF8, responsáveis por codificar proteínas acessórias. Bem como, o gene ORF1ab, responsável por quase dois terços do genoma e que codifica várias proteínas não estruturais – NSP1 a NSP16,

e também a enzima RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (GUSSOW et al., 2020; KHAILANY; SAFDAR; OZASLAN, 2020).

Os representantes da família *Coronaviridae* são vírus esféricos ou pleomórficos, tendo um diâmetro entre 80 e 120nm, tendo a proteína *Spike* projetada na superfície para ligação com a célula do hospedeiro, a proteína de Membrana inserida na superfície para reforçar o envelope viral, a proteína de Envelope altamente hidrofóbica e a proteína do Nucleocapsídeo que se conecta com o RNA viral dando a conformação helicoidal para o material genético e conferindo proteção contra degradação (Figura 1) (PALACIOS CRUZ et al., 2021).

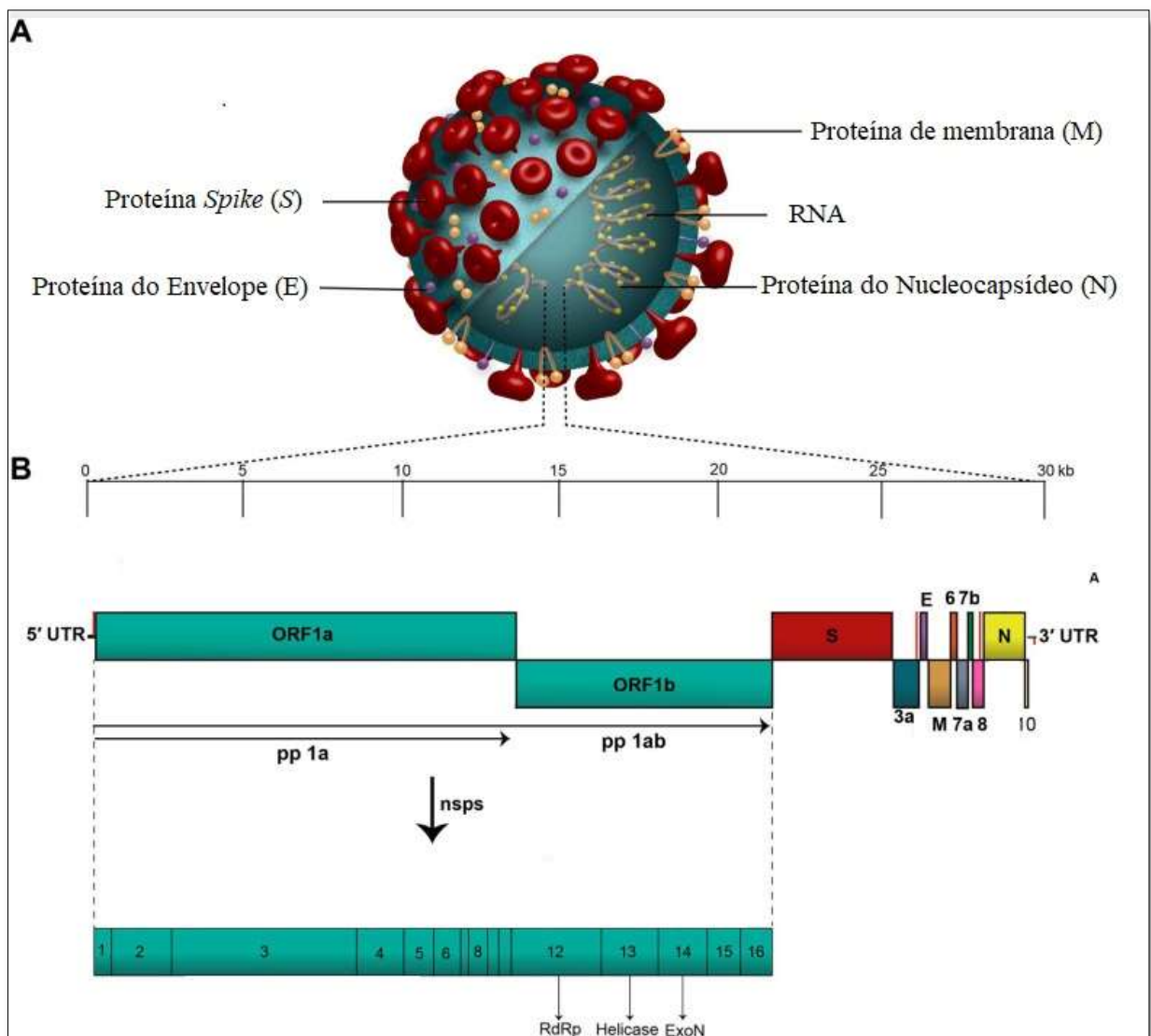


Figura 1. Representação da partícula viral (A) e do genoma (B) do SARS-CoV-2.

(Fonte: Adaptado de HARRISON; LIN; WANG, 2020)

O acesso ao genoma do SARS-CoV-2 é público e facilmente consultado nos principais bancos genômicos internacionais como o *National Center for Biotechnology Information*

(NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e o *Genome Warehouse* do *National Genomics Data Center* (NGDC) (<https://ngdc.cnpc.ac.cn/gwh/>) (KHAILANY; SAFDAR; OZASLAN, 2020). Bem como o GISAID (<https://www.gisaid.org/>), uma iniciativa científica global que disponibiliza dados genômicos sobre o influenza e o SARS-CoV-2.

O gene *N* é o mais conservado entre os genes estruturais, além de produzir a proteína viral mais abundante durante a infecção (BAEK et al., 2020). A fosfoproteína do nucleocapsídeo apresenta três domínios importantes estruturalmente: o Terminal N (NTD), o Terminal C (CTD) e o Terminal SR (SRD ou LKR) (MCBRIDE; VAN ZYL; FIELDING, 2014; RABAAN et al., 2020)

A *Spike* é uma proteína de fusão que estruturalmente forma um trímero, composta pela subunidade globular S1 e pela subunidade transmembranar S2 (Figura 2). A primeira é responsável pela interação com o receptor da célula do hospedeiro, enquanto a segunda desempenha a função de fusão com a membrana celular (RABAAN et al., 2020; MILLET; JAIMES; WHITTAKER, 2021; MISHRA; TRIPATHI, 2021).

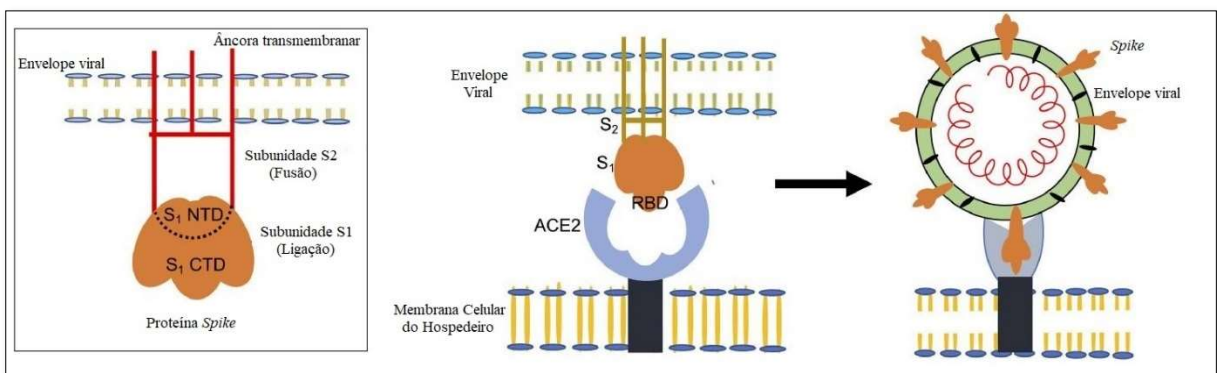


Figura 2. Estrutura da proteína *Spike* e sua ligação na célula hospedeira, receptor ACE2.

(Fonte: Adaptado de MISHRA; TRIPATHI, 2021)

É através de alterações aleatórias no seu próprio genoma que um vírus pode se tornar patológico para uma nova espécie (*Spillover*). No caso do SARS-CoV-2, foi possível identificar que inserções de nucleotídeos no gene *S* resultaram em uma adaptação desta glicoproteína de superfície que possibilitou uma melhor ligação com o receptor ACE2 dos seres humanos (GUSSOW et al., 2020; MILLET; JAIMES; WHITTAKER, 2021).

Esta adaptação do SARS-CoV-2 consegue impor uma superfície hidrofóbica que melhora a capacidade de ligação da glicoproteína *spike* ao receptor ACE2 humano, como também é capaz de se ligar formando várias pontes de hidrogênio (GUSSOW et al., 2020).

1.2.2 Surtos virais por coronavírus

1.2.2.1 Coronavírus de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV)

Ao final de 2002, iniciou-se na província de Guangdong, na China, um surto de pneumonia atípica com quadros febris e sintomas respiratórios (RABAAN et al., 2020). A Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), nomeada oficialmente pela OMS em março de 2003, se espalhou pelo Sudeste da Ásia, pela América do Norte e pela Europa, infectando mais de 8.000 pessoas e causando aproximadamente 800 óbitos (GUAN et al., 2003; ZHONG et al., 2003; VENKATESH; MEMISH, 2004; RABAAN et al., 2020).

Para o isolamento e a identificação do vírus foram usados aspirados nasofaríngeos dos pacientes (ZHONG et al., 2003). O RNA viral pode ser detectado tanto nas vias aéreas superiores quanto inferiores, como também no sangue e na urina (VENKATESH; MEMISH, 2004; YAN; CHANG; WANG, 2020). O genoma encontrado na região da província foi semelhante aos encontrados em Hong Kong e em outros países, indicando que o surto de Guangdong foi capaz de alcançar diversos países (GUAN et al., 2003; ZHONG et al., 2003).

Antes do surto principal que chamou a atenção mundial, ocorrências menores de uma pneumonia atípica com febre e manchas pulmonares foram registradas na mesma região chinesa. O primeiro caso, na cidade de Foshan, foi iniciado com um chefe de cozinha que usava carnes exóticas de caça. De novembro de 2002 a fevereiro de 2003, registrou-se mais de 300 casos de SARS, sendo que 105 infecções eram de profissionais da saúde (GUAN et al., 2003; ZHONG et al., 2003).

Analisando os *swabs* nasais de exemplares de civetas, animais da região, do mercado de Guangzhou e os comparando ao genoma do SARS-CoV, inferiu-se que os genomas eram 99,8% homólogos. Além disso, observou-se uma mutação no gene ORF10 do coronavírus animal que sofreu uma clivagem e originou o gene ORF11 no genoma do SARS-CoV e ainda reestruturou o gene *S* em 43 nucleotídeos. É possível relacionar que os animais desse mercado foram hospedeiros para SARS-CoV (GUAN et al., 2003).

Os vírus da família *Coronaviridae* apresentam uma facilidade em sofrer mutações, a exemplo das outras famílias de genoma RNA e de altas taxas de replicação, e o ocorrido na região chinesa serviu de alerta para surtos futuros que podem ocorrer numa escala global e com sintomas mais graves (SU et al., 2016).

óbitos ocorrendo próximo ao 11º dia. Febre, tosse e dispneia foram os principais sintomas observados (MACKAY; ARDEN, 2015). Já na forma mais grave, a MERS pode levar a falência renal ou à falência múltipla de órgãos (BLEIBTREU et al., 2020).

A presença de RNA viral em vias aéreas superiores e inferiores, no escarro, no sangue e na urina de pacientes infectados é relatada em pacientes com MERS (YAN; CHANG; WANG, 2020). O MERS-CoV consegue se ligar nas células humanas através do receptor dipeptidil peptidase 4 (DPP4) das células humanas (MACKAY; ARDEN, 2015; MOMATTIN; AL-ALI; AL-TAWFIQ, 2019; BLEIBTREU et al., 2020).

A organização do genoma ocorre semelhante aos outros coronavírus, sendo os 2/3 iniciais responsáveis pelos genes que codificam as proteínas envolvidas na replicação (ORF1a e ORF1b) e a terceira parte com genes que codificam proteínas estruturais do vírus (*S*, *N*, *M* e *E*) e proteínas acessórias (ORF3, ORF4a, ORF4b, ORF5 e ORF8b) (BLEIBTREU et al., 2020).

Os estudos apontam para a transmissão entre humanos em menos de 50% dos casos, independentemente da fase da doença. No entanto, pacientes com a infecção confirmada e que ficaram em ambientes fechados com familiares ou profissionais da saúde tendem a transmitir o vírus para seu cuidador. A transmissão viral se mostra mais frequente, no entanto, no contato dromedário-humano (BLEIBTREU et al., 2020).

1.2.2.3 Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2)

Um segundo coronavírus de Síndrome Respiratória Aguda Grave surge na China, agora na cidade de Wuhan, ao final de dezembro de 2019, causando um surto de pneumonia viral (RABAAN et al., 2020; WANG et al., 2020; YAN; CHANG; WANG, 2020; HU et al., 2021). Os primeiros pacientes internados com SARS-CoV-2 estavam relacionados de alguma forma ao mercado local do centro de Wuhan que fornece frutos do mar e até animais selvagens (HU et al., 2021).

Em semanas, mais pessoas infectadas foram internadas com sintomatologia semelhante. Eram pacientes que não tinham relação alguma com o mercado local de Wuhan, sendo grupos familiares e profissionais de saúde. Sugerindo agora uma transmissão humano-humano (HU et al., 2021).

Com o período festivo de final de ano na China, as viagens se intensificaram e os registros de casos confirmados aumentaram intensivamente (HU et al., 2021).

1.2.2.3.1 Cadeia Epidemiológica

O início da contaminação ocorre com a exposição humana às gotículas nasais e orais contaminadas com o SARS-CoV-2. Esse contato inicial pode ocorrer de forma direta com aquele infectado que tosse e/ou espirra sobre um não doente. E ocorre de forma indireta quando uma pessoa saudável entra em contato com gotículas contaminadas, expelidas por algum humano infectado sobre superfícies de uso comum (LOTFI; HAMBLIN; REZAEI, 2020).

De forma geral, o SARS-CoV-2 se replica nas vias aéreas inferiores e em menor grau nas vias aéreas superiores, assim que a transmissão ocorre de forma mais efetiva naqueles pacientes mais graves por apresentarem uma maior probabilidade de eliminar partículas contaminadas, em relação aos assintomáticos ou aqueles com sintomas leves (PALACIOS CRUZ et al., 2021).

As portas de entrada para o SARS-CoV-2 são mucosas dos olhos, boca e nariz. É por isso que cuidados básicos de higiene como lavar as mãos evita significativamente a infecção, bem como, evitar locais sem circulação de ar (LOTFI; HAMBLIN; REZAEI, 2020).

A transmissão humano-humano está comprovada. Mas a transmissão animal-humano ainda precisa ser estudada. Alguns animais como gato, cachorro e furão são susceptíveis ao SARS-CoV-2 (também possuem receptores ACE2 para o SARS-CoV-2) (LOTFI; HAMBLIN; REZAEI, 2020; HU et al., 2021), mas não há evidências que comprovem uma transmissão para seus donos (LOTFI; HAMBLIN; REZAEI, 2020).

Como o morcego (gênero *Rhinolophus*) pode ter servido de hospedeiro intermediário para o SARS-CoV (WU et al., 2020a), e também reservatório natural para inúmeras mutações do sarbecovírus RaTG13 até o surgimento do SARS-CoV-2, é importante salientar o constante monitoramento de outros animais que podem servir de reservatórios para os coronavírus e evitar surtos futuros (AZKUR et al., 2020; BONI et al., 2020).

Uma das possíveis fontes iniciais do SARS-CoV-2 foram os pangolins, mamíferos de região tropical (Sudeste asiático) que são levados ilegalmente para a China por questões culinárias e medicinais (LAM et al., 2020).

Sabe-se que na China é possível encontrar ao menos 20 espécies diferentes de *Rhinolophus* e que o sarbecovírus recircula há mais de 100 anos nesse hospedeiro com vários eventos de recombinação impressos em seu genoma com diversos surtos locais de CoV, através disto, o indicado é que a transmissão do SARS-CoV-2 tenha se originado do morcego e não de outro hospedeiro intermediário (LYTRAS et al., 2022).

1.2.2.3.2 Patogênese

O novo betacoronavírus estabelece sua ligação com o hospedeiro através da ligação de sua glicoproteína de superfície com o receptor de ACE2 das células do hospedeiro (NILE et al., 2020; MILLET; JAIMES; WHITTAKER, 2021). A partir daí, tem-se o início da replicação viral e a instalação do agente infeccioso. Uma vez infectado, inicia-se a replicação viral na região pulmonar do hospedeiro. Esse período de incubação pode ocorrer de forma assintomática ou com poucos sintomas, como mal-estar, febre e tosse seca (SIDDIQI; MEHRA, 2020).

Tem-se de forma geral, os sintomas de febre, tosse seca, dor de garganta, fadiga, lesões pulmonares e insuficiência respiratória. Entretanto, a condição geral de saúde da pessoa, a extensão da disseminação e a virulência da cepa determinarão a gravidade dos sintomas (JOGALEKAR; VEERABATHINI; GANGADARAN, 2020).

Se o estágio inicial não é autolimitado, é estabelecida a doença pulmonar, órgão rico de receptores ACE2. Com os pulmões inflamados, o hospedeiro pode desenvolver pneumonia, febre e falta de ar. Persistindo a condição, é desencadeada uma situação de hiperinflamação sistêmica com o aumento de citocinas (IL-2, IL-6 e IL-7), TNF- α , granulócitos e proteína C reativa. Nesse estágio já se inicia as falhas respiratória e cardíaca (SIDDIQI; MEHRA, 2020).

A doença tem um percurso marcado por três momentos importantes: a fase inicial da infecção, a fase pulmonar e a fase hiperinflamatória (Figura 4). O início não é tão severo,

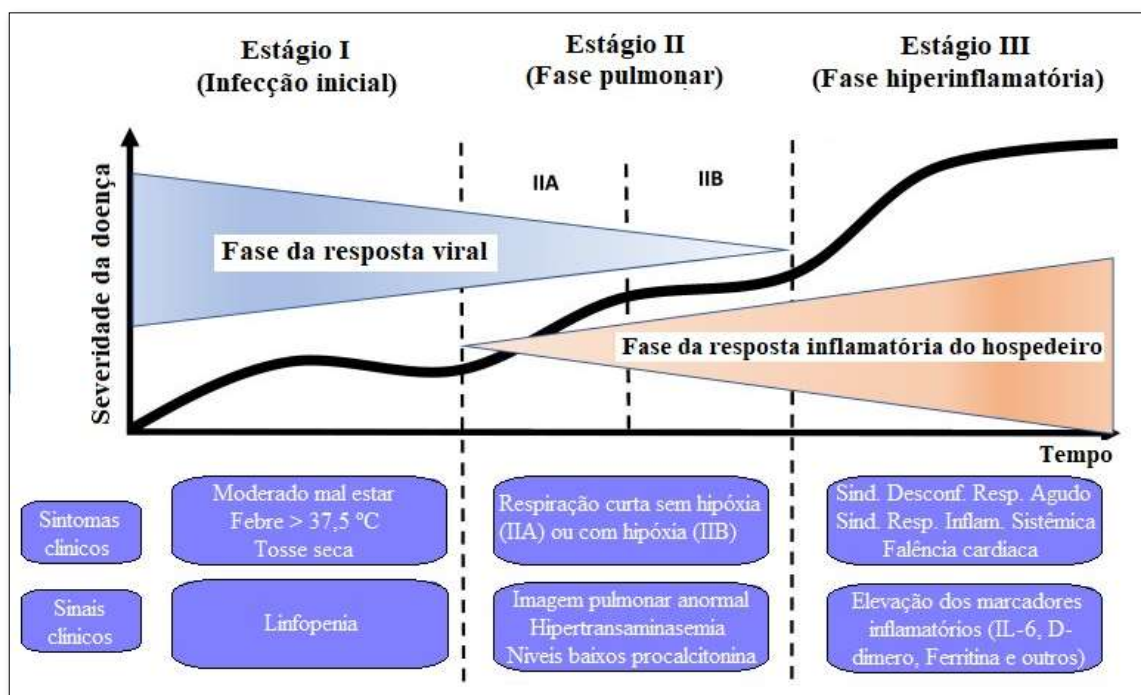


Figura 4. Estágios clínicos evolutivos da COVID-19.

(Fonte: Adaptado de NILE et al., 2020).

apresentando uma tosse seca, febre maior que 37,5°C (HU et al., 2021), leucopenia ou até assintomático. Enquanto na fase 2, a respiração passa a ser mais curta, podendo ocorrer ou não episódios de hipóxia. Por fim, na fase 3, mais crítica, ocorre uma síndrome respiratória aguda grave devido a resposta inflamatória sistêmica que ocasiona comprometimentos cardíacos, pulmonares e renais (LOTFI; HAMBLIN; REZAEI, 2020; NILE et al., 2020; SIDDIQI; MEHRA, 2020).

1.2.2.3.3 Pandemia

Após o anúncio de um SARS-CoV-2 pelas autoridades sanitárias chinesas no início de 2020, houve um crescimento massivo dos registros de casos confirmados na China, saindo de centenas de casos em janeiro para uma média diária de 3.000 casos em fevereiro (HU, 2021).

A OMS torna público em fevereiro de 2020 que o SARS-CoV-2 é uma emergência de saúde pública internacional (YAN, 2020; HU, 2021). E declara oficialmente a COVID-19 como pandemia em 11 de março de 2020 (HU, 2021).

Cerca de 30 dias após a declaração, os números de mortes na Itália e na Espanha se destacam com 17.127 e 14.555, respectivamente. Correspondendo assim a 38% das mortes da pandemia. Já no Brasil, eram quase 16 mil infectados e 800 mortos (BRASIL, 2020c). A doença afetou todos os países do mundo e a transmissão ocorreu a partir de casos assintomáticos e de sintomáticos (GAO et al., 2021). O final do primeiro ano de pandemia trouxe números expressivos como as mais de 1.800.000 mortes no mundo, sendo 195.725 mortes de brasileiros (BRASIL, 2020a).

Ao final de 2021, o número de mortes relacionadas à COVID-19 pelo mundo ultrapassava 5 milhões, sendo 249 milhões de infectados, mesmo com o avanço da vacinação; tendo os Estados Unidos (754.310), o Brasil (609.388), a Índia (460.791), o México (289.674) e a Rússia (241.095) os maiores números de óbitos (BRASIL, 2021).

Através da aplicação massiva de testes de diagnóstico o controle da pandemia pode ser mais efetivo. O valor do diagnóstico molecular, no entanto, é alto e dificulta todo o alcance necessário (VANDENBERG et al., 2021).

1.2.3 Diagnósticos

Existem vários testes relacionados ao SARS-CoV-2, fundamentados em identificações, ampliações e quantificações de ácidos nucleicos até o monitoramento sorológico do hospedeiro, e só a avaliação de cada caso vai determinar qual o ideal conforme o tempo de evolução da doença. São triagens de casos sintomáticos e assintomáticos em cenário epidêmico

e epidemiológico, testes confirmatórios, diagnósticos de pacientes com exposição anterior à outras pessoas infectadas, monitoramento ambiental e outros (VANDENBERG et al., 2021).

Um resultado negativo, seja em qual teste for, é passível de questionamentos porque será sempre possível a ocorrência de falsos negativos. Geralmente, o diagnóstico é concluído através de uma combinação de parâmetros clínicos (VANDENBERG et al., 2021).

Métodos de detecção genômica ou de antígeno visam a detecção da fase aguda da infecção, ou seja, naquela fase em que o paciente, sintomático ou não, está com o vírus ativo e, portanto, pode transmitir aos outros. Como se trata de um método para a pesquisa do vírus, é necessário que o paciente esteja na janela sintomática até o 10º dia após o início dos sintomas, conforme está representado na Figura 5. Após esse período, os métodos de diagnóstico são indiretos, ou seja, pesquisa de anticorpos de fase aguda (IgM) e/ou crônica (IgG) (AZKUR et al., 2020).

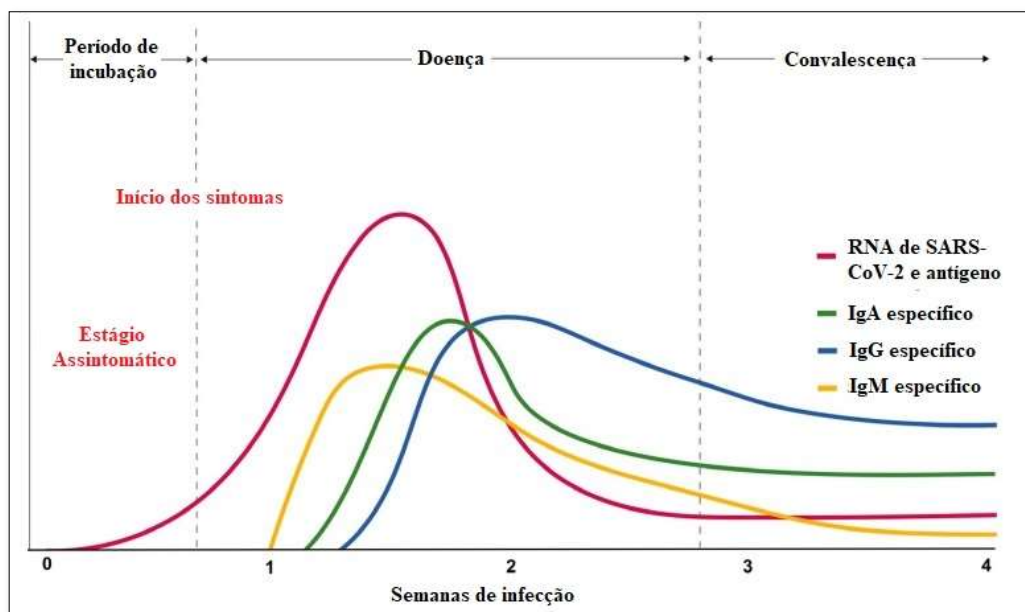


Figura 5. Evolução da carga viral de antígenos e dos anticorpos do SARS-CoV-2 no hospedeiro humano.

(Fonte: Adaptado de AZKUR et al., 2020).

1.2.3.1 Diagnósticos Diretos

A detecção do antígeno pode ser realizada por meio de testes direcionados ao RNA. Atualmente, o recomendado pela OMS é a reação em cadeia da polimerase quantitativa precedida pela transcrição reversa (RT-qPCR) (OLIVEIRA; MATOS; SIQUEIRA, 2020; VANDENBERG et al., 2021).

Existem outros testes complementares que apoiam o diagnóstico e que tem alvo nos biomarcadores virais, como a proteína de superfície, o envelope ou o nucleocapsídeo (YÜCE; FILIZTEKIN; ÖZKAYA, 2021).

No Brasil, registradas na ANVISA, são quatro metodologias para identificação do SARS-CoV-2 que auxiliam no diagnóstico dos pacientes com suspeitas de COVID-19. São elas: a RT-*q*PCR, os testes rápidos, o Ensaio de Imunoabsorção Enzimático (ELISA) e a Quimiluminescência. Todos os produtos autorizados para comercialização pela ANVISA podem ser monitorados em tempo real pelo portal <https://bit.ly/FilaCompletaDiagnosticoCovid-19>.

1.2.3.1.1 RT-*q*PCR

A RT-*q*PCR é o método de diagnóstico usado para identificação e quantificação do RNA viral do SARS-CoV-2 em *swabs* com amostras de esfregaços de naso e orofaríngea (WHO, 2020).

De forma tradicional, a RT-*q*PCR ocorre em 3 etapas: a extração do RNA viral da amostra biológica; a transcrição reversa desse RNA para DNA; e, amplificação da região genômica de interesse que servirá de identificação do teste (MOREHOUSE et al., 2021; YÜCE; FILIZTEKIN; ÖZKAYA, 2021).

Além disso, o equipamento da PCR em tempo real traz o *cycle threshold* (Ct) que é um parâmetro da quantificação viral, indica o ciclo exato em que houve quantificação de material genético superior ao limite de detecção (Figura 6). Dessa forma, baixos valores de Ct indicam uma amostra com maior carga viral, indicativo de maior potencial de transmissibilidade da doença para outros indivíduos (TOM; MINA, 2020), que pode ser quantificada quando pareada com uma curva padrão de concentrações conhecidas do gene alvo (MENEZES; LIMA; MARTINELLO, 2020).

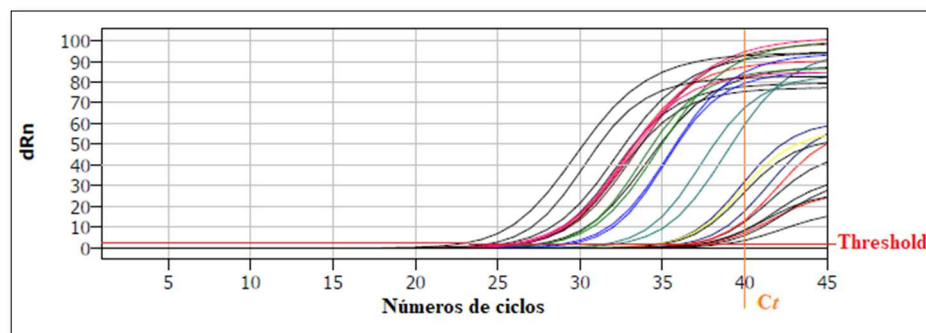


Figura 6. Gráfico de quantificação de produtos de PCR em termociclador do tipo tempo real.

(Fonte: Arquivo Pessoal)

Analisando a sensibilidade dos testes moleculares, a qualidade e a abundância de RNA nas amostras coletadas serão determinantes (VANDENBERG et al., 2021).

Em 2020, o Protocolo de Charité, Berlim - Alemanha, preconizado pela OMS como metodologia de identificação do SARS-CoV-2 através da RT-PCR, foi atualizado para seus alvos genômicos. Seu ensaio obedece a um fluxo de testagem, sendo primeiro testado o gene *E* em seguida a região RdRp. Sendo o limite de detecção para o gene *E* de cerca de 5,2 cópias/reação, enquanto a RdRp é de 3,8 cópias/reação. Amostras positivas devem apresentar um $Ct < 35$ (CORMAN et al., 2020).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos, desenvolveu e preconizou um ensaio qualitativo para identificação do SARS-CoV-2 em amostras das vias aéreas superiores e inferiores dos pacientes infectados. Os *primers* e *probes* usados na amplificação do genoma são direcionados ao gene *N* que codifica o nucleocapsídeo viral em duas regiões distintas. Amostras positivas devem apresentar um $Ct < 40$ (“CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel,” 2020).

1.2.3.1.2 Teste-Rápido ou Teste de Fluxo Lateral

As proteínas costumam ser excelentes imunógenos (aquele capaz de provocar uma resposta imunológica), mesmo os anticorpos se ligando em apenas determinadas regiões específicas (epítomos ou determinantes antigênicos) das proteínas, regiões de 5 a 8 aminoácidos (DEVES et al., 2013).

Os antígenos são moléculas biológicas, como ácidos nucleicos, proteínas e carboidratos, que acabam desencadeando a sensibilização do sistema imunológico do hospedeiro. Os componentes virais, como a Glicoproteína S, a Proteína M ou a Proteína N, são específicos na infecção por SARS-CoV-2 (YÜCE; FILIZTEKIN; ÖZKAYA, 2021).

Os testes de arraste lateral são comumente usados para detectar antígenos virais (VANDENBERG et al., 2021). E seu uso não requer pessoal treinado, reações complexas ou laboratórios equipados (YÜCE; FILIZTEKIN; ÖZKAYA, 2021).

Se comparar com o teste padrão-ouro, de eleição pela OMS (RT-*q*PCR), tem-se uma perda de sensibilidade e uma probabilidade maior de falsos negativos. Sendo mais indicado então como uma forma coadjuvante nos diagnósticos (VANDENBERG et al., 2021).

Já em relação ao ELISA, o teste de arraste tem a vantagem da facilidade do uso, pois pode ser executado por qualquer pessoa sem treinamento. Em regiões de pouca estrutura, com baixa testagem, os casos suspeitos não têm a devida atenção e a transmissão aumenta. O uso

dos testes rápidos consegue economizar nos custos e no tempo para a obtenção dos resultados (YÜCE; FILIZTEKIN; ÖZKAYA, 2021).

O teste de arraste utiliza a metodologia da imunocromatografia para identificar proteínas específicas do SARS-CoV-2 presentes em amostras de *swab* nasofaríngeos. O kit contém uma fita sensibilizada com anticorpo monoclonal para uma proteína viral, como a do nucleocapsídeo, na região demarcada de teste. A amostra em tampão, adicionada à fita, migra por capilaridade para o lado oposto da fita. Nesse caminho, passa por uma porção da fita com anticorpo monoclonal antinucleocapsídeo conjugado com ouro coloidal. Em amostras positivas, a proteína do nucleocapsídeo se liga ao anticorpo monoclonal conjugado com ouro e percorre a fita. Chegando na região de teste, ocorrerá a formação de um complexo anticorpo-proteína-anticorpo e o ouro coloidal sinalizará essa formação com uma faixa visível (“SureStatus - Teste em Cartão de Antígeno COVID-19,” 2021).

1.2.3.1.3 Ensaio de Imunoabsorção Enzimático (ELISA)

Do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, o ELISA é considerado o padrão-ouro quando se trata de teste imunológico, podendo ser usado para detectar e quantificar antígenos, anticorpos, glicoproteínas, proteínas e hormônios através da quantificação dos complexos formados de antígeno-anticorpo (ALHAJJ; FARHANA, 2021).

Para identificar um antígeno, como o SARS-CoV-2, utiliza-se o “ELISA Sanduíche” que consiste em montar 2 camadas de anticorpos e 1 camada do antígeno, representado na Figura 7. Os fundos dos poços da placa são fixados com anticorpos específicos para o antígeno, sobre a qual é realizada a adição da amostra e em seguida a segunda camada de anticorpos (conjugado com uma enzima). A leitura é realizada com observação da mudança de cor da solução por adição de substrato que reage com a enzima conjugada do anticorpo (VON MÜHLEN; BENDER, 2008; ALHAJJ; FARHANA, 2021).

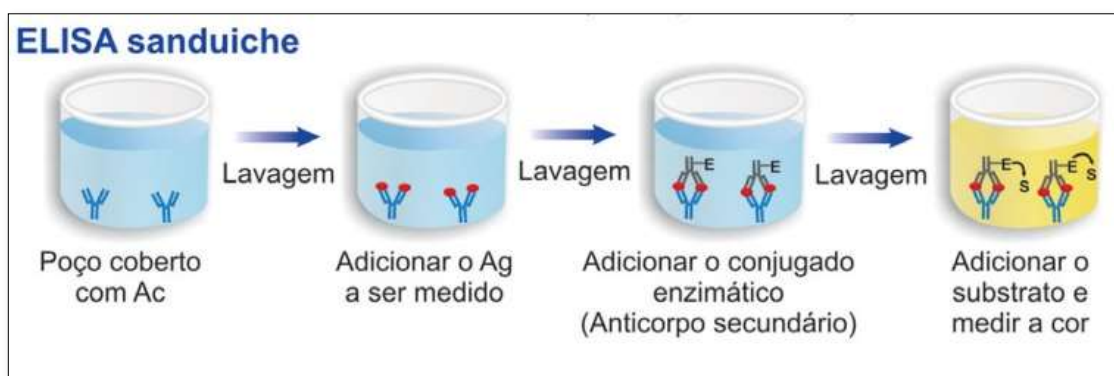


Figura 7. Esquema ilustrativo do ELISA sanduíche.
(Fonte: Adaptado de VON MÜHLEN; BENDER, 2008).

1.2.3.1.4 Quimioluminescência

Este ensaio usa como metodologia a quimioluminescência para determinação quantitativa da proteína do nucleocapsídeo do SARS-CoV-2, em amostras de *swab* nasofaríngeos (“MAGLUMI - SARS-CoV-2 Ag (CLIA),” 2021).

A amostra é homogeneizada com uma solução tampão, microesferas magnéticas impregnadas de anticorpo para o antígeno do nucleocapsídeo e anticorpos também contra o antígeno do nucleocapsídeo, porém, conjugados com marcador. Em amostras positivas, ocorre a formação de imunocomplexos (Anticorpo-Antígeno-Anticorpo). A solução final passa por um campo magnético que precipita as esferas e o sobrenadante é descartado. A leitura ocorre com a adição de uma solução que inicia a reação de quimioluminescência. A luz emitida é analisada em um fotomultiplicador que consegue quantificar a proteína presente (“MAGLUMI - SARS-CoV-2 Ag (CLIA),” 2021).

1.2.3.2 Diagnósticos Indiretos

Os diagnósticos sorológicos direcionados ao SARS-CoV-2 buscam determinar os anticorpos IgM e IgG por serem as proteínas específicas de resposta imunológica no hospedeiro após o contato com o vírus. A amostra usada para a análise é o sangue do paciente, soro ou plasma (NOGUEIRA; SILVA, 2020; OLIVEIRA; MATOS; SIQUEIRA, 2020).

Sua aplicação ocorre de forma complementar, sendo indicado nos casos de suspeita de infecção com cerca de 10 dias do início dos sintomas (NOGUEIRA; SILVA, 2020; VANDENBERG et al., 2021). Sendo usado como avaliação dos profissionais de saúde no retorno ao trabalho e no monitoramento epidemiológico de regiões específicas (NOGUEIRA; SILVA, 2020).

1.2.3.2.1 Teste Rápido ou Teste de Fluxo Lateral para Anticorpos

São testes baseados na imunocromatografia para identificar a presença dos anticorpos IgM e IgG. Por isso, sua indicação é a partir dos 10 dias de sintomas, período no qual a produção das imunoglobulinas já se torna detectável para a maioria das pessoas (NOGUEIRA; SILVA, 2020). Os chamados testes de fluxo lateral são comumente usados para detectar os anticorpos IgM e IgG (VANDENBERG et al., 2021).

O teste consiste numa membrana cromatográfica de duas porções importantes. Ao final, tem-se anticorpos anti-IgG e anti-IgM humanos na região dos resultados, enquanto que na parte inicial tem-se antígenos de SARS-CoV-2 conjugados com partículas de ouro. A amostra com

tampão vai migrar pela membrana, mas antes reage com os antígenos e forma um complexo. Este complexo migra pela membrana e fica imobilizado na região teste, colorindo sua respectiva faixa. Faixa IgM colorida significa que o IgM humano reagiu com a proteína conjugada e ao final da corrida ficou complexado com o anticorpo anti-IgM. Da mesma forma, o anticorpo IgG (“SARS-CoV-2 IgM/IgG Antibody Assay Kit”, 2020).

Sua execução é simples e de resultado rápido, entre 10 e 30 minutos. Mas deve ser usado de forma complementar ao diagnóstico devido a alta probabilidade de resultados falsos (NOGUEIRA; SILVA, 2020), além de que nem todo indivíduo infectado necessariamente produz anticorpos de fase aguda ou crônica (OLIVEIRA, 2020).

1.2.3.2.2 Ensaio de Imunoabsorção Enzimático (ELISA) para Anticorpo

Na detecção dos anticorpos, opta-se pela realização do ELISA direto. É feita a sensibilização/revestimento dos fundos dos poços da placa com proteínas recombinantes do nucleocapsídeo do SARS-CoV-2. Na primeira incubação é adicionada a amostra e espera-se que os anticorpos (IgM e IgG) se liguem às proteínas fixadas na placa. Em uma próxima etapa, adiciona-se o anticorpo policlonal anti-IgG e anti-IgM humano conjugado a enzima de peroxidase (HRP). Procede-se a leitura com a adição de um substrato que revela a presença ou ausência do IgG e IgM através da cor formada na solução pela reação enzimática da peroxidase no anticorpo policlonal e o substrato (“COVID-19 IgG: Dried Blood Spot”, 2020).

1.2.4 Rede Brasileira

Inicialmente, os Centros Nacionais de Influenza (NIC) foram os únicos laboratórios autorizados nacionalmente a realizar a RT-*q*PCR para diagnóstico da COVID-19. E o Ministério da Saúde não recomendava o uso de kits comerciais, podendo os laboratórios privados realizar apenas a coleta das amostras com o posterior envio aos NICs (BRASIL, 2020b).

No contexto epidemiológico, a detecção da fase aguda da infecção, ou seja, positividade nos testes de antígeno, é mais importante em relação aos que apresentam resposta imunológica, uma vez que estes têm menor potencial de disseminar a doença, mas ainda são importantes para a determinação da dispersão e do nível real do número de infectados (LEE et al., 2020).

Na emergência sanitária da COVID-19, a rede brasileira de Laboratórios Centrais de Referência em Saúde Pública (LACEN) dos estados foi estruturada e capacitada para atendimento das demandas regionais de RT-*q*PCR pelos NIC (PEREIRA et al., 2021), compostos pelo Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo da Fundação Oswaldo Cruz

(FIOCRUZ/RJ), pelo Laboratório de Vírus Respiratórios do Instituto Evandro Chagas (IEC/SVS/MS) e pelo Laboratório de Vírus Respiratórios do Instituto Adolfo Lutz (IAL/SES-SP) (BRASIL, 2020b). Mesmo nesse cenário, os laboratórios foram sobrecarregados para atendimento de demandas epidemiológicas e hospitalares que o monitoramento da doença exigia. Em alguns casos, o resultado laboratorial chegava quando o paciente suspeito já poderia ter evoluído para agravamento ou cura clínica (ALMEIDA et al., 2021).

Pereira et al. (2021) relatam que no Estado da Bahia, o Laboratório Central Estadual executava cerca de 400 exames de RT-*q*PCR ao mês e com a instalação da pandemia, a unidade de saúde chegou a atingir 4.000 diagnósticos no mês.

Mesmo o Brasil apresentando um grande quantitativo de casos infectados, a capacidade de testagem foi baixa durante a pandemia. Isso ocorreu pela necessidade de infraestrutura laboratorial adequada, mão de obra qualificada, dificuldade nas compras, baixa disponibilidade de fornecedores e a dificuldade de logística nacional (RIBEIRO; BERNARDES, 2020). Regiões com recursos limitados não conseguem implementar uma vigilância adequada porque falta reagente, profissional e infraestrutura (VANDENBERG et al., 2021).

A busca por insumos relacionados à RT-*q*PCR aumentou mundialmente e gerou uma escassez de produtos e equipamentos. Com a alta demanda, os preços ficaram cada vez maiores (MOREHOUSE et al., 2021; PEREIRA et al., 2021), desde itens básicos para a coleta de material biológico até insumos de grande valor agregado (PEREIRA et al., 2021). Isso provocou diversas medidas estratégicas na triagem dos suspeitos de infecção, como ocorreu em alguns estados que limitaram a realização da RT-*q*PCR somente para pacientes hospitalizados. Em associação com os casos assintomáticos, isso gerou elevadas subnotificações (OLIVEIRA; ARAÚJO, 2020). O direcionamento dos testes apenas para os casos graves, limitando a testagem de forma geral, contribuiu para o aumento da mortalidade e de outros indicadores epidemiológicos porque mascaram o número real de infectados (SOUZA et al., 2020).

Quando o cenário construído é de que apenas pacientes sintomáticos ou aqueles com manifestações clínicas graves podem realizar o exame de diagnóstico, tem-se fatores suficientes para o crescimento da subnotificação e para o aumento contínuo de casos (OLIVEIRA; ARAÚJO, 2020). A testagem em grande escala vai fornecer as informações adequadas para acompanhamento do surto e apoiar as estratégias de mitigação (VANDENBERG et al., 2021).

A investigação epidemiológica é de grande importância pois a transmissibilidade típica do SARS-CoV-2 somada aos inúmeros casos assintomáticos com baixa testagem diagnóstica fortalecem a disseminação viral (OLIVEIRA; ARAÚJO, 2020). Uma grande barreira no controle da disseminação é a transmissão nos infectados assintomáticos ou sintomáticos leves

que acabam transmitindo a doença por desconhecimento porque a testagem é reduzida (XAVIER et al., 2020).

A exemplo, no município de Araguaína, norte do Tocantins, onde houve relativamente boa cobertura da realização dos testes de RT-*q*PCR pela rede pública, privada e apoio da FIOCRUZ ao estado, os casos assintomáticos, com 95% de confiança, variaram de 16 a 23 por caso notificado na sexta semana epidemiológica de 2021 (SILVA et al., 2021) (dados ainda não publicados).

Sabe-se que países que tiveram os melhores resultados em relação ao controle da pandemia da COVID-19 foram aqueles que implementaram diversas medidas de mitigação entre o contato entre as pessoas e ampliaram massivamente a cobertura da testagem na população, promovendo o isolamento dos doentes, monitoramento dos contactantes e outras medidas epidemiológicas (OLIVEIRA; ARAÚJO, 2020). É ratificado que o monitoramento através de exames é primordial para os estudos epidemiológicos e que isso auxilia os governos a desenvolverem políticas públicas adequadas (XAVIER et al., 2020).

Nesse contexto de baixa oferta dos equipamentos e insumos para a RT-*q*PCR, o desenvolvimento de metodologias alternativas para detecção da fase aguda é fundamental, pois amplia a rede de diagnóstico e reduz o número de doentes (PEREIRA et al., 2021), obviamente em associação com a ampliação da vacinação da população (LOPEZ BERNAL et al., 2021). A PCR clássica, qualitativa, pode ser um método suficiente para a detecção da infecção e pode ser uma dessas alternativas laboratoriais que independe da importação de insumos e, conseqüentemente, da competitividade internacional pelos equipamentos e insumos.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver, padronizar, otimizar e validar uma RT-PCR convencional qualitativa para detectar o vírus SARS-CoV-2 em amostras *de swab* naso e orofaríngeos que seja mais acessível para os serviços de saúde e de acordo com a regulamentação brasileira.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Desenvolver, padronizar e otimizar uma RT-PCR convencional para detecção de SARS-CoV-2 utilizando controle positivo comercial;
- b) Determinar a sensibilidade analítica do método proposto;
- c) Validar o método desenvolvido no presente estudo frente ao padrão-ouro (*Real Time* RT-PCR) através dos parâmetros exigidos oficialmente; e,
- d) Avaliar a concordância entre o método desenvolvido e o padrão-ouro através do coeficiente de Kappa.
- e) Comparar os custos da RT-*q*PCR e da técnica desenvolvida no estudo.

REFERÊNCIAS

- ALHAJJ, M.; FARHANA, A. **Enzyme Linked Immunosorbent Assay**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32310382>>.
- ALMEIDA, G. B. DE et al. AUMENTO DA CAPACIDADE PARA O DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA COVID-19 NO BRASIL AO LONGO DE 100 DIAS DE EPIDEMIA. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 25, p. 5–6, jan. 2021.
- AZKUR, A. K. et al. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. **Allergy**, v. 75, n. 7, p. 1564–1581, 11 jul. 2020.
- BAEK, Y. H. et al. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification as a rapid early-detection method for novel SARS-CoV-2. **Emerging Microbes and Infections**, v. 9, n. 1, p. 998–1007, 1 jan. 2020.
- BLEIBTREU, A. et al. Focus on Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 50, n. 3, p. 243–251, 1 maio 2020.
- BONI, M. F. et al. Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 1408–1417, 28 nov. 2020.
- BRASIL, M. DA SAÚDE. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, p. 1–22, 25 jul. 2017.
- BRASIL, M. DA SAÚDE. Doença pelo Coronavírus COVID-19. **Boletim Epidemiológico Especial**, p. 1–76, 6 jan. 2020a.
- BRASIL, M. DA SAÚDE. Infecção Humana pelo Novo Coronavírus (2019-nCoV). **Boletim Epidemiológico**, p. 1–23, 10 fev. 2020b.
- BRASIL, M. DA SAÚDE. Doença pelo Coronavírus COVID-19. **Boletim Epidemiológico**, v. 8, p. 1–41, 9 abr. 2020c.
- BRASIL, M. DA SAÚDE. Doença pelo Novo Coronavírus - COVID-19. **Boletim Epidemiológico Especial**, p. 1–99, 12 nov. 2021.
- CDC 2019–Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel. **Center for Disease Control and Prevention**, v. 7, 2020.

CORMAN, V. et al. Diagnostic detection of Wuhan coronavirus 2019 by real-time RT-PCR. **World Health Organization**, v. 17, p. 1–13, 13 jan. 2020.

COVID-19 IgG: Dried Blood Spot. Contagem/MG: MBIOLOG Diagnósticos, 2020.

DEVES, P. J. et al. **Roitt, Fundamentos da Imunologia**. Tradução Carlos Henrique de A. Cosendey e Cláudia Lúcia Caetano de Araújo. 12 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2013. 552 p. Tradução de: Roitt's essential immunology.

FARAG, E. et al. Drivers of MERS-CoV Emergence in Qatar. **Viruses**, v. 11, n. 1, p. 22, 31 dez. 2018.

GAO, Z. et al. A systematic review of asymptomatic infections with COVID-19. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 54, n. 1, p. 12–16, 1 fev. 2021.

GORBALENYA, A. E. et al. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: The species and its viruses – a statement of the Coronavirus Study Group. **bioRxiv**, 2020.

GUAN, Y. et al. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in Southern China. **Science**, v. 302, n. 5643, p. 276–278, 10 out. 2003.

GUSSOW, A. B. et al. Genomic determinants of pathogenicity in SARS-CoV-2 and other human coronaviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 26, p. 15193–15199, 30 jun. 2020.

HARRISON, A. G.; LIN, T.; WANG, P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. **Trends in Immunology**, v. 41, n. 12, p. 1100–1115, 1 dez. 2020.

HU, B. et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 141–154, 1 mar. 2021.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). **Taxonomy - SARS**. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=202001868>. Acesso em: 21 fev. 2022.

JOGALEKAR, M. P.; VEERABATHINI, A.; GANGADARAN, P. Novel 2019 coronavirus: Genome structure, clinical trials, and outstanding questions. **Experimental Biology and Medicine**, v. 245, n. 11, p. 964–969, 19 jun. 2020.

KHAILANY, R. A.; SAFDAR, M.; OZASLAN, M. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. **Gene Reports**, v. 19, 1 jun. 2020.

LAM, T. T.-Y. et al. Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. **Nature**, v. 583, n. 7815, p. 282–285, 9 jul. 2020.

LEE, C. Y.-P. et al. Serological Approaches for COVID-19: Epidemiologic Perspective on Surveillance and Control. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 24 abr. 2020.

LOPEZ BERNAL, J. et al. Effectiveness of the Pfizer-BioNTech and Oxford-AstraZeneca vaccines on covid-19 related symptoms, hospital admissions, and mortality in older adults in England: test negative case-control study. **BMJ**, v. 373, p. n1088, 13 maio 2021.

LOTFI, M.; HAMBLIN, M. R.; REZAEI, N. COVID-19: Transmission, prevention, and potential therapeutic opportunities. **Clinica Chimica Acta**, v. 508, p. 254–266, 1 set. 2020.

LYTRAS, S. et al. Exploring the Natural Origins of SARS-CoV-2 in the Light of Recombination. **Genome Biology and Evolution**, v. 14, n. 2, 4 fev. 2022.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E. MERS coronavirus: diagnostics, epidemiology and transmission. **Virology Journal**, v. 12, n. 1, p. 222, 22 dez. 2015.

MAGLUMI - SARS-CoV-2 Ag (CLIA). São Paulo/SP: VR Medical, 2021.

MCBRIDE, R.; VAN ZYL, M.; FIELDING, B. C. The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. **Viruses**, v. 6, n. 8, p. 2991–3018, 7 ago. 2014.

MENEZES, M. E.; LIMA, L. M.; MARTINELLO, F. Diagnóstico laboratorial do SARS-CoV-2 por transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 52, n. 2, p. 122–130, 2020.

MILLET, J. K.; JAIMES, J. A.; WHITTAKER, G. R. Molecular diversity of coronavirus host cell entry receptors. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 45, n. 3, 1 maio 2021.

MISHRA, S. K.; TRIPATHI, T. One year update on the COVID-19 pandemic: Where are we now? **Acta Tropica**, v. 214, 1 fev. 2021.

MOMATTIN, H.; AL-ALI, A. Y.; AL-TAWFIQ, J. A. A Systematic Review of therapeutic agents for the treatment of the Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV). **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 30, p. 9–18, 1 jul. 2019.

MOREHOUSE, Z. P. et al. Validation of a direct-to-PCR COVID-19 detection protocol utilizing mechanical homogenization: A model for reducing resources needed for accurate testing. **PLoS ONE**, v. 16, n. 8 August, 1 ago. 2021.

NILE, S. H. et al. COVID-19: Pathogenesis, cytokine storm and therapeutic potential of interferons. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 53, p. 66–70, 1 jun. 2020.

NOGUEIRA, J. M. DA R.; SILVA, L. O. P. DA. Diagnóstico laboratorial da COVID-19 no Brasil. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 52, n. 2, 2020.

NYAYANIT, D. A. et al. Natural Selection Plays an Important Role in Shaping the Codon Usage of Structural Genes of the Viruses Belonging to the Coronaviridae Family. **Viruses**, v. 13, n. 1, p. 3, 22 dez. 2020.

OLIVEIRA, M. S. DE; MATOS, A. DA R.; SIQUEIRA, M. M. Conhecendo o SARS-CoV-2 e a COVID-19. In: **Diplomacia da saúde e COVID-19: reflexões a meio caminho**. Fiocruz, p. 69–82, 2020.

OLIVEIRA, J. O Laboratório de Análises Clínicas na Pandemia COVID-19. **Revista Portuguesa de Farmacoterapia**, v. 12, n. 1–2, p. 56–60, 2020.

OLIVEIRA, T. M.; ARAÚJO, A. C. O. Consequências da subnotificação dos casos de COVID-19 para a saúde pública no Brasil. **InterAmerican Journal of Medicine and Health**, v. 3, 2 nov. 2020.

PALACIOS CRUZ, M. et al. COVID-19, una emergencia de salud pública mundial. **Revista Clínica Española**, v. 221, n. 1, p. 55–61, 1 jan. 2021.

PEREIRA, F. M. et al. Experiência do laboratório central de saúde pública da Bahia no enfrentamento da pandemia da COVID-19. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 45, p. 187–203, mar. 2021.

RABAAN, A. A. et al. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: A comparative overview. **Le infezioni in medicina**, v. 28, n. 2, p. 174–184, 2020.

RIBEIRO, L. C.; BERNARDES, A. T. **Atualização da Estimativa de Subnotificação em Casos de Hospitalização por Síndrome Respiratória Aguda e Confirmados por Infecção por Covid-19 no Brasil e Estimativa para Minas Gerais**. Disponível em: <<https://www.cedeplar.ufmg.br/component/phocadownload/category/18-noticias?download=1304:nova-estimativa-subnotificacao>>. Acesso em: 28 nov. 2021.

SARS-CoV-2 IgM/IgG Antibody Assay Kit (Colloidal Gold Method). Lagoa Santa/MG: LabTest Diagnóstica, 2020.

SIDDIQI, H. K.; MEHRA, M. R. COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: A clinical–therapeutic staging proposal. **Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 39, n. 5, p. 405–407, 1 maio 2020.

SOUZA, C. D. F. et al. Spatiotemporal evolution of case fatality rates of COVID-19 in Brazil, 2020. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 46, n. 4, p. e20200208–e20200208, 2020.

SU, S. et al. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 6, p. 490–502, 1 jun. 2016.

SureStatus - Teste em Cartão de Antígeno COVID-19. Vargem Paulista/SP: CIPLA, 2021.

TOM, M. R.; MINA, M. J. To Interpret the SARS-CoV-2 Test, Consider the Cycle Threshold Value. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 16, p. 2252–2254, 15 out. 2020.

TRULLOLS, E.; RUISÁNCHEZ, I.; RIUS, F. X. Validation of qualitative analytical methods. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 2, p. 137–145, 2004.

ULLOA, S. et al. A simple method for SARS-CoV-2 detection by rRT-PCR without the use of a commercial RNA extraction kit. **Journal of Virological Methods**, v. 285, p. 113960, 1 nov. 2020.

VANDENBERG, O. et al. Considerations for diagnostic COVID-19 tests. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 171–183, 1 mar. 2021.

VENKATESH, S.; MEMISH, Z. A. SARS: the new challenge to international health and travel medicine. **Eastern Mediterranean Health Journal**, v. 10, n. 4, p. 655 – 662, 2004.

VON MÜHLEN, C. A.; BENDER, A. L. Testes Laboratoriais Aplicados à Imunologia Clínica. In: **Imunologia Clínica na Prática Médica**. 1. ed. São Paulo/SP: Atheneu, p. 75–96, 2008.

WANG, H. et al. The genetic sequence, origin, and diagnosis of SARS-CoV-2. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 39, n. 9, p. 1629–1635, 24 set. 2020.

WU, F. et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 265–269, 12 mar. 2020a.

WU, J. et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2: From Gene Structure to Pathogenic Mechanisms and Potential Therapy. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 3 jul. 2020b.

XAVIER, A. R. et al. COVID-19: clinical and laboratory manifestations in novel coronavirus infection. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 56, 1 jan. 2020.

YAN, Y.; CHANG, L.; WANG, L. Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures. **Reviews in Medical Virology**, v. 30, n. 3, 1 maio 2020.

YÜCE, M.; FILIZTEKIN, E.; ÖZKAYA, K. G. COVID-19 diagnosis – A review of current methods. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 172, 15 jan. 2021.

ZHONG, N. et al. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. **The Lancet**, v. 362, n. 9393, p. 1353–1358, out. 2003.

ZHU, N. et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, p. 727–733, 20 fev. 2020.

Capítulo II

2.1 TÍTULO DO ARTIGO TRADUZIDO PARA PORTUGUÊS

Validação de uma PCR convencional como alternativa para detecção de SARS-CoV-2 com alvo no gene da proteína do nucleocapsídeo em amostras de naso e orofarínge

2.2 RESUMO DO ARTIGO TRADUZIDO PARA PORTUGUÊS

O SARS-CoV-2 se espalhou pelo mundo e se tornou um problema de saúde global. Como resultado, a demanda por insumos para testes diagnósticos aumentou drasticamente, assim como o custo. Países com infraestrutura inadequada enfrentam dificuldades para expandir sua capacidade de teste de *qPCR*. Portanto, o desenvolvimento de métodos alternativos sensíveis e específicos é essencial. Este estudo teve como objetivo desenvolver, padronizar, otimizar e validar uma RT-PCR convencional visando o gene N do SARS-CoV-2 em amostras de *swab* naso-orofaríngeo em comparação com a *qPCR*. Utilizando ferramentas de bioinformática, foram determinados primers específicos, com um produto esperado de 519 pb. As condições de reação foram otimizadas usando um controle positivo comercial, e o limite de detecção foi determinado em 100 fragmentos. Para validar a RT-PCR convencional, determinou-se uma amostragem representativa de 346 amostras de pacientes com suspeita de infecção cujo diagnóstico foi feito em paralelo com a *qPCR*. Verificou-se uma sensibilidade de 92,1% e uma especificidade de 100%, com acurácia de 95,66% e coeficiente de correlação de 0,913. Nas atuais condições brasileiras, esse método gera uma economia de aproximadamente 60% em relação aos custos de *qPCR*. A RT-PCR convencional, aqui validada, mostrou resultados suficientes para a detecção de SARS-CoV-2 e pode ser utilizada como alternativa para estudos epidemiológicos e correlações interespecies.

RESEARCH ARTICLE

Validation of conventional PCR-like alternative to SARS-CoV-2 detection with target nucleocapsid protein gene in naso-oropharyngeal samples

Rogério Fernandes Carvalho¹✉*, Monike da Silva Oliveira²✉, Juliane Ribeiro³‡, Isac Gabriel Cunha dos Santos¹✉, Katyane de Sousa Almeida¹‡, Ana Carolina Muller Conti¹✉, Bruna Alexandrino¹‡, Fabrício Souza Campos⁴‡, Célia Maria de Almeida Soares²‡, José Carlos Ribeiro Júnior¹✉

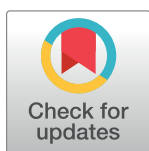
1 Laboratory of Microbiology, Federal University of North Tocantins, Araguaína, Tocantins, Brazil,

2 Laboratory of Molecular Biology, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil, **3** Laboratory of Virology and Molecular Biology, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil, **4** Laboratory of Bioinformatics and Biotechnology, Federal University of Tocantins, Gurupi, Tocantins, Brazil

✉ These authors contributed equally to this work.

‡ These authors also contributed equally to this work

* fcrogeriofc@hotmail.com



OPEN ACCESS

Citation: Carvalho RF, Oliveira MdS, Ribeiro J, dos Santos IGC, Almeida KdS, Conti ACM, et al. (2021) Validation of conventional PCR-like alternative to SARS-CoV-2 detection with target nucleocapsid protein gene in naso-oropharyngeal samples. PLoS ONE 16(9): e0257350. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257350>

Editor: Jean-Luc EPH Darlix, "INSERM", FRANCE

Received: April 9, 2021

Accepted: August 29, 2021

Published: September 23, 2021

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257350>

Copyright: © 2021 Carvalho et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its [Supporting information](#) files.

Abstract

SARS-CoV-2 has spread worldwide and has become a global health problem. As a result, the demand for inputs for diagnostic tests rose dramatically, as did the cost. Countries with inadequate infrastructure experience difficulties in expanding their qPCR testing capacity. Therefore, the development of sensitive and specific alternative methods is essential. This study aimed to develop, standardize, optimize, and validate conventional RT-PCR targeting the N gene of SARS-CoV-2 in naso-oropharyngeal swab samples compared to qPCR. Using bioinformatics tools, specific primers were determined, with a product expected to be 519 bp. The reaction conditions were optimized using a commercial positive control, and the detection limit was determined to be 100 fragments. To validate conventional RT-PCR, we determined a representative sampling of 346 samples from patients with suspected infection whose diagnosis was made in parallel with qPCR. A sensitivity of 92.1% and specificity of 100% were verified, with an accuracy of 95.66% and correlation coefficient of 0.913. Under current Brazilian conditions, this method generates approximately 60% savings compared to qPCR costs. Conventional RT-PCR, validated herein, showed sufficient results for the detection of SARS-CoV-2 and can be used as an alternative for epidemiological studies and interspecies correlations.

Introduction

Coronavirus (CoV) belongs to the family *Coronaviridae* and is found in various animals and humans. In late 2019 and early 2020, the etiological agent of the new Wuhan pneumonia in

Funding: This work was supported by the Pro-Reitoria de Pesquisa of the Federal University of Tocantins, Prefeitura Municipal de Araguaína, Tocantins, Brazil and by Postgraduate Program in Animal Health and Public Health of Federal University of North Tocantins. JCRJ was the only recipient of this financial support. This study was also partially funded by the researchers.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

China was identified as severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) [1]. Since then, SARS-CoV-2 has spread worldwide and has become a global health problem, causing coronavirus disease 2019 (COVID-19). As of August 7, 2021, more than 562,000 people have died in Brazil due to complications of COVID-19, being the country with the second highest number of deaths. Worldwide, the 20 countries with the highest death counts have collectively more than 3 million deaths [2].

SARS-CoV-2 is a simple positive-sense enveloped RNA virus that encodes the spike (S), envelope (E), membrane (M), and nucleocapsid (N) as structural proteins [1]. Coronavirus nucleocapsid protein has a structural role as it forms a ribonucleoprotein complex with gRNA and also has RNA chaperone activity [3]. This protein also has an important antigenic action in the formation of specific antibodies in natural infection [4].

The World Health Organization (WHO) recommends the use of real-time PCR (qPCR) for the diagnosis of SARS-CoV-2, using different protocols aimed at detecting genes of non-structural and structural proteins, especially the N gene [5].

However, qPCR inputs and equipment are notoriously scarce with the increase in worldwide demand, especially in countries dependent on imports of these resources [6, 7], such as Brazil. This difficulty in accessing diagnostic resources leads to the underreporting of cases [8]. Countries that implemented greater diagnostic coverage in the monitoring of their populations were able to control the dispersion of the disease more efficiently [9].

Some alternatives to qPCR have been proposed by different researchers and may present sufficient performance to increase the supply of diagnostic resources for SARS-CoV-2 in countries with inadequate infrastructure [7], or for studies of interspecies epidemiological correlations that are yet unclear. Conventional PCR preceded by reverse transcription may be one such alternative [7]. Therefore, the present study aimed to develop, standardize, optimize, and validate a conventional RT-PCR method targeting the N gene of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal and oropharyngeal swab samples.

And in the end, the conventional RT-PCR for the diagnosis of SARS-CoV-2 proved to be an alternative tool for expanding population testing, with significant sensitivity and specificity.

Material and methods

Primers were established using the genomic sequence available in GenBank (accession number MT081066) for the N gene, according to the protocols developed and recommended by the WHO for detection of SARS-CoV-2, using Primer 3 (<http://primer3.ut.ee/>) and Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) programs. Two sets of forward and reverse primers were evaluated, the most sensitive being N1-F (5'-GGTTCACCTCTCTCACTCAA-3') and N2-R (5'-CAAGCAGCAGCAAAAGCAAGA-3'), with an expected product of 519 bp.

Amplification conditions were optimized in a gradient (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) with a positive commercial control for the N gene (2019-NCOV_N Positive Control Kit, Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA; 200,000 copies/ μ L) and determined with cycle conditions of 94°C for 5 min; 40 cycles of 94°C for 45 s, 52°C for 45 s, and 72°C for 1 min; and a final extension cycle at 72°C for 10 min. To determine the detection limit of the proposed method, commercial positive control aliquots were serially diluted in TE buffer (Tris-HCl [10mM]; EDTA [1 mM]). PCR products were subjected to electrophoresis in 2% agarose, followed by ethidium bromide staining (0.2 mg/mL). The readings were performed under ultraviolet light.

In the validation trial, the sample size was determined for 346 volunteers with suspected COVID-19 infection. The calculation of the sample universe was performed using EpiInfo

7.2.4 (CDC, Atlanta, GA, USA) with a 95% confidence interval, 5% standard error, 90% estimated sensitivity, and 10% disease prevalence among suspected cases (epidemiological data made available by the municipality of Araguaína, Tocantins, Brazil, on May 4, 2020), and the population of the municipality of Araguaína was estimated at 180,470 inhabitants [10].

Samples were collected from August 24 to September 10, 2020. The participants of this study were classified as suspected to have COVID-19 by the municipal medical service and were referred for sample collection for official diagnosis in Tocantins. Three rayon swabs (bilateral nasopharyngeal and simple oropharyngeal) were collected, stored in a Falcon tube with 3 mL of saline solution at 0.9%, and refrigerated at 2–8°C.

The official diagnosis involved qPCR (gold standard) performed at the COVID-19 Diagnostic Support Unit of the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) in Rio de Janeiro, Brazil, using the Berlin Protocol. Patients with $Ct \leq 40$ for the E gene and $Ct \leq 35$ for the RdRp region were considered COVID-19-positive.

Patients referred for official diagnosis were invited to voluntarily participate in this research. For this, a second set of samples was collected from the same patients using the same collection procedure. The samples were sent to the Microbiology Laboratory of the Federal University of North Tocantins, Araguaína University campus, where they were processed within 24 h.

RNA extraction was performed using a commercial kit (QIAamp Viral RNA Mini Kit, Qia-gen, Valencia, CA, USA) in an NB2 biological safety booth. The extracted product was reverse transcribed using a commercial kit (SuperScript III First-Strand Synthesis System, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. The RT products (4 μ L) were subjected to PCR with a commercial kit (Platinum Hot-Start PCR Master Mix, Invitrogen) together with primers (20 pmol) established for the N gene of SARS-CoV-2. The reactions were amplified according to the optimized protocol with the commercial positive control and individually paired with a positive control reaction at a concentration of 1,000 fragments.

For statistical correlation of agreement between the methods (qPCR and conventional RT-PCR), the Kappa test was performed using BioEstat 5.3. Samples positive for RT-PCR were randomly selected for sequencing by the Sanger method (ABI 3500 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in both directions after purification (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega, Southampton, UK) of the amplified products. Sequence quality was evaluated using BioEdit v. 7.2.5 [11], and consensus sequences were generated by CAP 3 [12]. These sequences were individually aligned using Clustal W and the representative sequences from GenBank, and genetic similarity was analyzed via the neighbor-joining method and the Tamura-Nei model using 1,000 bootstrap replications in MEGA X software [13].

The study was submitted and approved by the Brazilian National Committee of Ethics and Research (no. 33350720.9.0000.5519) before the research was conducted. Only older patients (≥ 18 years of age) were included in the study and the consent was verbatim attested to when signing the Informed Consent Form according with Brazilian National Committee of Ethics.

Results and discussion

In determining the detection limit, it was verified that RT-PCR was sensitive to 100 copies of the N gene. Therefore, the proposed method has good sensitivity even though it has a higher detection limit than qPCR. This detection capability is considered satisfactory because the viral load in the naso-oropharyngeal cavities is high and significant. Previous studies have shown 17,429 copies in scars, 2,552 copies in pharyngeal swabs, and 651 copies in nasal swabs

Table 1. Comparison between the results of samples processed by qPCR and samples processed by conventional RT-PCR.

		Gold Standard (qPCR)		Total
		Positive	Negative	
Conventional RT-PCR	Positive	179	0	179
	Negative	15	152	167
	Total	194	152	346

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257350.t001>

[14]. Another study showed viral load among positive patients ranging from 641 to 1.34×10^{11} copies [15].

In qPCR, with a target in the RdRp region, 3.8 copies of RNA can be detected [16]. In LAMP, the limit of detection can reach one copy of viral RNA, while Penn-RAMP studies can detect as few as seven copies of viral RNA per reaction [17]. In studies with multiplex qPCR (N1 and N2), it was possible to detect as little as five copies per reaction [18]. In another study using qRT-PCR, the detection limit for the N gene was 10 copies per reaction [19]. Thus, it was expected that, in patients with a low viral load in nasopharyngeal or oropharyngeal samples or in cases with a problem that compromised the quality and amplitude of the collection, the sensitivity of conventional RT-PCR would be lower than that of qPCR.

Of the 346 clinical samples of patients tested by qPCR, 194 were detectable and 152 were non-detectable. The analysis using conventional RT-PCR was in agreement with the gold standard in 331 samples. Among the 15 discordant samples, 15 false-negative and non-false-positive samples were observed, as shown in Table 1.

The Brazilian legislation for validation of qualitative analytical methods of identification [20] only indicated a criterion for selectivity. The results showed that the specificity of conventional RT-PCR was 100%, the sensitivity was 92.27%, and the accuracy was 95.66%. The false-positive and false-negative rates were 0% and 8.98%, respectively (Table 2). A preliminary study conducted in 2020 in Brazil with 116 samples, which compared conventional RT-PCR with qPCR, showed 92.1% sensitivity and 100% specificity for conventional RT-PCR [7].

Four samples were randomly selected for sequencing the amplified products. All products were confirmed as SARS-CoV-2 (GenBank accession numbers MW281570, MW281571, MW281572, and MW281573). The phylogenetic tree of Brazilian samples, in relation to those deposited in GenBank in different countries, is shown in Fig 1. Thus, the method presented 100% specificity among the study samples, demonstrating the ability of the method to not detect other possible viruses or contaminants in the matrix evaluated in the present study.

Upon correlating the methods, a coefficient of 0.9129 was obtained. According to Landis and Koch [21], values between 0.81 and 1.00 indicate a high correlation. This coefficient indicated 95.66% agreement between the methods. Thus, conventional RT-PCR for the diagnosis of SARS-CoV-2, developed and validated by the present study, can be used as an alternative

Table 2. Calculations of the validation parameters of classical RT-PCR in relation to the qPCR for SARS-CoV-2.

	Evaluation of Conventional RT-PCR	
	No	
False-positive rate		(0/152)
False-negative rate	8.98%	(15/167)
Specificity	100% (CI: 97.54%~100%)	(152/152)
Sensitivity	92.27% (CI: 87.64%~95.26%)	(179/194)
Accuracy	95.66%	(179+152/346)
Detection threshold	100 copies	-

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257350.t002>

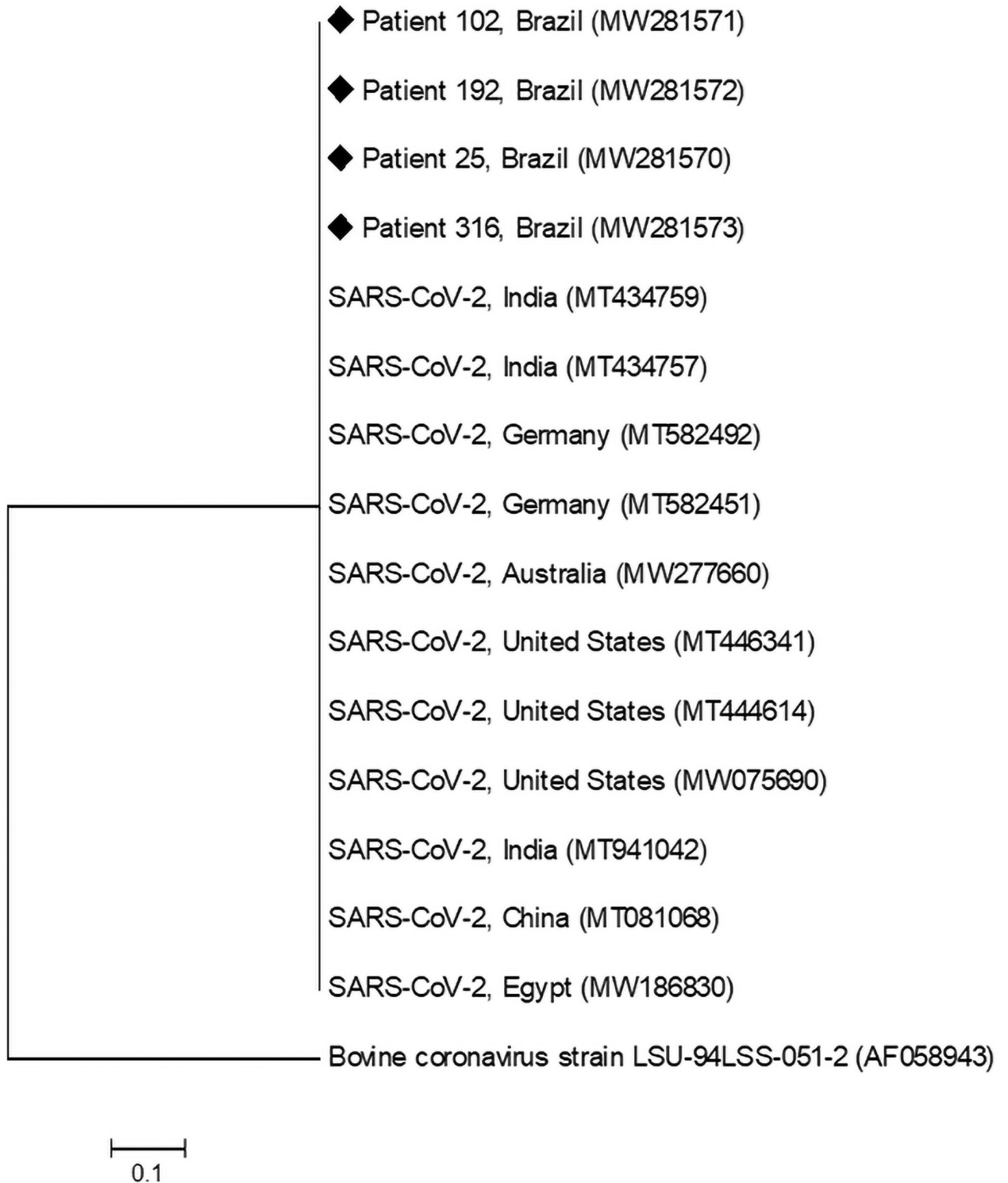


Fig 1. Phylogenetic tree of N gene sequences from SARS-CoV-2 isolated in several countries and Brazil (◆).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257350.g001>

tool for expanding population testing, especially in places lacking the infrastructure for qPCR. According to current costs in Brazil, the test proposed herein costs 32% of the value of qPCR. This method can also be an alternative tool for future studies on unclear epidemiological correlations between humans and animals, allowing the allocation of qPCR resources for the diagnosis of humans.

Conclusion

The diagnostic method for identifying COVID-19 through conventional RT-PCR was developed, optimized, and validated in terms of specificity and sensitivity using the N gene, and it produced an adequate yield for use in qualitative diagnosis as an alternative to qPCR. As the study used simple and easily acquired commercial kits, easy reproducibility and considerable cost savings are expected.

Supporting information

S1 Dataset.
(XLS)

Author Contributions

Conceptualization: Rogério Fernandes Carvalho, Monike da Silva Oliveira, Juliane Ribeiro, Katyane de Sousa Almeida, Ana Carolina Muller Conti, Bruna Alexandrino, Fabrício Souza Campos, Célia Maria de Almeida Soares, José Carlos Ribeiro Júnior.

Data curation: Monike da Silva Oliveira, Fabrício Souza Campos, José Carlos Ribeiro Júnior.

Formal analysis: Rogério Fernandes Carvalho, Monike da Silva Oliveira, Isac Gabriel Cunha dos Santos, Célia Maria de Almeida Soares, José Carlos Ribeiro Júnior.

Funding acquisition: Monike da Silva Oliveira, José Carlos Ribeiro Júnior.

Investigation: Rogério Fernandes Carvalho, Monike da Silva Oliveira, José Carlos Ribeiro Júnior.

Methodology: Rogério Fernandes Carvalho, Monike da Silva Oliveira, Juliane Ribeiro, Isac Gabriel Cunha dos Santos, Katyane de Sousa Almeida, Ana Carolina Muller Conti, Bruna Alexandrino, José Carlos Ribeiro Júnior.

Project administration: Rogério Fernandes Carvalho, Monike da Silva Oliveira, Isac Gabriel Cunha dos Santos, José Carlos Ribeiro Júnior.

Resources: Monike da Silva Oliveira, José Carlos Ribeiro Júnior.

Software: Rogério Fernandes Carvalho, Monike da Silva Oliveira, José Carlos Ribeiro Júnior.

Supervision: Rogério Fernandes Carvalho, Monike da Silva Oliveira, Juliane Ribeiro, Katyane de Sousa Almeida, Ana Carolina Muller Conti, Bruna Alexandrino, José Carlos Ribeiro Júnior.

Validation: Rogério Fernandes Carvalho, Monike da Silva Oliveira, José Carlos Ribeiro Júnior.

Visualization: Rogério Fernandes Carvalho, Monike da Silva Oliveira, Juliane Ribeiro, Katyane de Sousa Almeida, Ana Carolina Muller Conti, Bruna Alexandrino, Célia Maria de Almeida Soares, José Carlos Ribeiro Júnior.

Writing – original draft: Rogério Fernandes Carvalho, Monike da Silva Oliveira, José Carlos Ribeiro Júnior.

Writing – review & editing: Rogério Fernandes Carvalho, Monike da Silva Oliveira, Juliane Ribeiro, Katyane de Sousa Almeida, Ana Carolina Muller Conti, Bruna Alexandrino, Fabrício Souza Campos, Célia Maria de Almeida Soares, José Carlos Ribeiro Júnior.

References

1. Wu J, Yuan X, Wang B, Gu R, Li W, Xiang X, et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2: From Gene Structure to Pathogenic Mechanisms and Potential Therapy. *Front Microbiol.* 2020; 11:1576. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01576> PMID: 32719672
2. Brasil. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico 2021; 75(1):1–110. [Cited 2021 Aug 20]. https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/agosto/13/boletim_epidemiologico_covid_75-final-13ago_15h40.pdf. Brazilian.
3. Zúñiga S, Sola I, Moreno JL, Sabella P, Plana-Durán J, Enjuanes L. Coronavirus nucleocapsid protein is an RNA chaperone. *Virology.* 2007; 357(2):215–227. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.07.046> PMID: 16979208
4. Hartley GE, Edwards ES, Aui PM, Varese N, Stojanovic S, McMahon J, et al. Rapid generation of durable B cell memory to SARS-CoV-2 spike and nucleocapsid proteins in COVID-19 and convalescence. *Science immunology.* 2020; 5(54):eabf8891. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abf8891> PMID: 33443036
5. World Health Organization (WHO). Molecular assays to diagnose COVID-19: Summary table of available protocols. [Cited 2020 Dec 22] <https://www.who.int/publications/m/item/molecular-assays-to-diagnose-covid-19-summary-table-of-available-protocols>.
6. Ulloa S, Bravo C, Parra B, Ramirez E, Acevedo A, Fasce R, et al. A simple method for SARS-CoV-2 detection by rRT-PCR without the use of a commercial RNA extraction kit. *J Virol Methods.* 2020; 285:113960. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113960> PMID: 32835738
7. Dorlass EG, Monteiro CO, Viana AO, Soares CP, Machado RRG, Thomazelli LM, et al. Lower cost alternatives for molecular diagnosis of COVID-19: conventional RT-PCR and SYBR Green-based RT-qPCR. *Braz J Microbiol.* 2020; 51(3):1117–23. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00347-5> PMID: 32767275
8. Prado MFD, Antunes BBP, Bastos L, Peres IT, Silva A, Dantas LF, et al. Analysis of COVID-19 under-reporting in Brazil. *Rev Bras Ter Intensiva.* 2020; 32(2):224–8. <https://doi.org/10.5935/0103-507x.20200030> PMID: 32667439
9. Ibrahim NK. Epidemiologic surveillance for controlling Covid-19 pandemic: types, challenges and implications. *J Infect Public Health.* 2020; 13(11):1630–8. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.07.019> PMID: 32855090
10. Brasil Ministério da Economia. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2019. Resolução N° 3, de 26 de Agosto de 2019. Diário Oficial da União, Seção 1, p.374-402. ISSN 1677-7042. [Cited 2021 Jan 15]. Brazilian.
11. Hall TA. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 1999; 41:95–98.
12. Huang X, Madan A. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 1999; 9(9):868–77. <https://doi.org/10.1101/gr.9.9.868> PMID: 10508846
13. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol.* 2018; 35(6):1547–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096> PMID: 29722887
14. Yu F, Yan L, Wang N, Yang S, Wang L, Tang Y, et al. Quantitative Detection and Viral Load Analysis of SARS-CoV-2 in Infected Patients. *Clin Infect Dis.* 2020; 71(15):793–8. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa345> PMID: 32221523
15. Mawaddah A, Gendeh HS, Lum SG, Marina MB. Upper respiratory tract sampling in COVID-19. *Malays J Pathol.* 2020; 42(1):23–35. PMID: 32342928
16. Chan JF, Yip CC, To KK, Tang TH, Wong SC, Leung KH, et al. Improved Molecular Diagnosis of COVID-19 by the Novel, Highly Sensitive and Specific COVID-19-RdRp/Hel Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay Validated In Vitro and with Clinical Specimens. *J Clin Microbiol.* 2020; 58(5). <https://doi.org/10.1128/JCM.00310-20> PMID: 32132196

17. Kashir J, Yaqinuddin A. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-19. *Med Hypotheses*. 2020; 141:109786. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109786> PMID: 32361529
18. Petrillo S, Carra G, Bottino P, Zanotto E, De Santis MC, Margaria JP, et al. A Novel Multiplex qRT-PCR Assay to Detect SARS-CoV-2 Infection: High Sensitivity and Increased Testing Capacity. *Microorganisms*. 2020; 8(7). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071064> PMID: 32708870
19. Baek YH, Um J, Antigua KJC, Park JH, Kim Y, Oh S, et al. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification as a rapid early-detection method for novel SARS-CoV-2. *Emerg Microbes Infect*. 2020; 9(1):998–1007. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1756698> PMID: 32306853
20. Brasil Ministério da Saúde. 24 de julho de 2017. Resolução da Diretoria Colegiada—RDC N° 166. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. [Cited 2020 Oct 30]. <https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&data=25/07/2017&pagina=87>. Brazilian.
21. Landis JR, Koch GG. An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. *Biometrics*. 1977; 33(2):363–74. PMID: 884196

Capítulo III

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A RT-PCR convencional desenhada e otimizada em laboratório cumpriu o proposto em ser uma alternativa diagnóstica frente a RT-qPCR, visto que a validação conseguiu um excelente índice de correlação entre os métodos e respeitou os parâmetros exigidos na legislação brasileira.

O método apresentou um limite de detecção maior que a RT-qPCR e mesmo assim foi capaz de alcançar uma sensibilidade de 92,27%. Na situação de pacientes que apresentem uma baixa carga viral na região naso e orofaríngea, o método validado consegue ser eficaz o suficiente para detectá-los.

É exigido no Brasil que os métodos de diagnósticos qualitativos comprovem a seletividade do método (RDC 166/2017) e o estudo conseguiu fornecer 100% de especificidade nos resultados. Evidenciando assim que possíveis contaminantes na solução ou outros vírus na amostra não interferiram nos resultados do estudo. Sendo assim, a aplicabilidade do método é segura e com uma mão de obra pouco especializada para qualquer unidade de saúde minimamente estruturada.

A aplicação dessa metodologia traz um grande avanço porque quebra o viés econômico de um diagnóstico mais caro e entrega uma tecnologia robusta, segura e de fácil aplicabilidade. Os custos podem variar devido a demanda e o câmbio, mas foi possível estimar uma economia de mais de 60% nos reagentes e materiais descartáveis, sendo que a parte instrumental do estudo corresponde a 10% da RT-qPCR.

Já no campo epidemiológico, a testagem facilitada acarreta o monitoramento da distribuição geográfica da doença e oportuniza o enfrentamento, bem como o planejamento de estratégias de contenção.

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Validação do método de Multiplex PCR para diagnóstico de SARS-CoV-2 utilizando os genes da fosfoproteína do nucleocapsídeo (N) e a região RdRp do gene orf1ab

Pesquisador: JOSE CARLOS RIBEIRO JUNIOR

Área Temática: A critério do CEP

Versão: 1

CAAE: 33350720.9.0000.5519

Instituição Proponente: Fundação Universidade Federal do Tocantins - Campus de Araguaína

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.104.195

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1540989.pd, de 20/05/2020) e/ou do Projeto Detalhado (Projeto_de_pesquisa.docx, de 20/05/2020).

INTRODUÇÃO

O novo Coronavírus (SARS-CoV-2) é um dos principais responsáveis pelos casos síndrome respiratória aguda severa (SARS) na atualidade. Os primeiros casos surgiram na cidade de Wuhan, China, em 2019 e foi classificada como pandêmica pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em março de 2020. Variantes diferentes de estirpes virais vem sendo descritas (Chen et al., 2020). A infecção, não causando SARS, é conhecida como COVID19. Esse vírus é caracterizado por ser envelopado, com genoma RNA fita simples positiva, pertencente à família Coronaviridae (Zhu et al., 2020). Essa família é caracterizada pela preservação do gene que codifica a proteína do núcleo capsídeo viral (N), assim como outras regiões do genoma, como a região RdRp do gene orf1ab, vem sendo descritas pelo Centro de Controle de Doenças (CDC) e OMS como estáveis entre as estirpes causadoras de COVID19. Por isso, a detecção da partícula viral na fase aguda de evolução da doença é priorizada por métodos biomoleculares (Corman et al., 2020). A OMS recomenda a

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 4.104.195

utilização do método de real-time reação em cadeia da polimerase antecedida de transcrição reversa (RT-qPCR) para diagnóstico de COVID19 por ser um método de alta sensibilidade e especificidade, utilizando como protocolo padrão o estudo de Liu et al. (2020), que recomenda a pesquisa do gene que codifica a proteína N. Além disso, estão sendo utilizados vários kits rápidos de diagnóstico baseado na detecção de imunoglobulinas de fase aguda (IgM) e crônica (IgG) (Lau et al., 2020; Zhang et al., 2020). Sua sensibilidade e especificidade, no entanto, são inferiores ao diagnóstico molecular. A RT-qPCR, apesar de alta sensibilidade e especificidade para diagnóstico da fase aguda de infecção, é um método cuja execução é laboriosa, exige reagentes importados específicos de alto custo e equipe técnica altamente habilitada. Na ocasião de grande demanda internacional oriunda do estado pandêmico, é verificada escassez desses insumos no mercado. No Brasil, poucos laboratórios possuem essa metodologia padronizada para diagnóstico de SARS-CoV-2, o que está ocasionando sobrecarga dos laboratórios e, conseqüentemente, subnotificação de casos. Os métodos imunológicos, de acesso mais facilitado, são capazes de diagnosticar o paciente somente após sete dias dos sinais clínicos, tempo necessário para a presença de IgM quantificável (Zhang et al., 2020). Sabe-se que, como a COVID19 tem evolução aguda e, muitas vezes progressiva, é necessário que a detecção do agente viral seja realizada o mais breve possível, para que sejam tomadas as medidas de isolamento e intervenção médica. Dessa forma, desenvolver métodos de execução rápida e menos laboriosa, com sensibilidade e especificidade para SARS-CoV-2, que exijam menor demanda dos escassos reagentes utilizados na RT-qPCR e com capacidade de detecção do agente no início dos sinais clínicos é fundamental para garantir o diagnóstico, monitoramento, controle e prevenção da dispersão da doença na população.

HIPÓTESE

A PCR Multiplex dos genes da fosfoproteína do nucleocapsídeo (N) e a região RdRp do gene orf1ab é eficiente para diagnóstico de SARS-CoV-2 em pacientes em fase aguda.

METODOLOGIA

Local e período da realização da pesquisa: A coleta de amostras de suabes oro e nasofaríngeo será realizada pela equipe médica e de enfermagem previamente treinadas da UBS JK, localizada na rua Araguaci, quadra 14, bairro JK; UBS Albeny Soares, na Avenida C, nº 1035, no Setor Couto Magalhães (referências para triagem e casos leves); Unidade de Pronto Atendimento (UPA) Araguaína Sul, R. dos Pinheiros, 1018, Setor Araguaína Sul; e, Hospital de Doenças Tropicais (HDT), Rua José de Brito Soares, nº 1015, Setor Anhanguera, referência para casos moderados de

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.104.195

COVID19, todos em Araguaína-TO. As coletas serão realizadas no período de julho a setembro de 2020. Como procedimento de rotina diagnóstica em protocolo recém estabelecido, as amostras já são encaminhadas ao Laboratório Central do Estado do Tocantins, em Palmas, onde são analisadas pelo padrão ouro (RT-qPCR). O profissional médico ou enfermeiro responsável pelo atendimento primário e solicitante da coleta irá apresentar o TCLE, esclarecendo a pesquisa ao paciente para obtenção do seu consentimento e sua participação será voluntária. Dessa forma, paralelamente do diagnóstico de rotina (padrão ouro – RT-qPCR), um outro conjunto dos mesmos suabes será encaminhado sob refrigeração ao Laboratório de Cultivo Celular do Centro de Ciências da Saúde da UFT-Araguaína, possuidor de estrutura de biossegurança NB2. A capela de biossegurança NB2 desse laboratório filtra e retira o ar do interior da câmara interna para o meio externo, impedindo a contaminação aerógena dos analistas, e é esterilizada por luz ultravioleta antes e depois de cada uso. Essa estrutura é necessária para garantir a segurança biológica dos analistas e das amostras, que também farão uso dos mesmos equipamentos de proteção dos responsáveis pela coleta, descritos anteriormente. A equipe de resposta rápida do HDT-UFT fará o treinamento de biossegurança dos analistas de laboratório quanto ao uso de EPIs. Nesse laboratório as amostras serão armazenadas de 4 a 8°C por, no máximo, 48 horas em geladeira própria e exclusiva para o fim, previamente desinfetada. Sob condições de biossegurança nível NB2 serão realizados: extração de RNA viral através de kits comerciais (Bioclin DNA/RNA Kit de extração), quantificação do produto extraído (Qubit), tratamento com a transcriptase reversa (Superscript III, Invitrogen, USA) e submetidos à amplificação de PCR Multiplex então otimizada utilizando controle positivo comercial (IDT, USA). Uma alíquota desse extraído será submetida à ação da enzima T7 RNA polimerase (Invitrogen), conforme as recomendações do fabricante, para verificar se esse aumento das partículas de RNA na amostra extraída pode influenciar positivamente na sensibilidade do método de PCR Multiplex. Toda manipulação das amostras biológicas de paciente será realizada no Laboratório de Cultivo Celular do Centro de Ciências da Saúde de UFT-Araguaína e não serão transferidas a outro local até a destruição por autoclavagem, já descrita. Todos os produtos de amplificação das duas regiões pesquisadas (N e RdRp), já sem potencial infectante ao analista uma vez que se trata de um fragmento do material genético da partícula viral, serão purificados e quantificados conforme anteriormente descrito e sequenciadas pelo método de Sanger (3500 Series Genetic Analyzer, Applied Biosystems) no Laboratório de Higiene e Saúde Pública da Universidade Federal do Tocantins, também em Araguaína. As sequências terão a qualidade analisada em Phred (Electropherogram Quality Analysis, Embrapa Recursos Genéticos), verificadas com o Blast Tool (NCBI) e alinhadas com as outras sequências disponíveis no GenBank no software

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.104.195

Mega v. 10 para reconstrução filogenética. Todas as etapas serão acompanhadas pelo coordenador e pela equipe médica dessa proposta.

Amostra à ser estudada: Serão avaliados 346 pacientes classificados pela equipe médica de assistência primária como suspeitos de COVID19, utilizando o protocolo já estabelecido pelo Ministério da Saúde.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Prévia classificação como caso suspeito de COVID19 pelo protocolo estabelecido pela Secretaria de Atenção Primária à Saúde do Ministério da Saúde: febre ($>37,8^{\circ}\text{C}$), tosse, dispnéia, mialgia, fadiga, sintomas respiratórios superiores ou sintomas gastrointestinais, como diarreia (mais raros) (Brasil, 2020); até 7 dias de início de sinais clínicos de infecção do sistema respiratório superior; e, selecionado para encaminhamento de amostra para detecção oficial por qPCR, para que se obtenha resultados dos dois métodos (RT-qPCR e PCR Multiplex) dos mesmos pacientes. A amostragem será randômica em relação à sexo, idade e outros.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Pacientes com sinais clínicos a mais de 7 dias, que não seja selecionado para encaminhamento de amostras para o diagnóstico oficial por RTqPCR, que não seja classificado como caso suspeito de COVID19 e que não dê o seu consentimento para coleta de amostra para o projeto, são critérios de exclusão.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL

Desenvolver, padronizar e validar a PCR Multiplex convencional para detecção simultânea dos genes N e orf1b do coronavírus humano causador da Síndrome Respiratória Aguda Severa como alternativa ao RT-qPCR.

OBJETIVOS PRIMÁRIOS

1. Otimizar primers, a reação de PCR e as condições de amplificação utilizando controle positivo comercial para os genes da fosfoproteína do nucleocapsídeo (N) e a região RdRp do gene orf1ab;
2. Comparar e estabelecer o kit comercial de extração de RNA viral com maior recuperação de RNA;
3. Verificar o impacto da utilização da enzima T7 RNA polimerase para aumento da sensibilidade do método Multiplex PCR;

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 4.104.195

4. Determinar a especificidade pelo sequenciamento do DNA amplificado;
5. Validar o método de Multiplex PCR pela comparação com a análise de RT-qPCR em amostras de pacientes suspeitos triados pelas UBS ao HDT-Araguaína.

OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Disponibilizar o método validado aos órgãos de vigilância em saúde para aplicação em uma rede maior de laboratórios, aumentando a detecção de pacientes e o monitoramento de distribuição nacional da doença.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

Considerando a Resolução 466/12 CNS/MS, os riscos dessa pesquisa são: desconforto físico adicional ao participante da pesquisa devido à realização de uma segunda coleta de material na cavidade nasal e orofaríngea; risco de contaminação dos membros da equipe de pesquisa devido à manipulação das amostras; perda e destruição (não intencional) da amostra do paciente; gerar desconforto psicológico ao paciente pelo tempo adicional dedicado ao esclarecimento da pesquisa durante a consulta médica; perda de sigilo dos dados e risco psicológico ao paciente pela divulgação contraditória e inadvertida dos dados; perda de sigilo de dados e risco de alteração da conduta terapêutica pelos profissionais envolvidos no tratamento do paciente, mas não relacionados à pesquisa; gerar uma expectativa (ansiedade) no paciente em relação ao seu resultado no novo teste diagnóstico; gerar prejuízos das atividades funcionais (assistenciais) dos profissionais de saúde em detrimento da sua participação no projeto de pesquisa.

BENEFÍCIOS

O benefício do paciente em participar dessa pesquisa é colaborar com a saúde coletiva. O fornecimento de amostras para esse projeto permitirá validar um método rápido, de custo reduzido e com acurácia necessária para o diagnóstico de outros pacientes, após a devida regulamentação na ANVISA. O diagnóstico rápido e sensível, de baixo custo, implicará em melhoria das questões sanitárias de controle infectocontagioso da COVID19 além de economia direta de recursos do sistema público de saúde. Além disso, com a validação do método aqui proposto, será possível entregar ao sistema público de saúde um método eficiente para desafogar os laboratórios de diagnóstico oficial, com insumos disponíveis no mercado nacional, ampliar a rede de laboratórios para diagnóstico proporcionando a testagem dos pacientes sintomáticos ou não, levantar dados epidemiológicos para fundamentar planos de controle e prevenção, impactando no

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.104.195

número de doentes e, conseqüentemente na redução do número de óbitos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo é um teste de validação de um novo método de diagnóstico de COVID19 por PCR convencional, coletando-se randomicamente amostras de pacientes previamente triados como suspeitos nas UBS, UPA e HDT conforme protocolo preconizado pelo Ministério da Saúde, em paralelo ao diagnóstico de rotina já implantado.

Pretende-se coletar amostras de pacientes triados como suspeitos de COVID19 previamente triados pela equipe de assistência à saúde das UBS e UPA utilizando os protocolos descritos pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2020) para testes confirmatórios já implementados para diagnóstico rápido (imunoglobulinas) e molecular (RT-qPCR) sem intervenção nas medidas já preconizadas pelo serviço de gestão médica. Serão coletados, portanto, duas amostras do mesmo paciente. Uma para o diagnóstico oficial e outra a presente pesquisa. O profissional médico ou enfermeiro responsável pelo atendimento primário e solicitante da coleta irá apresentar o TCLE, esclarecendo a pesquisa ao paciente para obtenção do seu consentimento e sua participação será voluntária.

A coleta será realizada, preferencialmente, até o 3º dia do início dos sintomas, podendo ser estendida até o 7º dia, por profissional de saúde devidamente treinado e em uso de equipamento de proteção individual (EPI) apropriado. Serão coletados três swabs combinados (nasofaringe bicavitário e orofaríngeo) que serão acondicionados em um mesmo tubo contendo de solução fisiológica. Todos esses materiais (kit de coleta) serão fornecidos pelos pesquisadores e não acarretarão nenhum custo financeiro ao serviço público de saúde.

As amostras biológicas serão utilizadas somente para as finalidades previstas no estudo e, ao final do mesmo, o material coletado será descartado com o consentimento do participante da pesquisa no TCLE.

Previsão de início do estudo: 01/06/2020

Previsão de encerramento do estudo: 30/11/2020.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

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

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.104.195

Recomendações:

1. Quanto ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, referente ao arquivo "TCLE.pdf" postado na Plataforma em 20/05/2020:

1.1. Solicita-se inserir no TCLE a explicitação acerca do direito de buscar indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa (Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.3.h).

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram encontrados óbices éticos nos documentos (Vide campo Recomendação).

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1540989.pdf	20/05/2020 13:40:14		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_pesquisa.docx	20/05/2020 13:38:53	JOSE CARLOS RIBEIRO JUNIOR	Aceito
Brochura Pesquisa	Projeto_de_pesquisa.pdf	20/05/2020 13:35:20	JOSE CARLOS RIBEIRO JUNIOR	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	declaracao_material_biologico.pdf	20/05/2020 13:26:40	JOSE CARLOS RIBEIRO JUNIOR	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	20/05/2020 13:20:43	JOSE CARLOS RIBEIRO JUNIOR	Aceito

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.104.195

Declaração de concordância	Compromisso_coordenador.pdf	20/05/2020 13:16:38	JOSE CARLOS RIBEIRO JUNIOR	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia_HDT.pdf	20/05/2020 13:15:44	JOSE CARLOS RIBEIRO JUNIOR	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Concordancia_Prefeitura.pdf	20/05/2020 13:15:04	JOSE CARLOS RIBEIRO JUNIOR	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_Responsabilidade_Vanusso.pdf	20/05/2020 13:11:56	JOSE CARLOS RIBEIRO JUNIOR	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_responsabilidade_Raphaela.pdf	20/05/2020 13:11:46	JOSE CARLOS RIBEIRO JUNIOR	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_responsabilidade_katyane.pdf	20/05/2020 13:11:35	JOSE CARLOS RIBEIRO JUNIOR	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_responsabilidade_Jose_Carlos.pdf	20/05/2020 13:11:20	JOSE CARLOS RIBEIRO JUNIOR	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_Responsabilidade_Isac.pdf	20/05/2020 13:11:06	JOSE CARLOS RIBEIRO JUNIOR	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_responsabilidade_ezio_rodrigues.pdf	20/05/2020 13:10:53	JOSE CARLOS RIBEIRO JUNIOR	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_responsabilidade_diogenes.pdf	20/05/2020 13:10:38	JOSE CARLOS RIBEIRO JUNIOR	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_responsabilidade_Claudia.pdf	20/05/2020 13:08:52	JOSE CARLOS RIBEIRO JUNIOR	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_Responsabilidade_Antonio.pdf	20/05/2020 13:08:35	JOSE CARLOS RIBEIRO JUNIOR	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_responsabilidade_monike.pdf	20/05/2020 13:08:22	JOSE CARLOS RIBEIRO JUNIOR	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_responsabilidade_Bruna.pdf	20/05/2020 13:08:04	JOSE CARLOS RIBEIRO JUNIOR	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	20/05/2020 13:03:50	JOSE CARLOS RIBEIRO JUNIOR	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	20/05/2020 13:02:05	JOSE CARLOS RIBEIRO JUNIOR	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.104.195

BRASILIA, 23 de Junho de 2020

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador(a))

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O(A) Sr.(a) está sendo convidado(a) para participar de um estudo chamado **“Validação do método de Multiplex PCR para diagnóstico de SARS-CoV-2 utilizando os genes da fosfoproteína do nucleocapsídeo (N) e a região RdRp do gene orf1ab”**. Este estudo conta com a participação de pesquisadores (médicos e residentes) do Hospital de Doenças Tropicais (HDT), mestrandos em saúde pública da Universidade Federal do Tocantins (UFT) e é coordenado pelo Prof. Dr. José Carlos Ribeiro Júnior do Curso de Mestrado em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da UFT. O nosso objetivo neste trabalho é desenvolver um novo método para detectar pessoas infectadas com o novo coronavírus (COVID-19) a partir de amostras (secreções) coletadas do nariz e garganta. Também pretendemos avaliar se a eficiência deste novo método é igual daquela do método atualmente utilizado pelas instituições de saúde para diagnóstico de COVID-19. O motivo que nos leva a realizar este trabalho é a necessidade de criar um método mais barato, menos trabalhoso e mais rápido, o que permitiria ser implementado em um número maior de laboratórios e também possibilitaria uma detecção mais precoce das pessoas infectadas na população. Para esta pesquisa, além da primeira coleta de secreção da garganta e nariz realizada rotineiramente pelo serviço de saúde para fins de diagnóstico de infecção, o(a) senhor(a) também será submetido a uma segunda coleta. O material (secreção) desta segunda coleta será utilizado em nossa pesquisa. Em ambos os procedimentos, um cotonete estéril será utilizado para coletar a secreção tanto no interior do seu nariz quanto da sua garganta, o qual será posteriormente colocado dentro de um tubo (também estéril) até sua utilização no laboratório. Um possível risco envolvido com a sua participação nesta pesquisa consistirá em um desconforto físico adicional devido à realização de uma segunda coleta de material. No entanto, para minimizarmos este risco, a coleta deste material será realizada pelo profissional de saúde do hospital treinado para a realização deste procedimento. Outros riscos estão relacionados com perda e destruição (não intencional) da amostra coletada e/ou perda de sigilo dos seus dados. Para evitarmos que isso ocorra, as amostras serão transportadas e armazenadas conforme estabelece o Ministério da Saúde e não será possível identifica-lo(a) a partir do tubo contendo sua amostra. A informação que possibilitará identificá-lo ficará restrita a apenas um pesquisador do estudo. O benefício de sua participação neste estudo é que você contribuirá para o desenvolvimento de um novo método para o diagnóstico do COVID-19. Caso seja demonstrado que este novo método é eficiente, poderemos futuramente disponibilizá-lo para testagem na população com o intuito de melhorar as questões sanitárias de controle infectocontagioso da COVID-19. Além disso, este novo método poderá gerar uma economia direta de recursos do sistema público de saúde, pois como explicamos anteriormente, trata-se de um método mais barato que aquele atualmente utilizado.

Para participar deste estudo o(a) Sr.(a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados danos provenientes desta pesquisa, o Sr.(a) tem assegurado o direito à indenização. O Sr. (a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar, a qualquer tempo, sem quaisquer prejuízos. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma como o Sr.(a) é atendido(a) pelos profissionais de saúde. Os resultados obtidos pela pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada (novembro de 2020). Seu nome ou qualquer dado, material ou registro que indique sua participação no estudo não será liberado sem a sua permissão. O(A) Sr.(a) não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, na Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFT

(EMVZ-UFT), e a outra será fornecida ao Sr.(a). O termo mencionado e outros dados que comprovem a sua participação neste estudo ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos no Laboratório de Microbiologia da EMVZ-UFT e, após esse tempo, serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Eu, _____, portador do CPF _____ fui informado(a) dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa **“Validação do método de Multiplex PCR para diagnóstico de SARS-CoV-2 utilizando os genes da fosfoproteína do nucleocapsídeo (N) e a região RdRp do gene orflab”**, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar. Além disso, concordo que o meu material (secreção de nariz e garganta) seja utilizado somente para esta pesquisa e que, ao final da mesma, o mesmo será descartado.

Declaro que concordo em participar desta pesquisa. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido assinado por mim e pelo pesquisador, que me deu a oportunidade de ler e esclarecer todas as minhas dúvidas.

Nome do Participante:

Data:

ASSINATURA DO PARTICIPANTE

Nome do Pesquisador Responsável: José Carlos Ribeiro Júnior

Endereço: Escola de Medicina Veterinária - Universidade Federal do Tocantins, BR 153 Km 112 - Zona Rural

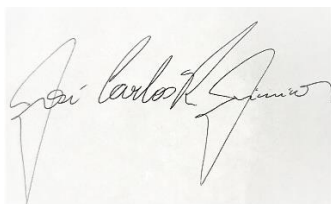
CEP: 77804-970

Cidade: Araguaína - TO

Telefone Fixo: (63) 3416 5426

Telefone Celular: (63) 99295 8288

E-mail: jcribeiro@uft.edu.br



19 de agosto de 2020.

Prof. Dr. José Carlos Ribeiro Júnior

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Hospital de Doenças Tropicais - UFT

Rua José de Brito, nº 1015 - Setor Anhanguera

CEP 77.818-530

Araguaína-TO

Tel.: (63) 3413-8642

E-mail: cep.hdt@ebserh.gov.br

Apêndice 3 – Tabulação dos resultados das amostras testadas

Sample ID (Intralaboratory)	RT-qPCR result (gold standard)	Conventional PCR	Final result	GenBank Acession
1	not detectable	Negative	Negative	
2	detected	Negative	false Negative	
3	not detectable	Negative	Negative	
4	not detectable	Negative	Negative	
5	detected	Positive	Positive	
6	detected	Positive	Positive	
7	not detectable	Negative	Negative	
8	detected	Positive	Positive	
9	detected	Positive	Positive	
10	detected	Positive	Positive	
11	detected	Positive	Positive	
12	detected	Positive	Positive	
13	detected	Positive	Positive	
14	not detectable	Negative	Negative	
15	not detectable	Negative	Negative	
16	detected	Positive	Positive	
17	detected	Positive	Positive	
18	detected	Positive	Positive	
19	not detectable	Negative	Negative	
20	not detectable	Negative	Negative	
21	not detectable	Negative	Negative	
22	detected	Positive	Positive	
23	detected	Positive	Positive	
24	not detectable	Negative	Negative	
25	detected	Positive	Positive	MW281570
26	not detectable	Negative	Negative	
27	not detectable	Negative	Negative	
28	detected	Positive	Positive	
29	detected	Positive	Positive	
30	detected	Positive	Positive	
31	not detectable	Negative	Negative	
32	detected	Positive	Positive	
33	detected	Positive	Positive	
34	detected	Positive	Positive	
35	not detectable	Negative	Negative	
36	detected	Positive	Positive	
37	detected	Positive	Positive	
38	detected	Positive	Positive	
39	detected	Positive	Positive	
40	not detectable	Negative	Negative	
41	not detectable	Negative	Negative	
42	not detectable	Negative	Negative	
43	not detectable	Negative	Negative	
44	not detectable	Negative	Negative	
45	not detectable	Negative	Negative	
46	not detectable	Negative	Negative	
47	not detectable	Negative	Negative	
48	detected	Positive	Positive	
49	not detectable	Negative	Negative	
50	detected	Positive	Positive	
51	not detectable	Negative	Negative	
52	detected	Negative	false Negative	
53	detected	Positive	Positive	
54	not detectable	Negative	Negative	
55	not detectable	Negative	Negative	
56	detected	Positive	Positive	
57	not detectable	Negative	Negative	
58	not detectable	Negative	Negative	
59	not detectable	Negative	Negative	
60	detected	Positive	Positive	
61	detected	Positive	Positive	
62	detected	Positive	Positive	

63	not detectable	Negative	Negative
64	not detectable	Negative	Negative
65	not detectable	Negative	Negative
66	detected	Positive	Positive
67	detected	Positive	Positive
68	detected	Positive	Positive
69	not detectable	Negative	Negative
70	not detectable	Negative	Negative
71	not detectable	Negative	Negative
72	detected	Positive	Positive
73	not detectable	Negative	Negative
74	detected	Positive	Positive
75	detected	Positive	Positive
76	detected	Positive	Positive
77	not detectable	Negative	Negative
78	detected	Positive	Positive
79	not detectable	Negative	Negative
80	detected	Positive	Positive
81	not detectable	Negative	Negative
82	detected	Positive	Positive
83	not detectable	Negative	Negative
84	not detectable	Negative	Negative
85	detected	Positive	Positive
86	detected	Positive	Positive
87	detected	Positive	Positive
88	detected	Positive	Positive
89	not detectable	Negative	Negative
90	detected	Negative	false Negative
91	not detectable	Negative	Negative
92	detected	Positive	Positive
93	not detectable	Negative	Negative
94	not detectable	Negative	Negative
95	not detectable	Negative	Negative
96	detected	Positive	Positive
97	not detectable	Negative	Negative
98	not detectable	Negative	Negative
99	detected	Positive	Positive
100	not detectable	Negative	Negative
101	not detectable	Negative	Negative
102	detected	Positive	Positive
103	detected	Positive	Positive
104	detected	Positive	Positive
105	detected	Positive	Positive
106	not detectable	Negative	Negative
107	detected	Positive	Positive
108	not detectable	Negative	Negative
109	detected	Positive	Positive
110	not detectable	Negative	Negative
111	detected	Positive	Positive
112	not detectable	Negative	Negative
113	not detectable	Negative	Negative
114	not detectable	Negative	Negative
115	detected	Positive	Positive
116	detected	Positive	Positive
117	not detectable	Negative	Negative
118	detected	Positive	Positive
119	detected	Positive	Positive
120	detected	Positive	Positive
121	not detectable	Negative	Negative
122	detected	Positive	Positive
123	detected	Positive	Positive
124	detected	Negative	false Negative
125	detected	Positive	Positive
126	detected	Positive	Positive

MW281571

127	detected	Positive	Positive
128	detected	Positive	Positive
129	detected	Positive	Positive
130	detected	Negative	false Negative
131	not detectable	Negative	Negative
132	not detectable	Negative	Negative
133	detected	Positive	Positive
134	not detectable	Negative	Negative
135	detected	Positive	Positive
136	detected	Positive	Positive
137	not detectable	Negative	Negative
138	detected	Positive	Positive
139	detected	Positive	Positive
140	detected	Positive	Positive
141	detected	Positive	Positive
142	detected	Positive	Positive
143	detected	Negative	false Negative
144	detected	Positive	Positive
145	detected	Positive	Positive
146	detected	Positive	Positive
147	not detectable	Negative	Negative
148	detected	Negative	false Negative
149	detected	Positive	Positive
150	detected	Positive	Positive
151	not detectable	Negative	Negative
152	detected	Positive	Positive
153	detected	Positive	Positive
154	not detectable	Negative	Negative
155	detected	Positive	Positive
156	not detectable	Negative	Negative
157	detected	Positive	Positive
158	detected	Positive	Positive
159	detected	Positive	Positive
160	detected	Positive	Positive
161	detected	Positive	Positive
162	detected	Positive	Positive
163	detected	Positive	Positive
164	detected	Negative	false Negative
165	detected	Positive	Positive
166	detected	Negative	false Negative
167	detected	Positive	Positive
168	detected	Positive	Positive
169	detected	Positive	Positive
170	detected	Positive	Positive
171	detected	Positive	Positive
172	not detectable	Negative	Negative
173	detected	Positive	Positive
174	not detectable	Negative	Negative
175	detected	Positive	Positive
176	not detectable	Negative	Negative
177	not detectable	Negative	Negative
178	not detectable	Negative	Negative
179	not detectable	Negative	Negative
180	not detectable	Negative	Negative
181	detected	Positive	Positive
182	not detectable	Negative	Negative
183	not detectable	Negative	Negative
184	detected	Positive	Positive
185	detected	Negative	false Negative
186	detected	Positive	Positive
187	not detectable	Negative	Negative
188	detected	Positive	Positive
189	detected	Positive	Positive
190	detected	Positive	Positive
191	detected	Positive	Positive

192	detected	Positive	Positive
193	detected	Positive	Positive
194	detected	Negative	false Negative
195	detected	Positive	Positive
196	not detectable	Negative	Negative
197	detected	Positive	Positive
198	not detectable	Negative	Negative
199	detected	Positive	Positive
200	not detectable	Negative	Negative
201	not detectable	Negative	Negative
202	detected	Positive	Positive
203	detected	Positive	Positive
204	detected	Positive	Positive
205	not detectable	Negative	Negative
206	not detectable	Negative	Negative
207	not detectable	Negative	Negative
208	detected	Positive	Positive
209	not detectable	Negative	Negative
210	detected	Positive	Positive
211	not detectable	Negative	Negative
212	detected	Positive	Positive
213	detected	Positive	Positive
214	not detectable	Negative	Negative
215	not detectable	Negative	Negative
216	detected	Positive	Positive
217	not detectable	Negative	Negative
218	not detectable	Negative	Negative
219	not detectable	Negative	Negative
220	detected	Positive	Positive
221	not detectable	Negative	Negative
222	detected	Positive	Positive
223	not detectable	Negative	Negative
224	not detectable	Negative	Negative
225	detected	Positive	Positive
226	detected	Negative	false Negative
227	not detectable	Negative	Negative
228	not detectable	Negative	Negative
229	not detectable	Negative	Negative
230	not detectable	Negative	Negative
231	detected	Positive	Positive
232	detected	Positive	Positive
233	detected	Negative	false Negative
234	detected	Positive	Positive
235	not detectable	Negative	Negative
236	not detectable	Negative	Negative
237	not detectable	Negative	Negative
238	detected	Positive	Positive
239	detected	Positive	Positive
240	not detectable	Negative	Negative
241	detected	Positive	Positive
242	detected	Positive	Positive
243	detected	Positive	Positive
244	detected	Positive	Positive
245	not detectable	Negative	Negative
246	not detectable	Negative	Negative
247	not detectable	Negative	Negative
248	not detectable	Negative	Negative
249	not detectable	Negative	Negative
250	not detectable	Negative	Negative
251	not detectable	Negative	Negative
252	not detectable	Negative	Negative
253	detected	Positive	Positive
254	not detectable	Negative	Negative
255	detected	Negative	false Negative

256	not detectable	Negative	Negative
257	detected	Positive	Positive
258	not detectable	Negative	Negative
259	not detectable	Negative	Negative
260	detected	Positive	Positive
261	detected	Positive	Positive
262	not detectable	Negative	Negative
263	detected	Negative	false Negative
264	not detectable	Negative	Negative
265	not detectable	Negative	Negative
266	not detectable	Negative	Negative
267	detected	Positive	Positive
268	detected	Positive	Positive
269	detected	Positive	Positive
270	detected	Positive	Positive
271	not detectable	Negative	Negative
272	not detectable	Negative	Negative
273	not detectable	Negative	Negative
274	detected	Positive	Positive
275	detected	Positive	Positive
276	detected	Positive	Positive
277	detected	Positive	Positive
278	detected	Positive	Positive
279	detected	Positive	Positive
280	detected	Positive	Positive
281	not detectable	Negative	Negative
282	not detectable	Negative	Negative
283	detected	Positive	Positive
284	not detectable	Negative	Negative
285	detected	Positive	Positive
286	detected	Positive	Positive
287	not detectable	Negative	Negative
288	detected	Positive	Positive
289	not detectable	Negative	Negative
290	not detectable	Negative	Negative
291	detected	Positive	Positive
292	detected	Positive	Positive
293	not detectable	Negative	Negative
294	detected	Positive	Positive
295	detected	Positive	Positive
296	detected	Positive	Positive
297	detected	Positive	Positive
298	detected	Positive	Positive
299	detected	Positive	Positive
300	detected	Positive	Positive
301	not detectable	Negative	Negative
302	detected	Positive	Positive
303	not detectable	Negative	Negative
304	detected	Positive	Positive
305	detected	Positive	Positive
306	detected	Positive	Positive
307	not detectable	Negative	Negative
308	not detectable	Negative	Negative
309	detected	Positive	Positive
310	detected	Positive	Positive
311	detected	Positive	Positive
312	detected	Positive	Positive
313	not detectable	Negative	Negative
314	detected	Positive	Positive
315	detected	Positive	Positive
317	not detectable	Negative	Negative
316	detected	Positive	Positive
318	detected	Positive	Positive
319	detected	Positive	Positive

320	not detectable	Negative	Negative
321	not detectable	Negative	Negative
322	not detectable	Negative	Negative
323	detected	Positive	Positive
324	detected	Positive	Positive
325	detected	Positive	Positive
326	detected	Positive	Positive
327	not detectable	Negative	Negative
328	not detectable	Negative	Negative
329	detected	Positive	Positive
330	detected	Positive	Positive
331	detected	Positive	Positive
332	not detectable	Negative	Negative
333	not detectable	Negative	Negative
334	not detectable	Negative	Negative
335	detected	Positive	Positive
336	not detectable	Negative	Negative
337	not detectable	Negative	Negative
338	not detectable	Negative	Negative
339	not detectable	Negative	Negative
340	not detectable	Negative	Negative
341	not detectable	Negative	Negative
342	not detectable	Negative	Negative
343	not detectable	Negative	Negative
344	not detectable	Negative	Negative
345	not detectable	Negative	Negative
346	not detectable	Negative	Negative

Apêndice 4 – Registro de sequência genômica no Genbank

Nucleotide

GenBank

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/human/BRA/LabMA_UFT_patient_25/2020 nucleocapsid phosphoprotein (N) gene, partial cds

GenBank: MW281570.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS MW281570 446 bp RNA linear VRL 20-NOV-2020
DEFINITION Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate
SARS-CoV-2/human/BRA/LabMA_UFT_patient_25/2020 nucleocapsid
phosphoprotein (N) gene, partial cds.
ACCESSION MW281570
VERSION MW281570.1
KEYWORDS .
SOURCE Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)
ORGANISM [Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2](#)
Viruses; Riboviria; Orthornavirae; Pisuviricota; Pisoniviricetes;
Nidovirales; Coronaviridae; Orthocoronavirinae;
Betacoronavirus; Sarbecovirus.
REFERENCE 1 (bases 1 to 446)
AUTHORS Ribeiro Junior,J.C., da Silva,M.O., Carvalho,R.F., dos
Santos,I.G.C. and Ribeiro,J.
TITLE Validation of classic PCR target to N gene for detection os
SARS-COV-2 in sasopharyngeal samples
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 446)
AUTHORS Ribeiro Junior,J.C., da Silva,M.O., Carvalho,R.F., dos
Santos,I.G.C. and Ribeiro,J.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (20-NOV-2020) animal health and puplic health, Escola de
Medicina Veterinaria, BR 153 Km 112, Araguaina, Tocantins 77804970,
Brazil
COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES
Location/Qualifiers
source 1..446
/organism="Severe acute respiratory syndrome coronavirus
2"
/mol_type="genomic RNA"
/isolate="SARS-CoV-2/human/BRA/LabMA_UFT_patient_25/2020"
/isolation_source="nasal swab"
/host="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:2697049"
/country="Brazil"
/collection_date="2020-08-28"
[gene](#) <1..446
/gene="N"
[CDS](#) <1..446
/gene="N"
/codon_start=2
/product="nucleocapsid phosphoprotein"
/protein_id="QPG02364.1"
/translation="ALTQHGKEDLKFPRGQGVPIINTNSSPDDQIGYYRRATRRIRGGD
GKMKDLSPRWYFYLLGTGPEAGLPYGANKDGIWVATEGALNTPKDHIQTRNPANNA
IVLQLPQGTTLPKGFYAEGRGGSQASSRSSRSRNSRNSTPGSS"
ORIGIN
1 cgctctcact caacatggca aggaagacct taaattcctt cgaggacaag gcgttccaat
61 taacaccaat agcagtccag atgaccaa atgacctact cgaagagcta ccagacgaat
121 tcgtggtggt gacggtaaaa tgaagatctt cagtccaaga tggatattct actacctagg
181 aactgggcca gaactggac ttcctatgg tgctaacaaa gacggcatca tatgggttgc
241 aactgagga gccttgaata cacaaaaga tcacattggc acccgcaatc ctgctaacaa
301 tgctgcaatc gtgtacaac ttcctcaagg aacaacattg ccaaaaggct tctacgcaga
361 agggagcaga ggcggcagtc aagcctcttc tcgttcctca tcacgtagtc gcaacagttc
421 aagaaattca actccaggca gcagta

//

Nucleotide

GenBank

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/human/BRA/LabMA_UFT_patient_102/2020 nucleocapsid phosphoprotein (N) gene, partial cds

GenBank: MW281571.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS MW281571 235 bp RNA linear VRL 20-NOV-2020
DEFINITION Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate
SARS-CoV-2/human/BRA/LabMA_UFT_patient_102/2020 nucleocapsid
phosphoprotein (N) gene, partial cds.

ACCESSION MW281571

VERSION MW281571.1

KEYWORDS .

SOURCE Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)

ORGANISM [Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2](#)

Viruses; Riboviria; Orthornavirae; Pisuviricota; Pisoniviricetes;
Nidovirales; Coronavirineae; Coronaviridae; Orthocoronavirinae;
Betacoronavirus; Sarbecovirus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 235)

AUTHORS Ribeiro Junior,J.C., da Silva,M.O., Carvalho,R.F., dos
Santos,I.G.C. and Ribeiro,J.

TITLE Validation of classic PCR target to N gene for detection os
SARS-COV-2 in sasopharyngeal samples

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 235)

AUTHORS Ribeiro Junior,J.C., da Silva,M.O., Carvalho,R.F., dos
Santos,I.G.C. and Ribeiro,J.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (20-NOV-2020) animal health and puplic health, Escola de
Medicina Veterinaria, BR 153 Km 112, Araguaina, Tocantins 77804970,
Brazil

COMMENT ##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source

1..235
/organism="Severe acute respiratory syndrome coronavirus
2"
/mol_type="genomic RNA"
/isolate="SARS-CoV-2/human/BRA/LabMA_UFT_patient_102/2020"
/isolation_source="nasal swab"
/host="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:2697049"
/country="Brazil"
/collection_date="2020-08-28"

[gene](#)

<1..>235
/gene="N"

[CDS](#)

<1..>235
/gene="N"
/codon_start=2
/product="nucleocapsid phosphoprotein"
/protein_id="QPG02365.1"
/translation="GIIWVATEGALNTPKDHIGTRNPANNAIIVLQLPQGTTLPKGFY
AEGSRGGSQASSRSSRSRNSSRNSTPGSSKRTS"

ORIGIN

1 cggcatcata tgggttgcaa ctgagggagc cttgaataca caaaagatc acattggcac
61 ccgcaatcct gctaaaatg ctgcaatcgt gctacaactt cctcaaggaa caacattgcc
121 aaaaggcttc tacgcagaag ggagcagagg cggcagtc aa gcctcttctc gttcctcatc
181 acgtagtctgc aacagttcaa gaaattcaac tccaggcagc agtaaacgaa cttct

//

Nucleotide

GenBank

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/human/BRA/LabMA_UFT_paciente_192/2020 nucleocapsid phosphoprotein (N) gene, partial cds

GenBank: MW281572.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS MW281572 349 bp RNA linear VRL 20-NOV-2020
DEFINITION Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate
SARS-CoV-2/human/BRA/LabMA_UFT_paciente_192/2020 nucleocapsid
phosphoprotein (N) gene, partial cds.

ACCESSION MW281572

VERSION MW281572.1

KEYWORDS .

SOURCE Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)

ORGANISM [Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2](#)

Viruses; Riboviria; Orthornavirae; Pisuviricota; Pisoniviricetes;
Nidovirales; Coronaviridae; Orthocoronavirinae;
Betacoronavirus; Sarbecovirus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 349)

AUTHORS Ribeiro Junior, J.C., da Silva, M.O., Carvalho, R.F., dos
Santos, I.G.C. and Ribeiro, J.

TITLE Validation of classic PCR target to N gene for detection of
SARS-CoV-2 in nasopharyngeal samples

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 349)

AUTHORS Ribeiro Junior, J.C., da Silva, M.O., Carvalho, R.F., dos
Santos, I.G.C. and Ribeiro, J.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (20-NOV-2020) animal health and public health, Escola de
Medicina Veterinária, BR 153 Km 112, Araguaina, Tocantins 77804970,
Brazil

COMMENT ##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source

1..349
/organism="Severe acute respiratory syndrome coronavirus
2"
/mol_type="genomic RNA"
/isolate="SARS-CoV-
2/human/BRA/LabMA_UFT_paciente_192/2020"
/isolation_source="nasal swab"
/host="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:2697049"
/country="Brazil"
/collection_date="2020-08-28"
<1..>349
/gene="N"
<1..>349
/gene="N"
/codon_start=3
/product="nucleocapsid phosphoprotein"
/protein_id="OPG02366.1"
/translation="INTNSSPDDQIGYYRRATRRIRGGDGKMKDLSRWYFYLLGTGP
EAGLPYGANKDGIWVATEGALNTPKDHIGTRNPANNAIIVLQLPQGTTLPKGFYAE
SRGGSQASSRSSSR"

[gene](#)

[CDS](#)

ORIGIN

```
1 caattaacac caatagcagt ccagatgacc aaattggcta ctaccgaaga gctaccagac
61 gaattcgtgg tggtagcggg aaaatgaaag atctcagtc aagatgggat ttctactacc
121 taggaactgg gccagaagct ggacttcctc atggtgctaa caaagacggc atcatatggg
181 ttgcaactga gggagccttg aatacaccaa aagatcacat tggcaccggc aatcctgcta
241 acaatgctgc aatcgtgcta caattcctc aaggaacaac attgcaaaa ggcttctacg
301 cagaaggagg cagaggcggc agtcaagcct cttctcgttc ctatcacg
```

//

Nucleotide

GenBank

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/human/BRA/LabMA_UFT_patient_316/2020 nucleocapsid phosphoprotein (N) gene, partial cds

GenBank: MW281573.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS MW281573 515 bp RNA linear VRL 20-NOV-2020
DEFINITION Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate SARS-CoV-2/human/BRA/LabMA_UFT_patient_316/2020 nucleocapsid phosphoprotein (N) gene, partial cds.

ACCESSION MW281573

VERSION MW281573.1

KEYWORDS .

SOURCE Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)

ORGANISM [Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2](#)

Viruses; Riboviria; Orthornavirae; Pisuviricota; Pisoniviricetes; Nidovirales; Coronavirineae; Coronaviridae; Orthocoronavirinae; Betacoronavirus; Sarbecovirus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 515)

AUTHORS Ribeiro Junior, J.C., da Silva, M.O., Carvalho, R.F., dos Santos, I.G.C. and Ribeiro, J.

TITLE Validation of classic PCR target to N gene for detection of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal samples

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 515)

AUTHORS Ribeiro Junior, J.C., da Silva, M.O., Carvalho, R.F., dos Santos, I.G.C. and Ribeiro, J.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (20-NOV-2020) animal health and public health, Escola de Medicina Veterinária, BR 153 Km 112, Araguaina, Tocantins 77804970, Brazil

COMMENT ##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source

1..515
/organism="Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2"
/mol_type="genomic RNA"
/isolate="SARS-CoV-2/human/BRA/LabMA_UFT_patient_316/2020"
/isolation_source="nasal swab"
/host="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:2697049"
/country="Brazil"
/collection_date="2020-08-28"

[gene](#)

<1..>515
/gene="N"

[CDS](#)

<1..>515
/gene="N"
/codon_start=1
/product="nucleocapsid phosphoprotein"
/protein_id="QPG02367.1"
/translation="FTALTIQHGKEDLKFPRGQGVPIINTNSSPDDQIGYRRATRRIIRG
GDGKMKDLSRWYFYLLGTGPEAGLPYGANKDGIWVATEGALNTPKDHIIGTRNPANN
AAIVLQLPQGTTLPKGFYAEGRGGSQASSRSSRSRNSRNSTPGSSKRTSPAKMAG
NGDDAALALLL"

ORIGIN

```
1 ttcaccgctc tcaactcaaca tggcaaggaa gaccttaaat tccctcgagg acaaggcgtt
61 ccaattaaca ccaatagcag tccagatgac caaattggct actaccgaag agctaccaga
121 cgaattcgtg gtggtgacgg taaaatgaaa gatctcagtc caagatggtg tttctactac
181 ctaggaaactg ggccagaagc tggacttccc tatggtgcta acaaagacgg catcatatgg
241 gttgcaactg agggagcctt gaatacacca aaagatcaca ttggcaccg caatcctgct
301 aacaatgctg caatcgtgct acaacttctt caaggaaaca cattgccaac aggcttctac
361 gcagaaggga gcagaggcgg cagtcaagcc tcttctcgtt cctcatcagc tagtcgcaac
421 agttcaagaa attcaactcc aggcagcagt aaacgaactt ctctgctaa aatggctggc
481 aatggcggtg atgctgctct tgctttgctg ctgct
```

//