

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA SAÚDE:
INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

FERNANDA FONSECA RAMOS

**DESENVOLVIMENTO DE TESTE DIAGNÓSTICO NÃO INVASIVO CAPAZ DE
DETECTAR ANTICORPOS ANTI-SARS-COV-2 EM URINA**

BELO HORIZONTE
2022

Fernanda Fonseca Ramos

**DESENVOLVIMENTO DE TESTE DIAGNÓSTICO NÃO INVASIVO CAPAZ DE
DETECTAR ANTICORPOS ANTI-SARS-COV-2 EM URINA**

Versão Final

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadores:

Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

Dra. Fernanda Ludolf Ribeiro

Linha de Pesquisa: Clínica, diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e tropicais

Belo Horizonte

2022

R175d Ramos, Fernanda Fonseca.
Desenvolvimento de teste diagnóstico não invasivo capaz de detectar anticorpos anti-SARS-CoV-2 em urina [recursos eletrônicos]. / Fernanda Fonseca Ramos. - - Belo Horizonte: 2022.
185f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Eduardo Antonio Ferraz Coelho.
Orientador (a): Fernanda Ludolf.
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. SARS-CoV-2. 2. COVID-19. 3. Testes Imunológicos. 4. Urina. 5. Anticorpos. 6. Proteínas do Nucleocapsídeo. 7. Glicoproteína da Espícula de Coronavírus. 8. Dissertação Acadêmica. I. Orientador Sobrenome, Nome. II. Coorientador Sobrenome, Nome. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QW 168.5.C8

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL
ATA DE DEFESA DE TESE

Às 09:00 horas do dia 26 de agosto de 2022, de forma híbrida, na sala 526, 5º andar da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, realizou-se a sessão pública para a 211ª defesa de tese de **FERNANDA FONSECA RAMOS**, número de registro 2018655889, graduada no curso de FARMACIA-NOTURNO, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS DA SAÚDE. A presidência da sessão coube ao professor **EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **PROF. RICARDO LUIZ FONTES MOREIRA (FAMINAS)**, **PROF. RUBENS LIMA DO MONTE NETO (FIOCRUZ MINAS)**, **PROF. RODOLFO CORDEIRO GIUNCHETTI (UFMG)**, **PROF. RICARDO TOSHIO FUJIWARA (UFMG)**, **DRA. FERNANDA LUDOLF RIBEIRO DE MELO - ORIENTADORA (UFMG)**, **PROF. EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO - ORIENTADOR (UFMG)**. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua Tese de Doutorado, intitulada: *"Desenvolvimento de teste diagnóstico não invasivo capaz de detectar anticorpos anti-SARS-CoV-2 em urina"*. Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA a Tese de Doutorado**. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 26 de agosto de 2022.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Rubens Lima do Monte Neto**, Usuário Externo, em 26/08/2022, às 13:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **FERNANDA LUDOLF RIBEIRO DE MELO**, Usuário Externo, em 27/08/2022, às 07:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Toshio Fujiwara**, Professor do Magistério Superior, em 29/08/2022, às 10:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Antonio Ferraz Coelho**, Coordenador(a) de curso de pós-graduação, em 29/08/2022, às 10:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodolfo Cordeiro Giunchetti**, Professor do Magistério Superior, em 29/08/2022, às 21:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Luiz Fontes Moreira, Usuário Externo**, em 30/08/2022, às 12:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1686458** e o código CRC **9240075F**.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITORA: Profa. Dra. Sandra Regina Goulart Almeida

VICE-REITOR: Prof. Dr. Alessandro Fernandes Moreira

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO: Isabela Almeida Pordeus

PRÓ-REITOR DE PESQUISA: Fernando Marcos dos Reis

FACULDADE DE MEDICINA

DIRETORA: Profa. Dra. Alamanda Kfoury Pereira

VICE-DIRETORA: Profa. Dra. Cristina Gonçalves Alvim

COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO: Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

SUBCOORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO: Profa. Eli Iola Gurgel Andrade

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Área de Concentração: Infectologia e Medicina Tropical

COORDENADOR: Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

VICECOORDENADOR: Prof. Dr. Vandack Alencar Nobre Jr.

MEMBROS TITULARES DO COLEGIADO

Prof. Dr. Daniel Vitor Vasconcelos Santos

Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

Profa. Dra. Maria do Carmo Pereira Nunes

Profa. Dra. Mariana Costa Duarte

Prof. Dr. Unaí Tupinambás

Prof. Dr. Vandack Alencar Nobre Jr.

Representante discente: Fernanda Fonseca Ramos

Este trabalho foi desenvolvido no (i) Laboratório de Infectologia e Medicina Tropical do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais e no (ii) Centro de Tecnologia em Vacinas (CT Vacinas), BH-Tec, Universidade Federal de Minas Gerais.

COLABORADORES

Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca ^{1,2}

Prof. Dr. Vandack Alencar Nobre Jr. ^{3,4}

1 Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

2 Centro de Tecnologia em Vacinas (CT-Vacinas), BH-Tec, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

3 Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

4 Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

APOIO FINANCEIRO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) – Iniciativa Rede Vírus

Secretaria de Educação Superior do Ministério da Educação (SESU/MEC)

Dedico este trabalho a todos os indivíduos acometidos por este vírus, e às famílias que sofreram com a pandemia e com as perdas por ela causadas.

Dedico a todos que fazem da ciência sua jornada de vida e empregam suas forças na busca por soluções para as intempéries da vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pelo dom da vida, pelas oportunidades de crescimento pessoal e profissional, por me trazer luz e forças para seguir sempre de cabeça erguida.

Aos meus pais e seus cônjuges, por não medirem esforços para que eu pudesse alcançar meus sonhos, por me incentivarem e investirem no meu estudo.

À minha mãe, Imaculada, por me ensinar tanto sobre a vida e valores éticos, por ser exemplo de amor ágape, de superação e garra.

Ao Agnelo, por todo incentivo ao meu crescimento.

Ao meu pai, Fernando, por ser meu referencial de integridade, dedicação e responsabilidade. Por ser amor em cada gesto de cuidado.

À Júnia, pelo carinho, por ter visto em mim a cientista e conferir todo apoio para realização dessa jornada.

Aos meus irmãos, Ítalo, Igor e João Victor, por serem meus pilares, por trazerem leveza, sorrisos e serem companhia para a vida toda.

Aos meus avós, tios e familiares por todo amor, incentivo e momentos de alegria compartilhados. Em especial, aos meus padrinhos, Otília e Lélis, por serem meu lugar de aconchego.

Ao Guilherme, por todo amor, amparo, companheirismo. Por me trazer paz e sempre me incentivar a sonhar alto. E à toda sua família, por me apoiarem e vibrarem com minhas conquistas, em especial, à Aglae, por me acolher como uma filha.

Aos amigos, pelos momentos de alegria e por entenderem meus momentos de ausência. À Anna Cláudia, por ser presente e alicerce. Ao Ricardo, pelo apoio e pela partilha das inseguranças da carreira acadêmica.

Ao Programa Psicominds/UFMG e Kenia Resende por me despertarem para a autocompaixão e equilíbrio mental no ambiente da pós-graduação. A cada integrante pelas trocas. À Luisa Dantas pelo posterior acompanhamento e luz trazida.

Aos profissionais de saúde que conheci ao longo da minha trajetória acadêmica e profissional, que me ensinaram sobre resiliência e dedicação ao próximo. Pela troca de conhecimento e vivências, em especial à Adja Alves e Ana Cristina Dionízio.

Ao meu orientador Prof. Eduardo Coelho, que desde a graduação me acolheu como sua aluna, que tanto me ensinou sobre a pesquisa e a área acadêmica. Por me abrir portas, por confiar no meu trabalho. Pelos conhecimentos divididos e pelos puxões de orelha que me fizeram amadurecer como profissional e pessoa.

À minha orientadora Fernanda Ludolf, por acreditar em mim para a concretização deste trabalho. Por todas as conversas compartilhadas, pela parceria e amizade.

Aos colegas de laboratório, LIMT e LBAEL-Coltec, por serem meu time, meu local de trabalho e novos amigos: Raquel, Dani Pagliara, Amanda, Tauane, Grasielle, Vivian, Isabela, Fabiana, Dani Vale, Marcelo, Camila, João, Thiago e, todos os integrantes que passaram pelos laboratórios durante minha estadia. Por todos esses anos de convivência, pelo trabalho em equipe, pelo apoio nos momentos de desespero e comemoração nas conquistas. Pelos congressos, viagens e encontros de fim de tarde ou de finais de semana. Vocês foram essenciais para minha jornada.

À toda equipe que participou deste trabalho. À todos os alunos e profissionais de saúde envolvidos na coleta e organização das amostras. Ao Hospital das Clínicas/UFMG e ao Hospital Santa Helena por permitirem a coleta das amostras e ao CT-Vacinas/UFMG pelo suporte técnico. Em especial à Flávia Bagno, por todo o aprendizado e assessoramento. Você foi crucial para a realização deste trabalho.

Aos professores colaboradores deste trabalho, Flávio Fonseca e Vandack Nobre por acreditarem neste trabalho e por toda ajuda conferida.

Aos indivíduos que aceitaram participar deste trabalho. A contribuição de cada um foi essencial para o estudo e para maior entendimento da doença.

Aos professores da pós-graduação por compartilharem seu conhecimento e serem primordiais para minha formação como pesquisadora e docente. À Profa. Dra. Denise Utsch por tanto me ensinar e me acolher no ambulatório São Geraldo e UFMG.

À Luciene, secretária do PPGIMT, pela disponibilidade e por todo auxílio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, e também à CAPES pela oportunidade de realizar o Doutorado.

À UFMG, por ser minha segunda casa durante anos. Por tudo que vivi e aprendi.

A todos que contribuíram para essa conquista de forma direta ou indiretamente...

Muito obrigada!

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre
aquilo que todo mundo vê”.*

Arthur Schopenhauer

RESUMO

A plataforma de ELISA (ensaio de imunoabsorção por ligação enzimática) tem sido amplamente utilizada para detectar anticorpos anti-SARS-CoV-2 gerados após a exposição ao vírus ou à vacinação. A amostra comumente utilizada para a realização do teste é o soro. Até o momento, nenhum estudo havia investigado a urina do paciente como amostra para detectar anticorpos específicos para o vírus SARS-CoV-2. A urina é um espécime biológico que traz vantagens significativas inerentes ao tipo de amostra, que compreende coleta não invasiva, de fácil manuseio e armazenamento. Neste trabalho, propomos um ELISA indireto *in house* baseado no uso de urina e proteínas recombinantes do Nucleocapsídeo (N) ou da *Spike* (S) do vírus SARS-CoV-2. As proteínas recombinantes (r) de SARS-CoV-2, N e as subunidades da proteína S (S-Glic, S1-NGlic e RBD-NGlic), foram avaliadas usando um painel composto por aproximadamente 200 amostras de urina e de soro. A presença de anticorpos anti-SARS-CoV-2 na urina foi detectada com sensibilidade e especificidade similares ou superiores ao soro, nas quais foram obtidos valores de sensibilidade de 94,0%, 75,0%, 81,38% e 89,66%, e especificidade de 100%, 96,0%, 96,77% e 96,77%, frente às proteínas rSARS-CoV-2 N, S-Glic, S1-NGlic e RBD-NGlic, respectivamente. Dessa forma, os dados apresentados sugerem que a urina poderia ser considerada como uma potencial amostra biológica para aplicação em plataformas de imunodiagnóstico para a infecção por SARS-CoV-2, trazendo benefícios tanto no contexto individual quanto populacional.

Palavras-chave: SARS-CoV-2, COVID-19, imunodiagnóstico; urina; anticorpo; proteína do Nucleocapsídeo (N), proteína *Spike* (S).

ABSTRACT

The Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method has been widely used to detect anti-SARS-CoV-2 antibodies generated after exposure to the virus or vaccination. The sample usually used to perform the test is the serum. Thus far, no study has investigated the urine of patients as biological sample to detect specific SARS-CoV-2 antibodies. Urine is a biological specimen with significant advantages inherent to the type of sample, which comprises non-invasive collection, easy handling and storage. In this work, we propose an in house urine-based indirect ELISA using recombinant proteins from Nucleocapsid (N) and Spike (S) of the SARS-CoV-2 virus. SARS-CoV-2 recombinant N and S protein subunits (Gly-S, NonGly-S1 and NonGly-RBD) were evaluated in an ELISA platform with a panel composed about 200 urine and serum samples. The presence of anti-SARS-CoV-2 antibodies in urine was detected with similar or superior sensitivity and specificity to serum, in which sensitivity values of 94.0%, 75.0%, 81.38% and 89.66% were obtained, while specificity values were of 100.0%, 96.0%, 96.77% and 96.77%, respectively, against rSARS-CoV-2 N, S-Glic, S1-NGlic and RBD-NGlic proteins. In conclusion, the data presented suggest that urine could be considered as a potential biological sample for application in immunodiagnostic platforms for SARS-CoV-2 infection, with benefits to the individual and population context.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, immunodiagnostic; urine; antibody; Nucleocapsid protein (N), Spike protein (S).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Situação epidemiológica atual da COVID-19 (Brasil e Mundo).	31
Figura 2. Situação epidemiológica mundial da COVID-19 estratificada por continente.	31
Figura 3. Dados de mortalidade mundial pela COVID-19 estratificados por continente.....	32
Figura 4. Representação esquemática do genoma do SARS-CoV-2 e proteínas correspondentes.....	33
Figura 5. Representação esquemática da estrutura do SARS-CoV-2.....	34
Figura 6. Representação esquemática da ligação do SARS-CoV-2 ao receptor ECA2 e sua internalização na célula hospedeira.....	36
Figura 7. Imunologia da infecção por SARS-CoV-2.	40
Figura 8. Biomarcadores durante a infecção por COVID-19.	45
Figura 9. Fluxograma da execução do projeto.	56
Figura 10. SDS-PAGE (12%) da proteína rSARS-CoV-2 N.	66
Figura 11. Gráfico representativo da conversão imunológica dos anticorpos IgGs contra SARS-CoV-2 na urina.	69
Figura 12. Conversão imunológica comparativa dos anticorpos contra SARS-CoV-2 na urina e no soro dos pacientes individualmente (A).....	70
Figura 13. Conversão imunológica comparativa dos anticorpos contra SARS-CoV-2 na urina e no soro dos pacientes individualmente (B).....	71
Figura 14. Conversão imunológica comparativa dos anticorpos contra SARS-CoV-2 na urina e no soro dos pacientes individualmente (C).....	72
Figura 15. Conversão imunológica comparativa dos anticorpos contra SARS-CoV-2 na urina e no soro dos pacientes individualmente (D).....	73
Figura 16. Valores do <i>index</i> (I) urinário e sérico de cada paciente de acordo com os dias de início dos sintomas.	75
Figura 17. Avaliação de teste diagnóstico para COVID-19 utilizando a proteína rSARS-CoV-2 N baseado na pesquisa de anticorpos IgGs na urina e no soro.....	77
Figura 18. Desempenho diagnóstico comparativo de ELISA baseado em urina e soro para COVID-19.....	78
Figura 19. Estabilidade de amostras de urina armazenadas por vários dias após a coleta.....	79

Figura 20A. Proteína rSARS-CoV-2 S: S1-NGlic, RBD-NGlic e S-Glic.	81
Figura 20B. Proteínas rSARS-CoV-2 S: S1-NGlic, RBD-NGlic e S-Glic.....	82
Figura 21. Avaliação da presença de anticorpos anti-rSARS-CoV-2 S-Glic em urina e soro pareadas.	83
Figura 22. Avaliação comparativa dos valores de <i>index</i> (I) urinário e sérico de cada paciente de acordo com os dias após início dos sintomas usando a proteína rSARS-CoV-2 S-Glic.	85
Figura 23. Avaliação da presença de anticorpos anti-rSARS-CoV-2 S1-NGlic em urina e soro pareadas.	87
Figura 24. Avaliação comparativa dos valores de <i>index</i> (I) urinário e sérico de cada paciente de acordo com os dias após início dos sintomas usando a proteína rSARS-CoV-2 S1-NGlic.....	89
Figura 25. Avaliação da presença de anticorpos anti-rSARS-CoV-2 RBD-NGlic em urina e soro pareadas.	91
Figura 26. Avaliação comparativa dos valores de <i>index</i> (I) urinário e sérico de cada paciente de acordo com os dias após início dos sintomas usando a proteína rSARS-CoV-2 RBD-NGlic.....	93
Figura 27. Avaliação da presença de anticorpos anti-rSARS-CoV-2 S (S-Glic, S1-NGlic e RBD-NGlic) na urina.	94
Figura 28. Avaliação da presença de anticorpos anti-rSARS-CoV-2 S (S-Glic, S1-NGlic e RBD-NGlic) no soro.	95
Figura 29. Correlação entre rSARS-CoV-2 RBD-NGlic (branco) e rSARS-CoV-2 S1-NGlic (preto) versus rSARS-CoV-2 S-Glic usando amostras de soro e urina.	95
Figura 30. Avaliação comparativa das proteínas S recombinantes frente amostras de urina e soro de pacientes com coletas sucessivas após início dos sintomas.....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização demográfica da coorte do estudo.	65
Tabela 2. Avaliação da presença de anticorpos anti-SARS-CoV-2 em amostras de urina.	67
Tabela 3. Valores <i>index</i> obtidos para pacientes não hospitalizados, de acordo com o dia após o início dos sintomas, por ELISA utilizando urina.	68
Tabela 4. Resultados comparativos do teste diagnóstico para COVID-19 baseado na pesquisa de anticorpos IgG anti-proteína N recombinante em urina e soro.....	78
Tabela 5. Resultados obtidos do teste diagnóstico de anticorpos IgG específicos para COVID-19 utilizando rSARS-CoV-2 S-Glic.....	84
Tabela 6. Valores preditivos positivos e preditivos negativos da proteína rSARS-CoV-2 S-Glic para amostras de urina e soro.....	84
Tabela 7. Resultados obtidos do teste diagnóstico de anticorpos IgG específicos para COVID-19 utilizando rSARS-CoV-2 S1-NGlic.	87
Tabela 8. Valores preditivos positivos e preditivos negativos da proteína rSARS-CoV-2 S1-NGlic para amostras de urina e soro.	88
Tabela 9. Resultados obtidos do teste diagnóstico de anticorpos IgG específicos para COVID-19 utilizando rSARS-CoV-2 RBD-NGlic.....	91
Tabela 10. Valores preditivos positivos e preditivos negativos da proteína rSARS-CoV-2 RBD-NGlic para amostras de urina e soro.	92

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

– - Negativo ou Ausente

+ - Positivo ou Presente

± - Mais ou menos

≤ - Menor ou igual

≥ - Maior ou igual

°C - grau Celsius

μL - Microlitro

μM - Micromolar

aa - Aminoácido

BSA - Albumina de soro bovino

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention* (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)

CO₂ - Dióxido de carbono

COLTEC - Colégio Técnico UFMG

CONEP - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

CoV - Coronavírus

COVID-19 - *(Co)rona (vi)rus (d)isease* (doença do coronavírus de 2019)

CT-Vacinas - Centro de Tecnologia de Vacinas

DO - Densidade óptica

DP - Desvio Padrão

ECA2 - Enzima conversora de angiotensina 2

ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ensaio de imunoabsorção enzimática)

EPI - Equipamento de proteção individual

H₂SO₄ - Ácido sulfúrico

HCl - Ácido clorídrico

I - *index*

IgA - Imunoglobulina A

IgD - Imunoglobulina D

IgE - Imunoglobulina E

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

(Continuação)

IPTG - Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo

kb - *Kilobase* (Quilobases)

kDa - *Kilodalton* (Quilodaltons)

LAMP - *Isothermal amplification using loop-mediated amplification* (amplificação isotérmica mediada por alça)

LIMT - Laboratório de Infectologia e Medicina Tropical

LV - Leishmaniose Visceral

M - Molar

mAb - Monoclonal antibody (Anticorpo monoclonal)

MERS - *Middle East Respiratory Syndrome* (Síndrome Respiratória do Oriente Médio)

mg - Miligrama

mM - Milimolar

MS - Ministério da Saúde do Brasil

NAATs - *Nucleic Acid Amplification Tests* (Testes de amplificação de ácido nucleico)

nAbs – *Neutralizing antibodies* (Anticorpos neutralizantes)

NaCl - Cloreto de sódio

nCOV - Novo Coronavírus

ng - nanograma

nm – Nanômetro

NSP - *Non-structural proteins* (Proteínas não estruturais)

OMS - Organização Mundial de Saúde (inglês, *WHO*)

OPAS - Organização Pan-Americana de Saúde

pb - Par de bases

PBS - *Phosphate buffered saline* (Tampão de fosfato-salino)

PCR - *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

pH - Potencial hidrogeniônico

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

(Continuação)

POC - *Point-of-care* (no local de atendimento)

PPGIMT - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical

qPCR - *Quantitative polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase quantitativa ou PCR em tempo real)

r - recombinante

RBD - *Receptor Binding Domain* (domínio de ligação ao receptor)

RBD-NGlic - Proteína Spike porção RBD não glicosilada

ROC - *Receiver Operating Characteristic* (Curva Característica de Operação do Receptor)

RT-qPCR - *Reverse transcription - Quantitative polymerase chain reaction* (Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa)

S1-NGlic - Proteína recombinante Spike porção S1 não glicosilada

SARS - *Severe acute respiratory syndrome* (Síndrome respiratória aguda grave)

SDRA - Síndrome do desconforto respiratório agudo

S-Glic – Proteína recombinante Spike glicosilada

ssRNA - *Single-stranded ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico de fita simples)

TMB - 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

TWEEN - Ésteres de sorbitan etoxilados

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

UTI - Unidade de Terapia Intensiva

VOCs - *Variants of concern* (Variantes de preocupação)

VOIs - *Variants of interest* (Variantes de interesse)

SUMÁRIO

CONSIDERAÇÕES INICIAIS	23
1. INTRODUÇÃO	26
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1. EPIDEMIOLOGIA DA COVID-19	30
2.2. ESTRUTURA VIRAL	32
2.3. MECANISMO DE INFECÇÃO	36
2.4. PATOGENIA E SINTOMATOLOGIA	37
2.5. IMUNOLOGIA DA COVID-19	39
2.6. MEDIDAS DE CONTROLE	42
2.6.1. TRATAMENTO	42
2.6.2. VACINA	42
2.6.3. DIAGNÓSTICO	44
2.6.3.1. Diagnóstico direto	45
2.6.3.2. Diagnóstico indireto	47
2.7. AMOSTRAS BIOLÓGICAS	49
2.7.1. Urina	50
2.8. PROBLEMÁTICA	51
3. OBJETIVOS	53
3.1. OBJETIVO GERAL	54
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
4. MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO	56
4.2. POPULAÇÃO DO ESTUDO	57
4.2.1. Comitê de Ética	57
4.2.2. Amostras	57
4.3. OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	58

4.4.1. Amostras de urina	59
4.4.2. Amostras de soro	60
4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	60
5. RESULTADOS	62
5.1. CAPÍTULO 1 - PROTEÍNA DO NUCLEOCAPSÍDEO (N)	64
5.1.1. Proteína recombinante	66
5.1.2. Detecção de anticorpos específicos para SARS-CoV-2 em amostras de urina	66
5.1.3. Avaliação da conversão imunológica de IgG	68
5.1.4. Distribuição de conversão imune de pacientes hospitalizados por dia de início dos sintomas	74
5.1.5. Desempenho comparativo para detecção de anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2 N a partir de ELISA usando urina e soro	76
5.1.6. Avaliação de estabilidade da amostra de urina	79
5.2. CAPÍTULO 2: PROTEÍNA SPIKE (S)	80
5.2.1. Proteína recombinante	81
5.2.2. Proteína recombinante S-glicosilada (rSARS-CoV-2 S-Glic)	82
5.2.3. Proteína recombinante não glicosilada - S1 (rSARS-CoV-2 S1-NGlic)	86
5.2.4. Proteína recombinante não glicosilada - RBD (rSARS-CoV-2 RBD-NGlic)	90
5.2.5. Avaliação comparativa das proteínas recombinantes <i>Spike</i> glicosilada e não glicosilada	94
6. DISCUSSÃO	97
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	106
8. CONCLUSÃO	108
9. PERSPECTIVAS	110
10. REFERÊNCIAS	112

11. ANEXOS	124
11.1. ANEXO 1. Comitê de Ética	125
11.2. ANEXO 2. Patente	128
11.3. ANEXO 3. Artigo 1 - <i>Science Advances</i>	130
11.4. ANEXO 4. Artigo 2 – <i>Bio-protocol (Preprint)</i>	138
11.5. ANEXO 5. Artigo 3 – <i>The Science Breaker</i>	143
11.6. ANEXO 6. Artigo 4 – Em submissão	145
11.7. ANEXO 7. Produções científicas no período de doutoramento	171

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Esta tese é requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical (PPG-IMT) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e está inserida dentro da linha de pesquisa “Clínica, diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e tropicais”, que propõe a avaliação de biomarcadores diagnósticos, assim como do tratamento e do seguimento terapêutico dos pacientes acometidos por doenças infecciosas e tropicais.

Ao longo dos quatro anos de realização do doutorado, foram desenvolvidos dois projetos distintos. Durante os dois primeiros anos, foi realizado um estudo utilizando a tecnologia de *Phage Display* abordando o diagnóstico da leishmaniose visceral humana e coinfeção com HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) e nos dois anos seguintes, foi realizado o estudo aqui apresentado, abordando o diagnóstico de COVID-19.

O primeiro estudo gerou, em 2021, a publicação intitulada “*Diagnostic application of sensitive and specific phage-exposed epitopes for visceral leishmaniasis and human immunodeficiency virus coinfection*”, no periódico *Parasitology*, além do depósito da patente com código BR1020210152095. Este projeto foi apresentado em seminários e congressos, recebendo prêmios na XXX Semana de Iniciação Científica da UFMG e Ciência na prática pela Startup Análises Clínicas na Prática. O cumprimento da qualificação foi realizado dentro do período, em outubro de 2021, ainda dentro deste projeto.

A emergência para o desenvolvimento de novas tecnologias que auxiliassem no diagnóstico e, conseqüentemente, no entendimento da situação pandêmica da COVID-19, atrelada à vontade de trabalhar em prol da ciência, foram fatores determinantes para darmos início a um segundo projeto neste doutoramento. O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Infectologia e Medicina Tropical (LIMT) em parceria com o Centro de Tecnologia em Vacinas (CT-Vacinas), sob a coordenação da Dra. Fernanda Ludolf e colaboração dos professores Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho, Dr. Flávio G. da Fonseca e Dr. Vandack Nobre Jr.. Este projeto gerou o artigo intitulado “*Detecting anti-SARS-CoV-2 antibodies in urine samples: A noninvasive and sensitive way to assay COVID-19 immune conversion*”

publicado em maio de 2022 no periódico *Science Advances* e outro artigo em submissão intitulado “*A urine-based ELISA with recombinant non-glycosylated SARS-CoV-2 Spike protein for detecting anti-SARS-CoV-2 Spike antibodies*”, assim como o depósito da patente com código BR1020210140666, que se encontram anexados ao final deste documento. Este projeto apresentou ainda grande repercussão na mídia nacional, demonstrando o impacto social do mesmo.

Optamos por defender a tese baseando neste segundo projeto, visto o impacto e cunho emergencial do tema. É fundamental a divulgação de estudos que busquem o desenvolvimento de diagnósticos que proporcionem a testagem dos indivíduos e o entendimento da circulação do vírus e dos índices de transmissibilidade da doença. Além disso, a aluna esteve envolvida durante todo seu doutoramento em colaborações em projetos de pesquisa em Leishmaniose visceral e tegumentar, com foco no desenvolvimento de novos diagnósticos, vacinas ou tratamento para as enfermidades; participou de projeto de extensão com acompanhamento de pacientes com leishmaniose tegumentar ou enfermidades associadas à doença mucosa, no Ambulatório São Geraldo/Hospital das Clínicas/UFMG; atuou como monitora de disciplinas ofertadas pelo PPG-IMT e no Colégio Técnico da UFMG; esteve como representante discente durante 2 anos apoiando a PPGIMT em trabalhos, como o preenchimento do Relatório Sucupira na Plataforma CAPES; contribuiu ainda na orientação técnica de alunos de Iniciação científica e mestrado.

A apresentação deste documento foi realizada de acordo com a Resolução nº 02/2013, de 18 de setembro de 2013, que regulamenta o formato dos trabalhos finais e de qualificação, estabelecendo condições para a marcação das defesas de teses e dissertações do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG.

Este volume contém:

1. Introdução: contextualização da COVID-19 e importância do estudo.
2. Revisão Bibliográfica: revisão de estudos publicados até julho de 2022 em periódicos *indexados* e relacionados à COVID-19, de forma que o volume retrate o momento pandêmico em que as amostras foram coletadas e o projeto foi desenvolvido (2020/2021): epidemiologia da doença; características estruturais do vírus SARS-CoV-2; patogenia e sintomatologia da doença; medidas de controle da doença com foco no diagnóstico; amostras biológicas utilizadas para diagnóstico e a problemática do estudo.
3. Objetivos: objetivo geral da tese e os específicos que direcionaram o estudo.
4. Metodologia: comitê de ética; coleta de amostras; obtenção dos antígenos utilizados; metodologia de ELISA e análises estatísticas.
5. Resultados e Discussão: apresentados em dois capítulos, de acordo com o antígeno utilizado no teste: Proteína do Nucleocapsídeo e Proteína *Spike*.
6. Considerações finais: apresenta aspectos relevantes da tese.
7. Conclusão: conclusão dos resultados obtidos.
8. Perspectivas: direcionamentos e ideias futuras para o projeto.
9. Referências: bibliografia utilizada para o desenvolvimento desta tese.
10. Anexos: aprovação do Comitê de Ética, patente e artigos publicados vinculados ao projeto, além de produções científicas realizadas ao longo do doutoramento.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A doença do coronavírus 2019 (COVID-19), causada pelo vírus SARS-CoV-2 (coronavírus relacionado à síndrome respiratória aguda grave tipo 2), foi declarada pandemia em apenas três meses, quando se espalhou rapidamente pelo mundo após seu início na China (MURALIDAR *et al.*, 2020; WHO, 2020; ZHU *et al.*, 2020). Os primeiros casos de infecção foram relatados em dezembro de 2019, na cidade de Wuhan, província de Hubei, com o desenvolvimento de sintomas semelhantes à pneumonia (MURALIDAR *et al.*, 2020; ZHU *et al.*, 2020; ULLAH *et al.*, 2021; WHO, 2022) sendo, posteriormente, classificada como uma doença sistêmica devido ao acometimento de diversos sistemas do corpo humano (GUPTA *et al.*, 2020).

A identificação do patógeno pelos testes diagnósticos é a primeira linha de defesa contra a COVID-19, associada aos avanços nas estratégias de vacinação e tratamento, que proporcionam redução das taxas de hospitalização e mortalidade (KWOK, 2022). O SARS-CoV-2 permanece sob constantes pressões evolutivas, sendo alvo permanente de estudos que avaliem suas características e que busquem melhorias nas medidas de controle (ALENE *et al.*, 2021; OPAS/OMS, 2022). Estudos que proponham tecnologias disponíveis, precisas e rápidas para o diagnóstico da doença são estrategicamente importantes no combate ao avanço da pandemia no mundo (HU *et al.*, 2020; CDC, 2022; OPAS/OMS, 2022).

O diagnóstico da COVID-19 pode ser feito por meio da detecção direta de RNA ou de antígenos do SARS-CoV-2, bem como pela detecção indireta de anticorpos específicos gerados pelo sistema imunológico humano após o contato com o vírus (AMANAT *et al.*, 2020; WEISSLEDER *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2020; WHO, 2021). Cada estratégia desempenha papéis diferentes em ambientes distintos, sendo importante conhecer as características, vantagens e limitações de cada teste para sua melhor aplicabilidade e desempenho (ADAMS *et al.*, 2020; WEISSLEDER *et al.*, 2020; FDA, 2022).

Os testes imunológicos permitem estudar a resposta imune frente ao SARS-CoV-2 de maneira qualitativa e quantitativa, sendo os mesmos importantes para definir a exposição anterior ao SARS-CoV-2 em populações, identificar potenciais doadores humanos reativos para terapia com plasma convalescente e investigar a proteção imunológica (AMANAT *et al.*, 2020). O desenvolvimento de um teste diagnóstico com bom desempenho está intimamente relacionado à seleção de alvos

antigênicos adequados. A proteína recombinante N de SARS-CoV-2 pode ser expressa de forma eficiente através de um sistema procariótico de expressão, apresentando boa imunorreatividade (ZHANG *et al.*, 2020; LI, D.; LI, 2021). Paralelamente, a proteína *Spike*, sendo uma glicoproteína de superfície transmembrana, vem sendo preferencialmente expressa em sistemas eucarióticos, gerando modificações pós-traducionais do antígeno muitas vezes requeridas. O sistema procariótico apresenta vantagens em relação ao custo-benefício, agilidade no processo e maior capacidade produtiva quando comparado aos sistemas eucarióticos (LI, D.; LI, 2021).

Neste trabalho, abordamos um estudo inovador no qual amostras de urina de indivíduos que testaram positivo para SARS-CoV-2 por qRT-PCR foram avaliadas quanto à presença de anticorpos anti-SARS-CoV-2, em reação contra as proteínas recombinantes do Nucleocapsídeo (N) e *Spike* (S) de SARS-CoV-2, que foram expressas em sistemas procarióticos e eucarióticos. Como comparação, amostras de soros dos pacientes foram também utilizadas, haja vista serem aquelas tradicionalmente empregadas em imunoensaios.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. EPIDEMIOLOGIA DA COVID-19

A COVID-19 foi declarada, em 11 de março de 2020, como uma emergência de saúde pública pela Organização Mundial da Saúde (OMS), considerando-a como uma pandemia após seus altos índices de casos em todo mundo, desde seu primeiro relato à OMS em 31 de dezembro de 2019, em Wuhan, na China, quando se teve um surto da doença (ZHU *et al.*, 2020; MURALIDAR *et al.*, 2020; WHO, 2020).

De 09 de janeiro de 2020, quando foi relatada a primeira morte por COVID-19, até o fim do mesmo mês, momento em que a OMS divulgou seu relatório da pandemia, foram indicados 2.014 casos confirmados em dez países diferentes, além da China, e um total de 56 mortes em todo o mundo. Em pouco tempo, o número de casos confirmados aumentou drasticamente para 21.294.845 e os dados de mortes chegaram a 761.779, até agosto do mesmo ano (MURALIDAR *et al.*, 2020; WHO, 2020).

Até 10 de julho de 2022, último relatório liberado pela OMS, houve em torno de 553 milhões de casos confirmados e mais de 6,3 milhões de mortes no mundo por COVID-19 notificados (WHO, 2022a). E por atualização instantânea do sistema da OMS, temos relatos de 568.773.510 casos confirmados de COVID-19, incluindo 6.381.643 mortes, até 26 de julho de 2022 (WHO, 2022b) (**Figura 1**).

No Brasil, considerando todo o período da pandemia, de 03 de janeiro de 2020 a 26 de julho de 2022, houve 33.591.356 casos confirmados de COVID-19, com 676.964 óbitos relatados à OMS (**Figura 1**) (WHO, 2022b).

Em relação à vacinação, até 19 de julho de 2022, 12.166.921.655 doses de vacina foram administradas na população mundial, e até 15 de julho de 2022, um total de 455.195.559 doses foram administradas na população brasileira (WHO, 2022b).

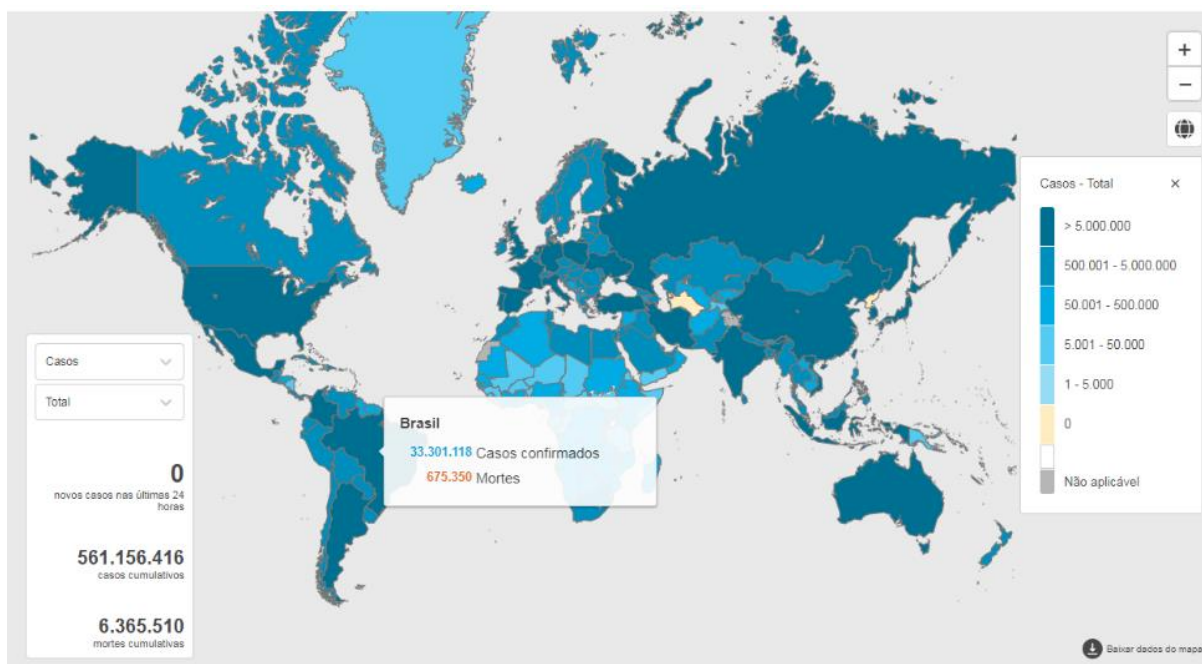


Figura 1. Situação epidemiológica atual da COVID-19 (Brasil e Mundo).

Fonte: WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard, 2022 (WHO, 2022b).

A **Figura 2** mostra os casos acumulados ao longo de todo período pandêmico através da estratificação por região continental, enquanto a **Figura 3** traz os dados de mortes (WHO, 2022b). A OMS enfatiza que as tendências observadas devem ser interpretadas com cautela, já que as estratégias diagnósticas da infecção são escassas ou têm mudado progressivamente em vários países, gerando números gerais mais baixos de testes realizados e, conseqüentemente, subnotificações (WHO, 2022b).

Situação por região da OMS

Europa	238.916.746	confirmado
Américas	169.156.056	confirmado
Pacífico Ocidental	69.774.403	confirmado
Sudeste da Ásia	59.212.130	confirmado
Mediterrâneo Oriental	22.521.272	confirmado
África	9.192.139	confirmado

Fonte: Organização Mundial da Saúde

Os dados podem estar incompletos para o dia ou semana atual.

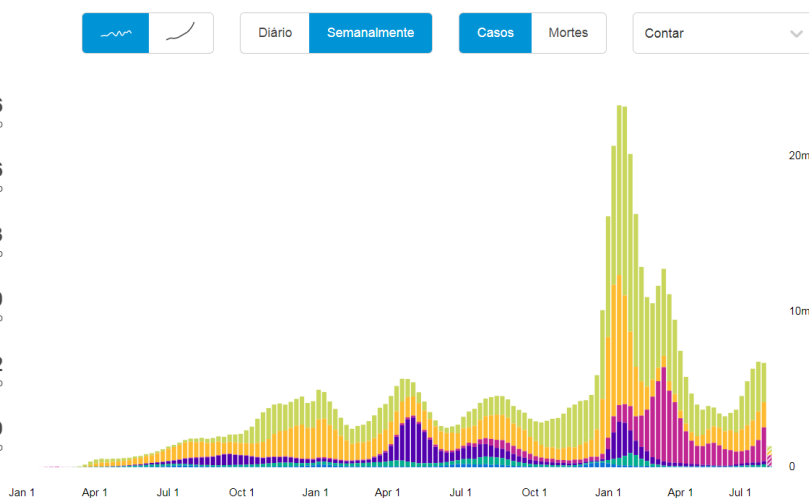


Figura 2. Situação epidemiológica mundial da COVID-19 estratificada por continente.

Fonte: WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard, 2022 (WHO, 2022b).

Situação por região da OMS

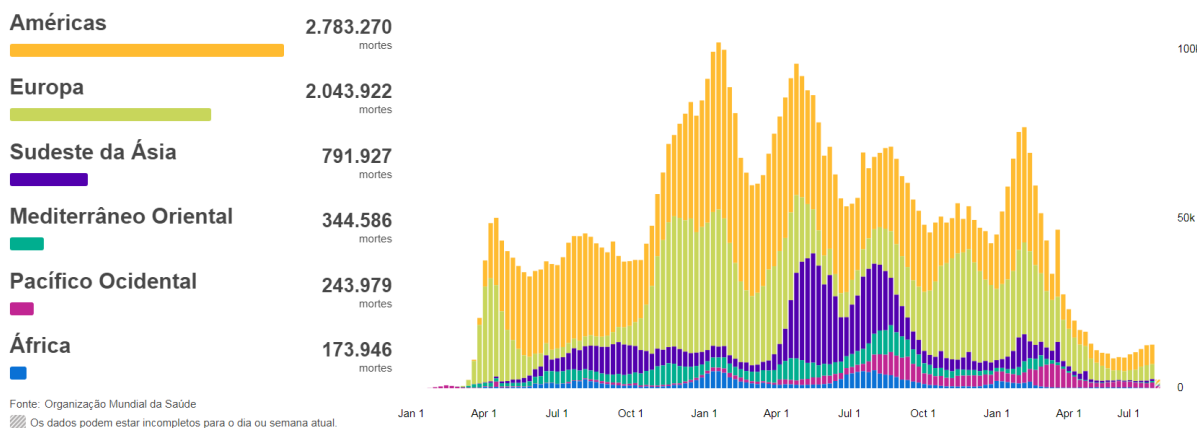


Figura 3. Dados de mortalidade mundial pela COVID-19 estratificados por continente.

Fonte: WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard, 2022 (WHO, 2022b).

2.2. ESTRUTURA VIRAL

Os coronavírus (CoVs) são vírus de RNA de fita simples (ssRNA) membros da família *Coronaviridae* e do gênero beta-coronavírus (β -CoV) (CSG, 2020; WANG *et al.*, 2020; MURALIDAR *et al.*, 2020). A classificação dos coronavírus é baseada em análises comparativas da sequência genômica dos vírus, diferentemente do passado, em que, até 2011, era realizada com base nas reatividades sorológicas à apenas a proteína *Spike* (CSG, 2020). Periodicamente, novas espécies de coronavírus aparecem devido à sua grande diversidade genética, rápida taxa de mutação, alta prevalência e ampla distribuição (CUI; LI; SHI, 2018).

O vírus SARS-CoV-2 é considerado como um vírus pandêmico de rápida disseminação que teve origem por transmissão zoonótica, de um animal silvestre para o ser humano, sendo o morcego e o pangolim os animais atribuídos ao transbordamento para o ser humano e, subsequentemente, mantendo uma transmissão antroponótica, de humano para humano (LYTRAS, S. *et al.*, 2021). Análises filogenéticas demonstraram que o SARS-CoV-2, inicialmente denominado nCoV (novo coronavírus), compartilha 96% de identidade do seu genoma completo com um CoV de morcego, o BatCoV RaTG13, 99% com o genoma do Pangolin-CoV, 80% com o coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) e 50% de semelhança com o coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), que causou surtos globais em 2002–2003 e 2011, respectivamente,

sugerindo a transmissão antroponótica para humanos após mutações (CDC, 2020; MURALIDAR *et al.*, 2020; ULLAH *et al.*, 2021).

O genoma do SARS-CoV-2 apresenta aproximadamente 30 quilobases (kb) (**Figura 4**). Dois terços do genoma do vírus codificam macro polipeptídeos pp1a/pp1b que geram 16 proteínas não estruturais, com diversas funções: enzimática, cofator, formação de vesículas, dentre outras, e o terço restante, codifica as proteínas estruturais e outros elementos (JAMISON *et al.*, 2022).

O vírus SARS-CoV-2, assim como outros vírus de RNA, é propenso à evolução genética ao longo de sua circulação, contribuindo para o desenvolvimento de mutações e o surgimento de múltiplas variantes. Isso pode acarretar em características diferentes se comparadas às cepas ancestrais e na melhor adaptabilidade e transmissibilidade entre os hospedeiros humanos (ALEEM; SAMAD; SLENER, 2022).

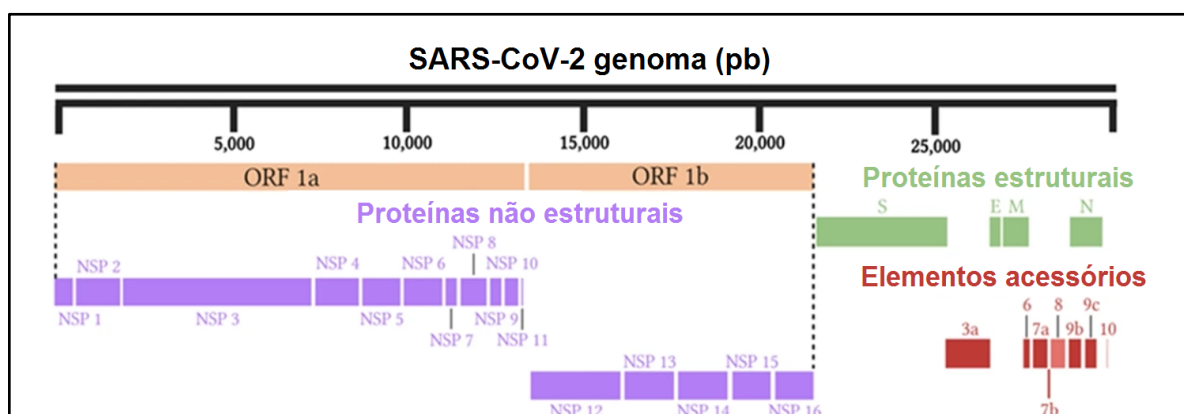


Figura 4. Representação esquemática do genoma do SARS-CoV-2 e proteínas correspondentes.

Fonte: Adaptado de JAMISON *et al.*, 2022.

Estruturalmente o SARS-CoV-2 possui quatro proteínas: *Spike* (S), Envelope (E), Membrana (M), e Nucleocapsídeo (N) (WANG *et al.*, 2020; JAMISON *et al.*, 2022) (**Figura 5**).

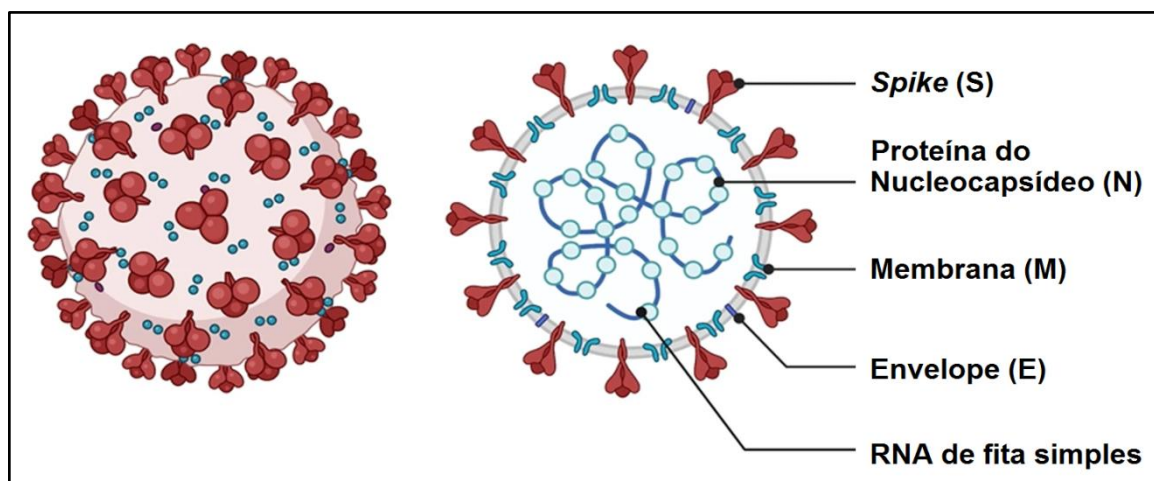


Figura 5. Representação esquemática da estrutura do SARS-CoV-2.

Fonte: Adaptado de JAMISON *et al.*, 2022.

A proteína Nucleocapsídeo (N) (~45,6 kDa) consiste em dois domínios estruturais denominados domínio N-terminal (NTD) e domínio C-terminal (CTD), que se ligam ao RNA do genoma viral e, contribuem para a síntese viral, além de estar associada à inibição da sinalização de interferon (IFN) (MALIK, 2020; JAMISON *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2022). Já o papel da proteína M é a montagem da partícula viral. A partir da interação com outras proteínas e com o RNA viral, a proteína M atua na regulação do tamanho e do formato da partícula, além de determinar o sítio de brotamento do vírus (MALIK, 2020; YOSHIMOTO, 2020). Já a proteína E, é a menor proteína estrutural e está presente em menor quantidade na estrutura viral, apesar de ser bastante expressa na célula hospedeira durante a replicação, atua desencadeando o processo de montagem da partícula viral e brotamento, e estudos demonstram que seu reconhecimento pelo organismo hospedeiro impulsiona o processo inflamatório (MALIK, 2020; JAMISON *et al.*, 2022). A proteína S (*Spike*) é uma glicoproteína transmembrana grande (~140 kDa) que projeta do envelope para o meio externo, e aparenta formato de coroa, característica que deriva o nome coronavírus. A proteína S é fundamental para a interação vírus-hospedeiro. Ela contém duas subunidades, S1 e S2, que atuam na interação da partícula viral e na liberação do material genético do vírus no interior da célula (WANG *et al.*, 2020). A subunidade S1 contém, principalmente, um domínio de ligação ao receptor (RBD) da superfície da célula hospedeira, que é a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) (Yuan *et al.*, 2020; JAMISON *et al.*, 2022). Já a região S2 é composta por

um peptídeo de fusão, um sítio de clivagem adicional responsável pela fusão das membranas do vírus e da célula humana (WANG *et al.*, 2020).

As proteínas S e N são as proteínas mais comumente utilizadas como antígenos para o diagnóstico de COVID-19 na sua forma recombinante ou como peptídeos e quimeras (WANG *et al.*, 2020; ANVISA, 2022; JAMISON *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2022; SCUSSEL *et al.*, 2022). Em relação ao seu uso como antígeno para diagnóstico, a produção da proteína S completa apresenta alto custo e limitações de produção, sendo a S1 e seu domínio RBD os principais antígenos da proteína S usados para testes sorológicos, além de dados que a S1 possui menor reatividade cruzada quando comparado ao uso da proteína S completa, devido à menor similaridade da subunidade S1 entre os coronavírus humanos em comparação com a S2 (LEE *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2021). A aplicação da proteína N para diagnóstico tem sido mais estudada, pois após uma compilação de mutações no SARS-CoV-2 constatou-se que esta proteína é relativamente conservada, ou seja, sofreu menos alterações quando comparada às outras proteínas, reafirmando seu potencial para diagnóstico mesmo com o aparecimento de novas variantes do vírus (LI *et al.*, 2022).

O Centro de Controle de Prevenção de Doenças (CDC) e a OMS estabeleceram independentemente um sistema de classificação para distinguir as variantes emergentes do SARS-CoV-2 em variantes de interesse (do inglês *variants of interest* - VOIs), como Epsilon, Zeta, Eta, Theta, Iota, Kappa, Lambda e Mu e variantes de preocupação (do inglês, *variants of concern* - VOCs), como Alfa, Beta, Gama, Delta e Ômicron (ALEEM; SAMAD; SLENKER, 2022; OPAS/OMS, 2022). As VOIs são definidas como variantes com marcadores genéticos específicos, e as VOCs têm essa classificação devido ao seu impacto na saúde pública, e sua associação com maior capacidade de transmissão ou virulência, alteração na detecção do vírus, redução nos níveis de anticorpos neutralizantes e diminuição da eficácia terapêutica ou da vacinação (ALEEM; SAMAD; SLENKER, 2022). Em 26 de novembro de 2021, a OMS designou a variante Ômicron (B.1.1.529), como uma variante de preocupação mundial, devido ao grande número de mutações e sua alta transmissibilidade (OPAS/OMS, 2022).

Suas características genéticas, que garantem alta transmissibilidade e elevado número de casos assintomáticos, associadas às pressões ambientais contínuas, alta exposição da população a portadores do vírus sem reclusão e à não utilização de

medidas protetivas, como máscaras de proteção, somadas a baixas taxas de vacinação em alguns países, permitiram ao SARS-CoV-2 acumular mutações em seu genoma (ALENE *et al.*, 2021).

2.3. MECANISMO DE INFECÇÃO

O vírus SARS-CoV-2 pode ser transmitido de forma direta, por perdigotos ou em menor escala, por aerossóis e contato com objetos contendo partículas virais, sendo os principais determinantes do risco de transmissão a proximidade interpessoal e ventilação do ambiente (LIU *et al.*, 2020; MEYEROWITZ *et al.*, 2021; WHO, 2022). O pico de infectividade ocorre cerca de um dia antes do início dos sintomas e diminui dentro de uma semana após o início dos sintomas (MEYEROWITZ *et al.*, 2021; WHO, 2022). Alguns estudos também sugeriram a transmissão fecal-oral, após encontrarem o vírus nas fezes de humanos infectados (XU *et al.*, 2020), embora trabalhos recentes refutem a ideia ao demonstrarem que a capacidade replicativa do SARS-CoV-2 é nula ou muito limitada em amostras de fezes (CERRADA-ROMERO *et al.*, 2022).

Após o contato inicial, o SARS-CoV-2 infecta as células humanas através da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) (**Figura 6**), com afinidade 10 a 20 vezes maior do que o vírus SARS-CoV (ZHOU; YANG; *et al.*, 2020).

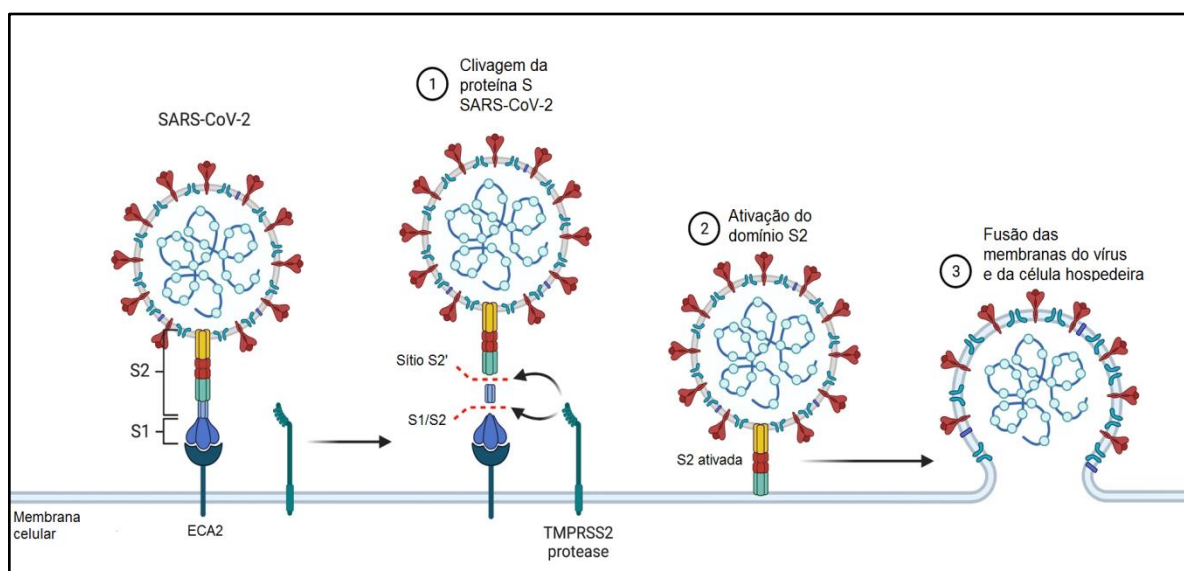


Figura 6. Representação esquemática da ligação do SARS-CoV-2 ao receptor ECA2 e sua internalização na célula hospedeira.

Fonte: Adaptado de JAMISON *et al.*, 2022.

A replicação do coronavírus inicia-se na etapa de adsorção, quando a região RBD da subunidade S1 da glicoproteína viral S interage com receptores de membrana da célula hospedeira, sendo a ECA2 para o SARS-CoV-2 (FEHR; PERLMAN, 2015; JAMISON *et al.*, 2022). O receptor ECA2 é expresso em diversos tecidos, como células epiteliais dos alvéolos pulmonares, enterócitos do intestino delgado, células endoteliais venosas e arteriais, e células da mucosa oral (Xu, 2020).

Após a ligação da partícula viral à célula-alvo, ocorre a clivagem da glicoproteína S de SARS-CoV-2, entre as subunidades S1 e S2, através da ação de proteases celulares, gerando uma mudança conformacional e a ativação do peptídeo de fusão, que mediará a fusão do envelope viral com a membrana celular (FEHR; PERLMAN, 2015; JAMISON *et al.*, 2022).

Posteriormente, ocorre o desnudamento do RNA, com a liberação do material genético no citoplasma celular e, o RNA de SARS-CoV-2, de polaridade positiva, é prontamente transcrito pela maquinaria celular, gerando um complexo favorável à produção do RNA genômico e subgenômico, atuante como RNA mensageiro (mRNA). Este será traduzido para produção de proteínas do vírus, seguido da montagem de novas partículas virais no Compartimento Intermediário Retículo Endoplasmático-Golgi (Ergic), do transporte para a superfície celular e liberação por exocitose (FEHR; PERLMAN, 2015; JACKSON *et al.*, 2022; JAMISON *et al.*, 2022).

Os sítios virais S e RBD são importantes para infecção e propagação viral, afetando a transmissibilidade e a gravidade da doença. Assim, o acúmulo de mutações nesses locais acarreta no aumento da afinidade de S e RBD com a ECA2, como observado nas novas variantes do vírus (JAMISON *et al.*, 2022).

2.4. PATOGENIA E SINTOMATOLOGIA

Inicialmente, pensava-se que a infecção por SARS-CoV-2 seria semelhante às doenças causadas por outros coronavírus, afetando principalmente o trato respiratório superior, com possibilidade de gerar danos ao trato respiratório inferior, até uma pneumonia grave; acometendo principalmente a população idosa e pessoas com comorbidades (MURALIDAR *et al.*, 2020).

Todavia, pessoas infectadas pelo SARS-CoV-2 podem apresentar diversas manifestações extrapulmonares, com afecções aos sistemas digestório, circulatório (danos endoteliais, síndromes coronarianas agudas, disfunção e arritmia miocárdica

e complicações trombóticas), urinário (lesão renal aguda) e sistema neurológico, por exemplo. Essa gama de sintomas pode-se explicar devido ao receptor ECA2 ser expresso em vários tecidos extrapulmonares (GUPTA *et al.*, 2020; YANG; YANG; *et al.*, 2020; CDC, 2022). A gravidade da COVID-19 está associada a sintomas como dificuldade em respirar, falta de ar, dores no peito, perda de fala ou confusão mental, sendo recomendado que procure atendimento médico imediato (WHO, 2022).

O período médio de incubação do SARS-CoV-2 pode variar de 1 a 14 dias, sendo qualquer pessoa passível de desenvolver sintomas leves a graves, mas o risco de gravidade e desfecho da doença pode depender da carga viral exposta, além de características intrínsecas do vírus, como transmissibilidade e virulência, e do corpo humano, como imunidade e comorbidades, como doenças cardíacas, pulmonares ou diabetes (YANG; WANG, 2020; CDC, 2022). O período de convalescença para casos leves de COVID-19 é de 1-2 semanas e para casos graves é de até 6 semanas, podendo chegar a meses de recuperação. O período de quarentena empregado pode variar de acordo com o *status* de vacinação, da positividade do teste diagnóstico e persistência de sintomas pelo paciente (CDC, 2022; KHAZAAL *et al.*, 2022).

Mesmo após a resolução da doença, os pacientes podem apresentar sequelas, complicações médicas ou persistência de alguns sintomas que duram semanas a meses (LOPEZ-LEON *et al.*, 2021). Quando esses efeitos não retornam a um parâmetro basal saudável dentro do período de 14 a 110 dias após a infecção viral, podem ser consideradas implicações de longo prazo da doença, sendo sua classificação como “COVID-longa” ou “síndrome pós-COVID-19” (TENFORDE, 2020; NALBANDIAN *et al.*, 2021; MATTA *et al.*, 2022) ou outras denominações variadas, como COVID-19 pós-aguda, sequelas pós-aguda da infecção por SARS CoV-2 (PASC), efeitos a longo prazo da COVID (CDC, 2022). Dentre os sintomas persistentes, cinco são mais prevalentes, como fadiga (58%), dor de cabeça (44%), distúrbio de atenção (27%), queda de cabelo (25%) e dispneia (24%), de acordo com Lopez-Leon e colaboradores (2021) e, de acordo com o CDC (2022), essas manifestações são encontradas com maior frequência em pessoas que tiveram COVID-19 grave.

2.5. IMUNOLOGIA DA COVID-19

A resposta imune inata e adaptativa é ativada pela infecção por SARS-CoV-2, e pode resultar em resposta inflamatória maciça e quadros sintomáticos graves da doença, podendo causar danos teciduais locais e sistêmicos (ANKA *et al.*, 2020). A gravidade da COVID-19 está relacionada ao recrutamento de células pró-inflamatórias, como granulócitos e macrófagos, e no desencadeamento do recrutamento de leucócitos e na liberação maciça de citocinas pró-inflamatórias, também chamada de tempestade de citocinas (**Figura 7**).

De uma forma geral, a infecção dos tecidos primários é caracterizada pela proliferação e liberação dos vírus, morte celular, seguida do recrutamento de células imunes, da geração de imunocomplexos e danos nos órgãos associados, podendo gerar a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (ANKA *et al.*, 2020; DIPIAZZA; GRAHAM; RUCKWARDT, 2021).

Estudos demonstraram a indução de proliferação de plasmócitos e células T auxiliares foliculares (Tfh) circulantes (ANKA *et al.*, 2020). Além disso, a estimulação persistente do antígeno viral gera regulação positiva para marcadores de exaustão celulares, como NKG2A, em células NK e linfócitos T CD8+ citotóxicos de pacientes com COVID-19, refletindo um declínio nas funções efetoras e na capacidade proliferativa dessas células (DAVID *et al.*, 2019; ANKA *et al.*, 2020;).

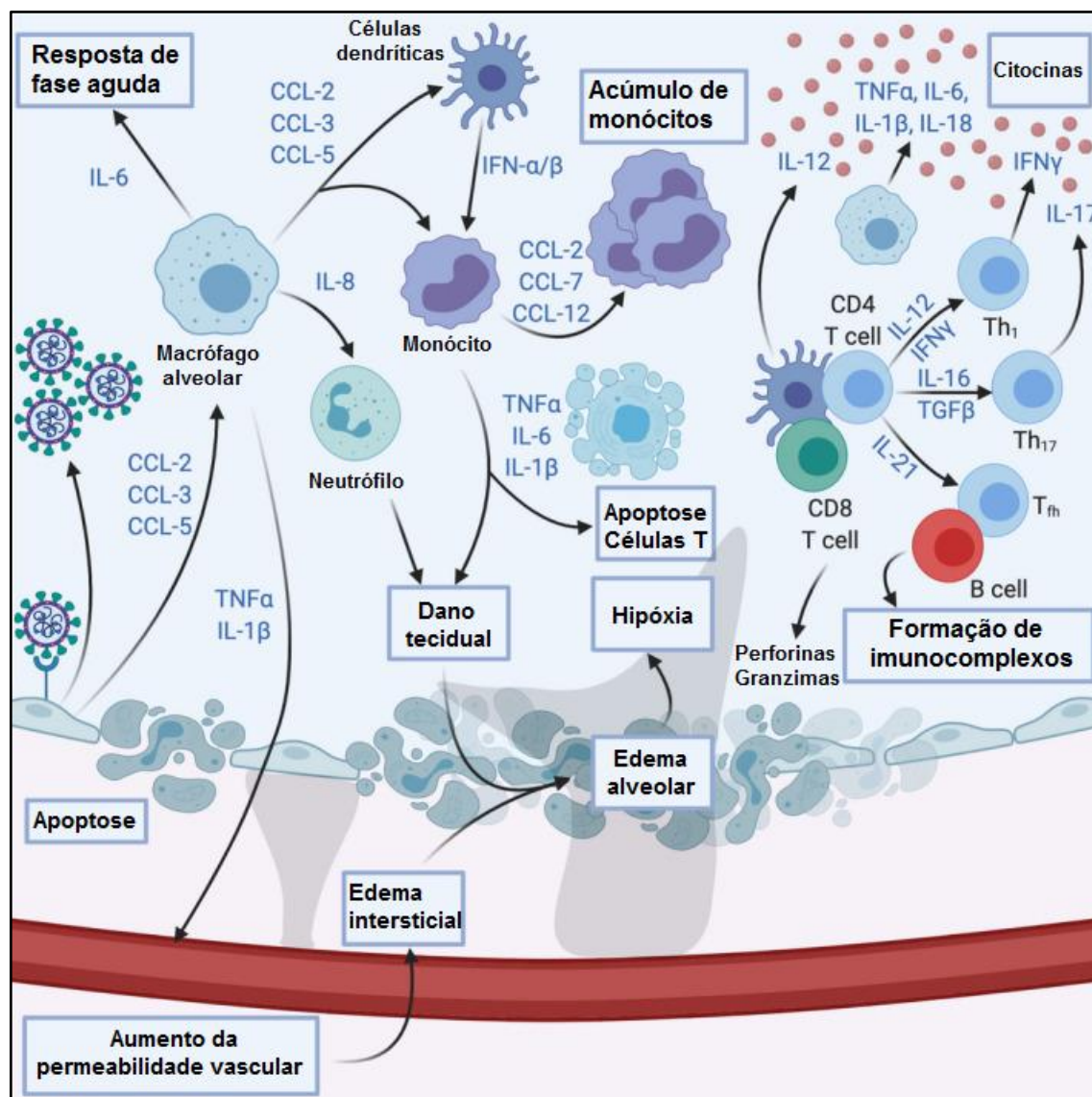


Figura 7. Imunologia da infecção por SARS-CoV-2.

As citocinas produzidas por células infectadas recrutam macrófagos alveolares, que por sua vez aumentam a permeabilidade vascular e recrutam outros componentes do sistema imunológico, configurando a resposta de fase aguda. A morte de células infectadas e imunológicas gera dano tecidual e edema alveolar, levando à hipóxia. A hiperativação das respostas imunes inata e adaptativa induz a tempestade de citocinas. Esses fatores convergem para o desenvolvimento progressivo da Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA).

Fonte: Adaptado de ANKA *et al.*, 2020.

Uma resposta imune humoral robusta, dependente de células B, também é desencadeada, conforme evidenciado pela detecção quase universal de anticorpos específicos contra SARS-CoV-2 dos tipos IgG, IgM e IgA e anticorpos IgG neutralizantes (nAbs) nos dias após a infecção (ANKA *et al.*, 2020; HUANG *et al.*, 2020; LIU, A. *et al.*, 2021). Estudos evidenciaram a soroconversão entre 7 e 14 dias

após o início dos sintomas em pacientes infectados por SARS-CoV-2, com títulos de anticorpos persistentes por semanas mesmo após a eliminação do vírus (ADAMS *et al.*, 2020; ANKA *et al.*, 2020; YANG; WANG, 2020).

Estudo realizado por Adams e colaboradores (2020) apontou a detecção sorológica de IgG específica anti-proteína *Spike* de SARS-CoV-2 até 60 dias após o início dos sintomas, mas os títulos da imunoglobulina começaram a diminuir 8 semanas após o início dos sintomas. Isso é confirmado por outros estudos que apontam que os níveis de IgG e de anticorpos neutralizantes começaram a diminuir dentro de 2 a 3 meses após a infecção, com testes soronegativos em 40% dos indivíduos assintomáticos e em 12,9% dos sintomáticos após o início da fase de convalescença (LONG *et al.*, 2020; LIU, A. *et al.*, 2021).

A relação entre a presença de anticorpos e a gravidade da doença, causada pelos coronavírus, no geral permanece incerta, embora alguns estudos suspeitem do aumento de destruição tecidual por efeito de respostas auto-reativas, geradas pela maior apresentação de proteínas do hospedeiro às células T ou B, que desencadeia maior expansão clonal e produção de citocinas (HUANG *et al.*, 2020; CHRISTENSEN; AZAR; TURBETT, 2022).

Já os anticorpos neutralizantes fornecem uma importante defesa imunológica específica contra infecções virais em pacientes, visto que impedem a interação do vírus com o receptor da célula hospedeira (LIU, A. *et al.*, 2021). O domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína S é altamente imunogênico, e os anticorpos podem neutralizar essa ligação ao se ligarem no domínio (JU *et al.*, 2020; LIU, A. *et al.*, 2021; VABRET *et al.*, 2020). Uma correlação significativa foi relatada entre títulos de anticorpos neutralizantes e os índices de IgG anti-SARS-CoV-2-RBD no soro de pacientes, ou seja, a dosagem de IgG pode ser útil na avaliação da capacidade de neutralização do soro de pacientes com COVID-19, demonstrando a importância da imunidade humoral no bloqueio da ligação viral com o receptor das células hospedeiras e o estabelecimento da infecção celular (NI *et al.*, 2020; ZHOU; YANG; *et al.*, 2020; LIU, A. *et al.*, 2021).

2.6. MEDIDAS DE CONTROLE

Devido ao número elevado de casos e mortes gerados pela pandemia, medidas eficazes de saúde pública são consideradas de maior importância para contenção da transmissão do vírus, além de estratégias inovadoras, como o desenvolvimento de vacinas, reposicionamento de fármacos ou novas terapias antivirais (MURALIDAR *et al.*, 2020), associados a diagnósticos com bom desempenho que permitem a identificação precoce dos pacientes, seu acompanhamento e isolamento, além de entendimento epidemiológico dos casos, sendo uma medida de controle de risco (AMANAT *et al.*, 2020). Como medida de controle individual, tem-se a vacinação, o uso de máscaras e distanciamento social, que protegem o indivíduo e outras pessoas das chances de uma maior disseminação do coronavírus (CDC, 2022).

2.6.1. TRATAMENTO

Pacientes com sintomas leves devem realizar o período de quarentena em casa, com repouso, hidratação e tratamento de sintomas como tosse, dor no corpo, febre, dentre outros (CDC 2022; NIH, 2022). Em contrapartida, pacientes graves devem ser acompanhados no hospital e podem ser utilizados antivirais, como rendesivir e/ou medicamentos para tratamento de complicações, como antiinflamatórios esteroides e anticoagulantes (NIH, 2022).

O FDA emitiu autorização de uso emergencial para três tratamentos contra COVID-19, os anticorpos monoclonais, uma combinação de dois fármacos chamados Paxlovid® (nirmatrelvir e ritonavir), tomados juntos duas vezes por dia durante cinco dias, e molnupiravir, duas vezes ao dia durante cinco dias, sendo recomendados para pacientes de alto risco (NIH, 2022). De acordo com a ANVISA (2022, Brasil) foram aprovados, até julho de 2022, os seguintes medicamentos para COVID-19 no país: Rendesivir, Sotrovimabe, Baricitinibe, Evusheld® (cilgavimabe + tixagevimabe), Paxlovid® e Molnupiravir (ANVISA, 2022).

2.6.2. VACINA

Outro pilar na estratégia de combate ao vírus SARS-CoV-2 é o desenvolvimento de vacinas, regulamentadas para uso nacional pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), após avaliação da eficácia e segurança,

cujas evidências estão embasadas por estudos básicos e clínicos realizados prioritariamente em instituições de ensino e pesquisa (BRASIL, 2022). Até o momento, temos regulamentadas no Brasil algumas vacinas para COVID-19: Comirnaty® (Pfizer/Wyeth), e a Sputnik V® (com autorização para importação excepcional), compostas por RNA mensageiro sintético (mRNA) que codifica a proteína *Spike* do SARS-CoV-2; Oxford/Covishield® (Fiocruz e Astrazeneca) e Janssen Vaccine® (Janssen-Cilag), compostas por adenovírus que codifique ou que apresente em sua partícula viral a glicoproteína *Spike* de SARS-CoV-2 e, Coronavac® (Butantan), composta por partícula viral inativada de SARS-CoV-2 (BRASIL, 2022; FIOLET *et al.*, 2022).

Vale ressaltar, que um estudo feito em Israel apontou que após a reabertura do *lockdown* e campanhas de vacinação efetivas, a incidência de infecção por SARS-CoV-2 permaneceu baixa, sugerindo que a alta cobertura vacinal pode fornecer um caminho sustentável para a retomada da atividade normal (HAAS *et al.*, 2021). De uma forma geral, as vacinas contra COVID-19 tiveram alta eficácia contra a cepa original do vírus SARS-CoV-2 e suas variantes, Alfa, Beta, Gama ou Delta, com raros relatos de eventos adversos graves, como abordado pelo estudo de Fiolet e colaboradores (2022).

Dados apontam que todos os grupos vacinados, independente do *status* da vacinação, tiveram menor risco de morrer por COVID-19 em comparação com pessoas não vacinadas, pessoas com uma série primária e duas doses adicionais ou de reforço tiveram taxas de mortalidade mais baixas, seguidas daquelas com apenas uma dose adicional ou somente com a série primária (CDC, 2022; WATSON *et al.*, 2022). Até maio de 2022, apenas 57 países tiveram 70% da sua população vacinada, sendo a maioria países de alta renda, e quase um bilhão de pessoas em países de baixa renda não tinham tido acesso à vacina. Somado a isso, alguns países não possuem políticas públicas de incentivo à vacinação aliadas à desinformação da população que gera hesitação para o ato de vacinar (WHO, 2022). Estudos clínicos demonstram a correlação entre a menor carga viral do SARS-CoV-2 em indivíduos vacinados e a menor possibilidade de infecção por outras pessoas, dificultando a propagação viral. A vacinação contra COVID-19 permanece sendo uma ferramenta importante para diminuir a propagação do vírus e a taxa de

infecção, além de diminuir o risco de gravidade da doença, aliados a comportamentos responsáveis de proteção (VITIELLO *et al.*, 2021).

2.6.3. DIAGNÓSTICO

A detecção precoce do SARS-CoV-2 é uma das intervenções principais para o controle da disseminação do vírus (HU *et al.*, 2020; LEE *et al.*, 2020). O teste ideal para diagnóstico deve ser selecionado com base na situação clínica do paciente e na apresentação inicial dos sintomas (CHRISTENSEN; AZAR; TURBETT, 2022). Exames que detectem os sinais e sintomas da doença são importantes para o diagnóstico da doença, como a tomografia computadorizada de tórax, que foi utilizada para identificar o paciente em Wuhan, na China (HU *et al.*, 2020; ZHU *et al.*, 2020).

O sequenciamento genético do SARS-CoV-2 permitiu o rápido desenvolvimento de testes de diagnóstico *in vitro* (IVD) específicos para o vírus (YÜCE; FILIZTEKIN; ÖZKAYA, 2021). Os testes de IVD para COVID-19 podem ser qualitativos e/ou quantitativos, sendo agrupados como testes diretos, que detectam ácido nucleico do vírus ou proteínas virais antigênicas, e testes indiretos ou imunológicos, que visam à avaliação da resposta imune frente à infecção pelo SARS-CoV-2 ou à vacinação, cada um desempenhando papéis distintos em estabelecimentos de saúde, *point-of-care* (POC) ou testes epidemiológicos em larga escala (AMANAT *et al.*, 2020; WEISSLEDER *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2020; CDC, 2022). Os ensaios moleculares têm sido o padrão-ouro para detecção direta de material genético viral em indivíduos infectados, somados ao teste de *point of care* de antígeno. A detecção da produção de anticorpos IgG, IgM e IgA, juntamente com o RNA/antígeno viral auxiliam no diagnóstico da infecção por SARS-CoV-2 (ANKA *et al.*, 2020; DIPIAZZA; GRAHAM; RUCKWARDT, 2021).

Biomarcadores virológicos (RNA viral e antígenos) e imunológicos (anticorpos) servem como alvos diagnósticos com diferentes e aplicações complementares, já que são evidentes em momentos distintos no percurso da história natural da doença (**Figura 8**) (CHRISTENSEN; AZAR; TURBETT, 2022). Assim, cada teste diagnóstico possui sua janela de detecção e, independente da técnica utilizada, é importante conhecer seu desempenho, limitações e aplicações para utilizá-lo adequadamente (FDA, 2021; CHRISTENSEN; AZAR; TURBETT, 2022).

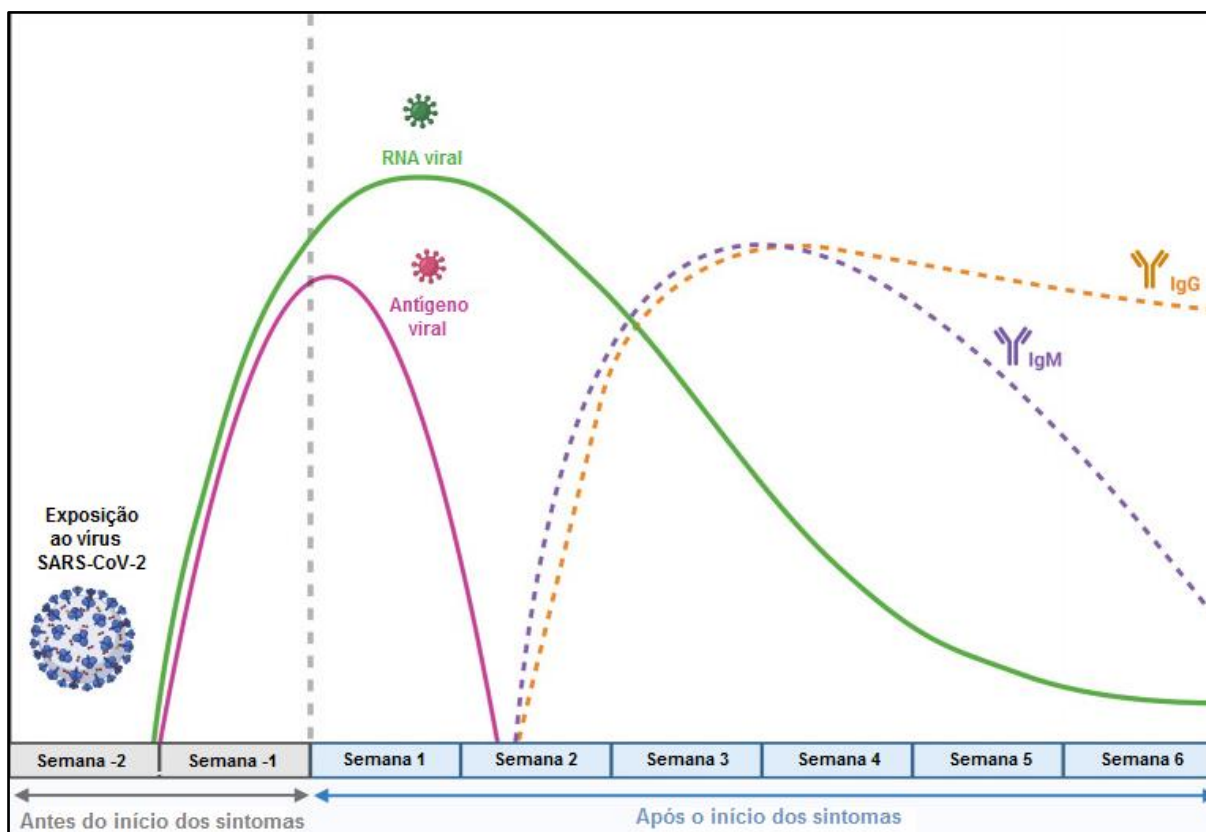


Figura 8. Biomarcadores durante a infecção por COVID-19.

O RNA do SARS-CoV-2 é o primeiro marcador viral identificado, atingindo o pico durante a primeira semana de sintomas, e diminuindo ao longo das semanas, podendo ser ainda detectável por um tempo em alguns pacientes imunossuprimidos. Os antígenos virais se tornam detectáveis também próximo ao início dos sintomas, mas decaem de forma mais rápida em comparação ao RNA viral. Em contraste, as imunoglobulinas anti-SARS-CoV-2 se tornam detectáveis de forma confiável a partir de 2 ou mais semanas após o início dos sintomas, decaindo após 2 meses do início dos sintomas (IgM) ou persistindo além desse período (IgG). Fonte: Adaptado de CHRISTENSEN; AZAR; TURBETT, 2022

2.6.3.1. Diagnóstico direto

Os testes diretos, ou testes virais, englobam dois tipos de testes: os testes de amplificação de ácido nucleico (NAATs - *do inglês, Nucleic Acid Amplification Tests*), que visam a detecção do material genético do microrganismo causador da doença e os testes de antígeno, que buscam identificar componentes da partícula viral, como proteínas (YÜCE; FILIZTEKIN; ÖZKAYA, 2021; FDA, 2022), ambos realizados em amostras de swab nasal ou saliva (ALVES *et al.*, 2021). A aplicação dos testes diretos deve ser realizada no período de 3 a 7 dias do início dos sintomas para maximizar a sensibilidade, com declínio da detecção do RNA viral durante 2 a 3

semanas e dos antígenos virais, aproximadamente 1 semana após os sintomas (CHRISTENSEN; AZAR; TURBETT, 2022).

Os NAATs são testes diagnósticos que detectam ácidos nucleicos a partir da amplificação do material genético do vírus, quando presentes na amostra do indivíduo. Esse processo de cópias sucessivas permite a detecção de pequenas quantidades de RNA de SARS-CoV-2, e pode ser feito de diferentes formas, como a reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (RT-qPCR) ou por amplificação isotérmica, como Amplificação isotérmica mediada por *loop* (LAMP) (KASHIR; YAQINUDDIN, 2020; ALVES *et al.*, 2021; CDC, 2022; PU *et al.*, 2022).

A detecção do RNA viral do SARS-CoV-2 em amostras do trato respiratório, por RT-qPCR tem sido a principal estratégia diagnóstica de COVID-19 em sua fase aguda. Essa metodologia tem alta sensibilidade e especificidade para SARS-CoV-2 quando realizada de maneira correta, porém a insuficiência de RNA viral na amostra ou a não realização de forma correta da coleta pode levar a resultados falsos negativos e/ou falsos positivos (LEE *et al.*, 2020, FDA, 2022). Na realidade clínica, a sensibilidade do teste pode variar, podendo atingir cerca de 10% de resultados falso-negativos entre pessoas infectadas, devido à janela de detecção da doença, clínica variável para COVID-19, o local da coleta da amostra, a qualidade da coleta da amostra e da carga viral (LEE *et al.*, 2020; PU *et al.*, 2022). Todavia, são necessários capacitação dos profissionais e equipamentos específicos para a realização dos testes, muitas vezes onerosos, podendo limitar seu emprego aos laboratórios de maior porte (YÜCE; FILIZTEKIN; ÖZKAYA, 2021).

Além disso, os testes podem ser do tipo teste-rápido, que são realizados no local do atendimento (do inglês *point-of-care* - POC) ou do tipo autoteste, que podem ser feitos em casa ou em qualquer lugar, com resultados rápidos e fáceis de usar, como testes de antígeno, imunocromatográficos, e alguns tipos de NAATs. Já os testes laboratoriais, que incluem RT-qPCR e outros tipos de NAATs, podem levar horas ou dias para serem concluídos (YÜCE; FILIZTEKIN; ÖZKAYA, 2021; CDC, 2022; FDA, 2022). As lacunas quanto ao teste direto permanecem, particularmente, na triagem de diferentes momentos da infecção, incluindo casos assintomáticos e os já convalescentes (LEE *et al.*, 2020; FDA, 2022). Cobrir essa lacuna, com o desenvolvimento de testes diagnósticos rápidos, não invasivos e eficientes, é epidemiologicamente muito importante, pois auxiliaria na vigilância, no

monitoramento da disseminação do vírus, e nas melhores estratégias públicas quanto às medidas de controle da pandemia.

2.6.3.2. Diagnóstico indireto

Os testes indiretos ou imunológicos, mais conhecidos como testes sorológicos, devido ao uso comum do soro como amostra, são utilizados para a detecção de anticorpos contra SARS-CoV-2 (CDC, 2022) e seu valor clínico depende da compreensão da resposta imune do hospedeiro durante a infecção (ZHAO *et al.*, 2020). Os ensaios imunológicos nos permitem avaliar de maneira qualitativa e/ou quantitativa a resposta do sistema imune frente à infecção pelo SARS-CoV-2 ou pela vacinação. São úteis, também, em estudos epidemiológicos em determinadas áreas, permitindo uma vigilância populacional e estimativa da taxa de letalidade da infecção, além da avaliação de um potencial risco individual (AINSWORTH *et al.*, 2020; AMANAT *et al.*, 2020). Inclusive, permite a avaliação de possíveis doadores para a geração de terapias de soro/plasma convalescentes, como evidenciou um estudo publicado por Amanat e colaboradores (2020).

O processo de desenvolvimento de anticorpos no indivíduo (imunoconversão) pode ser detectado no soro (soroconversão) cerca de 1 a 2 semanas após a infecção (ADAMS *et al.*, 2020; CHRISTENSEN; AZAR; TURBETT, 2022). Assim, a sensibilidade e a especificidade dos testes podem ser diminuídas quando a amostra é coletada em períodos iniciais da doença, visto que a resposta imune do paciente infectado se encontra em desenvolvimento inicial.

Diferentemente de coletas feitas 20 dias após o aparecimento dos primeiros sintomas, que podem favorecer o desempenho dos testes imunológicos (ADAMS *et al.*, 2020; CHRISTENSEN; AZAR; TURBETT, 2022).

Os testes imunológicos para COVID-19 atualmente incluem o ensaio imunoenzimático (ELISA), imunoensaio de quimioluminescência (CLIA) e imunoensaio de fluxo lateral (LFIA) (GONG *et al.*, 2021). Embora não sejam capazes de detectar o antígeno diretamente, os testes sorológicos apresentam aplicações altamente relevantes (AMANAT *et al.*, 2020).

O teste de ELISA é o teste sorológico clássico mais utilizado, permite testar um grande número de casos suspeitos em um curto período de tempo e pode ter seus valores de desempenho melhorados pela variação dos antígenos e reagentes utilizados e determinação do *cutoff* (GONG *et al.*, 2021). O teste CLIA é semelhante

ao ELISA, porém utiliza uma reação química para produzir um marcador quimioluminescente para detectar um sinal positivo, além de possuir maior valor agregado ao processo quando comparado ao ELISA (GONG *et al.*, 2021). Já os testes rápidos ou POC de anticorpos, são projetados para detectar qualitativamente a presença de IgM, IgG ou anticorpos totais para SARS-CoV-2 nas amostras (ADAMS *et al.*, 2020). Porém são mais propensos a fornecer resultados falso-negativos e falso-positivos do que outros métodos (GONG *et al.*, 2021).

Os testes sorológicos dependem de antígenos com boa afinidade para avaliar a presença de imunoglobulinas do hospedeiro (ADAMS *et al.*, 2020; AMANAT *et al.*, 2020; BAGNO *et al.*, 2021). A maioria dos estudos realizados por empresas comerciais ou institutos de pesquisa desenvolvem ensaios para detectar anticorpos SARS-CoV-2 a partir das amostras de soro ou plasma de pacientes, visando principalmente a proteína S, que é a proteína viral mais exposta, o seu domínio de ligação ao receptor (RBD) e a proteína N, que é abundantemente expressa durante a infecção (AMANAT *et al.*, 2020; LEE *et al.*, 2020).

Dependendo do ensaio, diferentes classes de anticorpos podem ser detectadas, variando de IgM, IgG, IgA ou anticorpo total, este sem distinguir as classes de imunoglobulinas (NUCCETELLI *et al.*, 2020; CHRISTENSEN; AZAR; TURBETT, 2022). Um estudo demonstrou alto desempenho analítico na detecção de IgA, IgG e IgM anti-SARS-CoV-2 em pacientes com infecção tardia (19 a 41 dias), principalmente pela metodologia de ELISA (NUCCETELLI *et al.*, 2020). Análises longitudinais revelaram que anticorpos anti-SARS-CoV-2 do tipo IgM e IgG se desenvolvem entre 6 a 15 dias após o início da doença, sendo que anticorpos IgM decaíram em poucas semanas após os primeiros sintomas, enquanto os anticorpos IgG apresentaram aumento nas 3 primeiras semanas desde o início dos sintomas, com permanência relativamente estável de 60 até 100 dias após o início dos sintomas, tanto para SARS-CoV-2 (ADAMS *et al.*, 2020) quanto para outros CoVs endêmicos (HUANG *et al.*, 2020).

Em relação a IgA, estudos relatam que esta imunoglobulina pode mostrar bons dados de sensibilidade e especificidade, porém menor especificidade se comparado aos anticorpos IgG, que geralmente têm maior duração e são mais adequados em estudos de sorovigilância (OKBA *et al.*, 2020). BEAVIS e colaboradores (2020) avaliaram um teste sorológico e obtiveram, em relação ao teste de PCR,

concordância de 90,5% e 100% para detecção de IgA e IgG, respectivamente, em amostras coletadas a partir de 4 dias após o diagnóstico de COVID-19 confirmado por PCR (BEAVIS *et al.*, 2020).

2.7. AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Diferentes amostras já foram utilizadas para detecção de material genético de SARS-CoV-2, dentre elas: sangue, saliva, urina, swab nasofaríngeo, escarro, fezes e swab anal; com taxas variadas de positividade. O emprego multi-amostra no diagnóstico pode melhorar sua precisão e reduzir a taxa de falsos negativos, além de facilitar a orientação quanto ao tratamento clínico e ao acompanhamento do paciente (WU *et al.*, 2020; ALVES *et al.*, 2021). O soro é a amostra de fluido corporal tradicionalmente escolhida entre os testes imunológicos, porém sua coleta pode ser especialmente desafiadora em alguns ambientes, como áreas rurais, com recursos e acesso limitados à saúde, já que requer materiais específicos para aquisição e processamento da amostra, além de um flebotomista treinado para o processo (WHO, 2010; CDC, 2020b).

A punção venosa é um procedimento invasivo, podendo aumentar o risco de infecções acidentais por exposição a patógenos transmitidos pelo sangue (ADAMS *et al.*, 2020; NAGAOKA *et al.*, 2021), além da difícil coleta em bebês ou crianças pequenas, ou de casos nos quais os pacientes não desejam fornecer sua amostra de sangue por motivos pessoais ou religiosos (EAMUDOMKARN *et al.*, 2018).

As manchas de sangue a seco coletadas por punção no dedo ou no calcanhar são uma alternativa minimamente invasiva com potencial para resolver alguns dos desafios logísticos associados à punção venosa e oferecem as vantagens de estabilidade da amostra e possibilidade de autocoleta (WALKER *et al.*, 2021), evidenciando a necessidade de estudos que busquem opções de amostras biológicas aplicáveis para diagnóstico, mais práticas na coleta e no processamento, além de estabilidade considerável.

Paralelamente, o uso da urina para a triagem de anticorpos sensíveis seria bem mais conveniente para a prática clínica e triagem em massa, uma vez que tal amostra é naturalmente expelida por todas as pessoas, independentemente da idade, do sexo e da religião, além de ter uma coleta não invasiva, simples e segura (EAMUDOMKARN *et al.*, 2018).

Para exames sorológicos, que avaliem a reação do sistema imune do indivíduo ao patógeno, um estudo feito por Eamudomkarn e colaboradores (2018) empregou amostras de fezes, sangue e urina, coletadas simultaneamente de indivíduos residentes de área endêmica, para avaliação do desempenho diagnóstico por ELISA indireto para *estrongiloidíase*, obtendo valores de acurácia semelhantes entre urina e soro.

A correlação entre os níveis de anticorpos no soro e na urina sugere que os anticorpos na urina sejam derivados do soro (VÁZQUEZ *et al.*, 2007). Embora a concentração de anticorpos na urina seja cerca de 4.000 a 10.000 vezes menor quando comparado ao soro (KATSURAGI *et al.*, 1998; ZHAO *et al.*, 2017), é possível medir os anticorpos quantitativamente usando o método de ELISA (urina ELISA) (ITOH *et al.*, 2001), podendo ter diversas aplicações, como seu uso para estudos epidemiológicos de variadas doenças (NAGAOKA *et al.*, 2021).

2.8. PROBLEMÁTICA

Devido à pandemia e ao crescente número de casos, somados às mutações e novas variantes do vírus, que apresentam maior transmissibilidade e potencial de burlar a proteção vacinal, ocorre uma demanda elevada por testes diagnósticos disponíveis com altos índices de sensibilidade e especificidade (WHO, 2022). Além disso, nos países de baixo e médio desenvolvimento, observa-se uma subnotificação importante de casos, principalmente, devido ao alto custo para realização de testes moleculares, que são direcionados apenas para casos de maior gravidade nos setores públicos (OPAS/OMS, 2022).

Os testes diagnósticos diretos e indiretos são complementares, sendo os primeiros aplicáveis no período de 3 a 7 dias do início dos sintomas, período em que possuem melhor índice de sensibilidade, sendo prejudicada com o passar dos dias após início dos sintomas, contrapondo aos testes imunológicos que detectam com maior confiabilidade as imunoglobulinas anti-SARS-CoV-2 depois de 2 ou mais semanas após o início dos sintomas (CHRISTENSEN; AZAR; TURBETT, 2022).

Os testes imunológicos podem, então, identificar indivíduos que desenvolveram imunidade após convalescença da doença, contribuindo significativamente para os estudos epidemiológicos, além de fornecer um parâmetro de avaliação do sistema imune dos indivíduos com suas amostras analisadas, seja por uma infecção

pregressa ou exposição vacinal (AMANAT *et al.*, 2020; KHAZAAL *et al.*, 2022). Com isso, um acompanhamento longitudinal permitiria maior entendimento da evolução da doença. Amostras de urina contêm nível significativo de anticorpos para serem dosados e sua coleta é não invasiva, prática e segura, sendo um espécime potencial biológico para testes imunológicos (NAGAOKA *et al.*, 2021).

Os ensaios imunológicos também têm sido relevantes para pacientes que procuram atendimento médico com complicações tardias da doença e persistência de sintomas causados por COVID-19 (ZHAO *et al.*, 2020; MATTA *et al.*, 2022). Somado a essas necessidades, a otimização dos testes diagnósticos são úteis especialmente em países em desenvolvimento e em investigações epidemiológicas de larga escala. O emprego de sistemas procarióticos na produção de antígeno, em detrimento de sistemas eucarióticos, apresenta vantagens, como maiores taxas de produtividade, menor tempo de produção, mais simples laboratorialmente e com custos significativamente reduzidos (LI, D.; LI, J., 2021; ROSANO G.L; CECCARELLI E.A., 2021).

Portanto, o presente trabalho relata o desenvolvimento de um método diagnóstico *in house* para a COVID-19, baseado na plataforma de ELISA, a partir da detecção de anticorpos específicos em amostras de urina, com a utilização das proteínas recombinantes do Nucleocapsídeo (N) e *Spike* (S) do SARS-CoV-2.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o uso da urina como amostra biológica para teste diagnóstico de anticorpos específicos contra SARS-CoV-2 utilizando proteínas específicas do vírus como antígeno.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar amostras de urina e soro de indivíduos categorizados clinicamente e laboratorialmente para presença ou não de infecção por SARS-CoV-2;
- Identificar a presença de anticorpos específicos anti-Nucleocapsídeo e anti-*Spike* de SARS-CoV-2 em amostras de urina de pacientes sintomáticos e com RT-qPCR confirmatório para SARS-CoV-2;
- Avaliar a sensibilidade e especificidade do teste imunológico, baseado na detecção de anticorpos específicos de SARS-CoV-2 em plataforma de ELISA indireto, utilizando urina e comparar às amostras de soro coletados em paralelo;
- Determinar a curva de conversão imunológica de IgG em amostras de urina com diferentes dias de coleta e comparar à conversão de amostras de soro;
- Avaliar a utilização da urina como material biológico a ser empregado no diagnóstico da COVID-19 baseado na detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2;
- Estabelecer em urina nova metodologia para diagnóstico da COVID-19 utilizando plataforma de ELISA.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO

Este estudo foi realizado durante o período de Agosto de 2020 a julho de 2022 (**Figura 9**), desde a idealização do projeto, aprovação do comitê de ética, identificação da população do estudo, coleta de amostras, realização dos experimentos, análises estatísticas e produção científica.

Amostras de urina e soro foram coletadas de pacientes/indivíduos que cumpriam os critérios do projeto, eram não vacinados contra o vírus SARS-CoV-2 e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). As amostras foram armazenadas no Laboratório de Infectologia e Medicina Tropical (LIMT) da Faculdade de Medicina, UFMG, até o seu uso. Plataforma de ELISA convencional, baseado em soro, previamente estabelecida no Centro de Tecnologia de Vacinas (CT-Vacinas) da UFMG, foi utilizada como *know-how* para estabelecer o novo ELISA baseado em urina. Os ensaios sorológicos foram realizados no CT-Vacinas, as análises estatísticas e produção científica foram realizadas no LIMT.

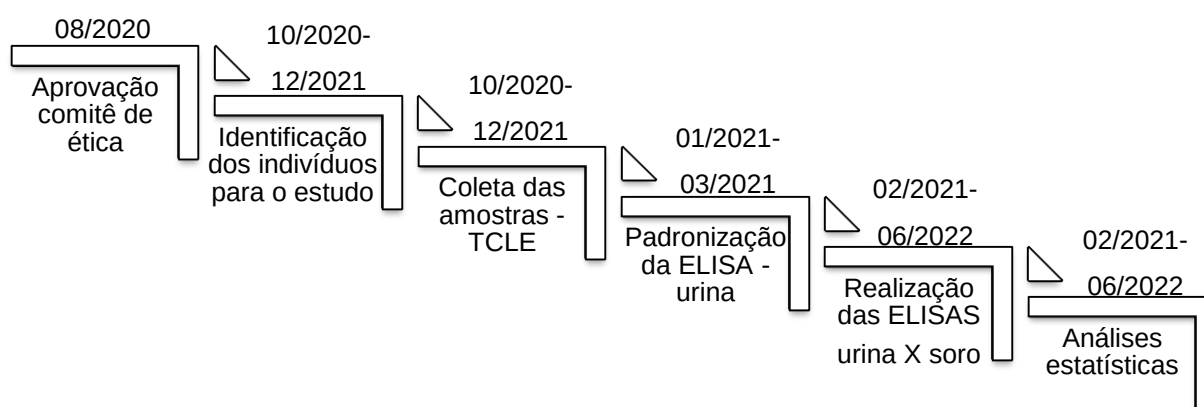


Figura 9. Fluxograma da execução do projeto.

4.2. POPULAÇÃO DO ESTUDO

4.2.1. Comitê de Ética

A pesquisa desenvolvida compôs um projeto guarda-chuva intitulado “Características clínicas, de imagem pulmonar e laboratoriais de pacientes com infecção por SARS-CoV-2 admitidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais”, aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), com o protocolo CAAE 30437020.9.0000.5149 (**ANEXO I**).

Todos os participantes eram adultos, de ambos os sexos, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e receberam uma cópia do mesmo. Pacientes hospitalizados foram recrutados no Hospital das Clínicas da UFMG (Belo Horizonte, Brasil) e no Hospital Santa Helena (Betim, Brasil) e indivíduos não hospitalizados foram recrutados por meio de busca ativa na população geral (Belo Horizonte, Brasil).

Os pacientes que procuraram atendimento hospitalar apresentando sintomas respiratórios ou característicos de COVID-19 foram avaliados pelo médico assistente e incluídos neste estudo após confirmação de teste qRT-PCR positivo para SARS-CoV-2. Pacientes não hospitalizados que apresentaram sintomas leves de COVID-19 e testaram positivo para SARS-CoV-2 por qRT-PCR também foram incluídos neste estudo.

Também incluímos amostras negativas não pareadas, coletadas em período anterior a 2019, do início da pandemia, que foram denominadas no projeto “negativas pré-covid”, além de amostras chamadas “negativas pós-covid”, de indivíduos que mantiveram rigorosa quarentena e não tiveram quaisquer sintomas, sendo considerados teoricamente negativos.

4.2.2. Amostras

O projeto foi desenvolvido pela captação indivíduos não vacinados contra o vírus SARS-CoV-2, com a utilização de amostras de urina e soro (n=209 e n=187, respectivamente) nos experimentos frente à proteína rSARS-CoV-2 N. Já as proteínas rSARS-CoV-2 S1-NGlic e RBD-NGlic foram avaliadas frente a 175 amostras de urina e de soro e, para rSARS-CoV-2 S-Glic, foram 75 amostras de urina e de soro.

As amostras dos pacientes internados foram coletadas no primeiro dia de inclusão no estudo (dia 1) e, sempre que possível, também nos dias 3, 7 e 14 após o recrutamento, para avaliação longitudinal, variando-se o dia após início dos sintomas correspondente para cada paciente. Amostras de urina e soro de indivíduos não hospitalizados, que testaram positivo para infecção por SARS-CoV-2 por RT-qPCR, foram coletadas entre 20 e 60 dias do início dos sintomas.

As amostras negativas chamadas de “pré-COVID-19” foram coletadas antes de 2019 e consideradas verdadeiramente negativas. As amostras negativas chamadas de “negativas pós-COVID-19” foram coletadas durante o período da pandemia (2020-2022) de indivíduos saudáveis que mantiveram uma quarentena rigorosa e que não apresentaram nenhum sintoma da doença, sendo consideradas teoricamente negativas. Ambos os conjuntos de amostras negativas foram usados como controles negativos.

As coletas das amostras de urina foram realizadas em paralelo com amostras de sangue, em qualquer período do dia e sem um tempo fixo de retenção, mas era aconselhada a coleta da urina da manhã ou após um período médio de retenção de 4 horas, quando possível. Utilizaram-se frascos estéreis de 80 mL para coleta de urina e o conteúdo foi transferido para tubos de 15 mL contendo azida sódica (71289, Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) em concentração final de 0,1% (v/v). Os tubos foram transportados em temperatura ambiente e armazenados à temperatura de 2 a 8 °C até a utilização. As amostras de urina pré-COVID-19 foram coletadas anteriormente a 2019 e mantidas sob refrigeração (2 a 8 °C) até o uso.

As amostras de sangue foram coletadas através de punção venosa utilizando tubo estéril de coleta de 20 mL sem anticoagulante e contendo gel separador de soro. Os tubos foram centrifugados a 3.500 rpm por 15 min a 4 °C, com a coleta do soro e armazenamento em tubos cônicos do tipo *eppendorfs* a -20 °C, até o uso.

4.3. OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Os genes que codificam as proteínas do Nucleocapsídeo (N) e *Spike* (S) de SARS-CoV-2 (MT126808.1) foram sintetizados em vetor de expressão heteróloga. O vetor pET-24a (+) contendo os insertos correspondentes às sequências da proteína N (QIG56001) e da proteína S (QIG55994.1) foi transformado e expresso em células bacterianas de *Escherichia coli* cepa BL21 (DE3) e induzidas em meio com Isopropil

β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) (0,5 mM) por 4 h a 37°C para expressão de proteínas recombinantes.

As proteínas N e S recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade usando colunas de níquel em um sistema AKTA prime plus (GE Healthcare, EUA), visto a inclusão de cauda de histidinas nas proteínas após sua expressão e purificação. A proteína N foi purificada da porção solúvel, enquanto a proteína S, da fração insolúvel, com adição de 8 M de ureia. SDS-PAGE 12% foi realizado para avaliar a pureza da proteína recombinante.

A proteína parcial rSARS-CoV-2 *Spike*, expressa em células CHO de mamífero foi adquirida comercialmente (FPZ0540, Fapon Biotech Inc). As sequências de aminoácidos das proteínas recombinantes expressas no sistema procariótico, denominadas aqui, S1-NGlic e RBD-NGlic e expressas no sistema eucariótico, denominado aqui, S-Glic, foram comparadas por alinhamento com a sequência de aminoácidos da proteína *Spike* de SARS-CoV-2.

4.4. ELISA

A metodologia de ELISA foi realizada de acordo com Bagno e colaboradores (2021; 2022), seguindo as condições experimentais ideais para cada tipo de proteína recombinante utilizada, rSARS-CoV-2 N, rSARS-CoV-2 S glicosilada e rSARS-CoV-2 RBD e rSARS-CoV-2 S1 não glicosiladas, e para cada amostra, urina ou soro.

4.4.1. Amostras de urina

Primeiramente, foi realizada uma curva de titulação para a determinação da concentração das proteínas recombinantes N e S de SARS-CoV-2 (50 a 1000 ng), diluição de urina (1:1 e sem diluição) e conjugado anti-IgG humano (1:80.000 a 1:2.500) mais apropriados, em diferentes tempos de incubação (30 a 60 min). Após a titulação, os melhores parâmetros para as proteínas recombinantes e cada tipo de amostra foram aplicados na ELISA, utilizando maior número de amostras.

Placas de poliestireno (*High binding 96-well polystyrene microplate* - Corning, Merck, Germany, catalog number: CLS2592) foram revestidas com as proteínas recombinantes diluídas em tampão carbonato por 16 h a 4°C: 400 ng de antígeno/poço de cada proteína recombinante N e S (rSARS-CoV-2 S1-NGlic, RBD-NGlic ou S-Glic). Após a sensibilização, fez-se o bloqueio utilizando 200 μ L de solução contendo PBS 1x, Tween 20 0,05% (PBS-T) e BSA 1% por 2 h a 37 °C. Em

seguida, as placas foram lavadas 5 vezes utilizando PBS-T e incubadas com 100 μ L de urina não diluída por 1 h a 37 °C. As placas foram lavadas 5 vezes utilizando PBS-T e posterior incubação com 100 μ L de anticorpo anti-IgG humano conjugado com peroxidase, na diluição de 1:10000 para a proteína N (A0170, Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) e para a proteína S (A18811, Invitrogen), em PBS-T por 1 h a 37 °C. Novamente, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS-T e as reações foram reveladas usando solução cromogênica TMB (3,3',5,5-tetrametilbenzidina, Moss, EUA) durante 30 min e no escuro. A reação foi interrompida adicionando H₂SO₄ (0,5 M) e a densidade óptica (DO) foi lida em espectrofotômetro para microplacas de ELISA (Multiskan Go), a λ 450 nm.

4.4.2. Amostras de soro

Para validação do ensaio foi realizada uma comparação da eficiência do ELISA entre urina e soro. Os ensaios usando amostras de soros foram realizados com protocolo previamente otimizado (BAGNO *et al.*, 2021 e Bagno *et al.*, 2022). A sensibilização das placas foi realizada utilizando 400 ng de cada uma das proteínas recombinantes N e S, (S1-NGlic, RBD-NGlic ou S-Glic), com a diluição de soro (1:100) e anticorpo anti-IgG (Fapon) 1:10000, com tempos de incubação de 30 min cada.

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tamanho amostral utilizado foi de conveniência e as análises foram feitas utilizando o programa GraphPad Prism (versão 8.0 para Windows). As distribuições de valores (média $\pm$ desvio padrão, conforme indicado) foram obtidas para variáveis contínuas, enquanto as categóricas foram avaliadas como proporções. O desempenho diagnóstico foi avaliado pela estimativa de sensibilidade, especificidade, área sob a curva e índice de Youden. Os intervalos de confiança (IC) foram definidos com nível de confiança de 95% (IC 95%). O teste t pareado foi utilizado para comparar os grupos distintos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os valores preditivos positivos e negativos (VPP e VPN, respectivamente) foram calculados com base no valor do *index*, excluindo as amostras de valores indeterminados, e usando as seguintes equações: $VPL = \text{verdadeiro negativo} / \text{falso negativo} + \text{verdadeiro negativo}$ e $VPP = \text{verdadeiro positivo} / \text{falso positivo} + \text{verdadeiro positivo}$.

Os valores de corte (*cut-off*) dos ELISAs foram definidos como três desvios padrão (DP) para a proteína N ou dois desvios padrão (proteína S) somados à densidade óptica (DO) (450 nm) média das amostras de urina ou soro verdadeiramente negativas para a proteína N ou S:

$$\text{cut-off} = X_{\text{neg}} + 3 (DP_{\text{neg}}) \text{ para Proteína N}$$

$$\text{cut-off} = X_{\text{neg}} + 2 (DP_{\text{neg}}) \text{ para proteína S}$$

X_{neg} : Média de DO das amostras negativas (DO)

DP_{neg} : desvio padrão de DO das amostras negativas

O valor *index* (I) de cada amostra foi calculado de acordo com a equação:

$$I = (DO_{450nm}) / (\text{cut-off})$$

Os resultados foram classificados segundo valores de *Index*: não reativos ou negativos ($I < 0,8$), indeterminados ($0,8 \leq I < 1,1$) e reativos ou positivos ($I \geq 1,1$). As curvas ROC foram construídas a partir dos valores de *index* das amostras positivas versus negativas (negativas pré e pós-COVID-19) para as proteínas N e S, sendo analisados três fragmentos distintos da mesma proteína recombinante *Spike* (S1-NGlic, RBD-NGlic e S-Glic).

A correlação entre as proteínas rSARS-CoV-2 RBD-NGlic e S1-NGlic versus rSARS-CoV-2 S-Glic foi realizada utilizando amostras pareadas de urina e soro e comuns para as três proteínas rSARS-CoV-2 *Spike*. Amostras de pacientes com COVID-19 (n=44) e doadores saudáveis (n=31) foram incluídas na análise comparativa das proteínas expressas em sistema procariótico (rSARS-CoV-2 RBD-NGlic e rSARS-CoV-2 S1-NGlic) à proteína comercial expressa em sistema eucariótico (rSARS-CoV-2 S-Glic).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão divididos em 2 capítulos:

- **Capítulo 1:** resultados obtidos para a proteína recombinante do Nucleocapsídeo (N) de SARS-CoV-2.
- **Capítulo 2:** resultados obtidos para as proteínas recombinantes *Spike* (S) de SARS-CoV-2.

CAPÍTULO 1 - PROTEÍNA DO NUCLEOCAPSÍDEO (N)

5.1. CAPÍTULO 1 - Proteína do Nucleocapsídeo (N)

Os indivíduos pertencentes ao estudo foram caracterizados quanto à idade e ao sexo, e para os pacientes, também o tipo de hospitalização (**Tabela 1**).

Para avaliação do uso de urina como amostra no ensaio de ELISA frente à proteína rSARS-CoV-2 N foram incluídos 139 pacientes adultos hospitalizados ou não hospitalizados, após confirmação positiva da infecção por SARS-CoV-2 por qRT-PCR. Os pacientes hospitalizados recrutados para este estudo representaram 16,3% do número total de pacientes confirmados para COVID-19 admitidos durante o período de coleta nos hospitais do estudo. Foram coletadas 209 amostras de urina e 187 de soro, de forma pareada quando possível, e que variaram desde o 2º ao 60º dia do início dos sintomas.

Também incluímos amostras negativas não pareadas coletadas antes de 2019 (n=19) e de indivíduos que mantiveram um regime rigoroso de quarentena e que não apresentaram nenhum sintoma de COVID-19 (n=11), sendo total de 30 amostras negativas.

Tabela 1. Caracterização demográfica da coorte do estudo.

Características	Indivíduos saudáveis (n = 30)	Pacientes não hospitalizados (n = 11)	Pacientes hospitalizados * (n = 128)
Idade, média ($\pm$ DP)	40,5 $\pm$ 16,6	45,1 $\pm$ 5	62 $\pm$ 21
Sexo feminino, %	75	45,5	41,8
Enfermaria, %	0	0	29,75
Admissão na UTI, %	0	0	70,35

Legenda: DP, desvio padrão; UTI, unidade de terapia intensiva.

*Os pacientes hospitalizados recrutados para este estudo representaram 16,3% do número total de pacientes confirmados para COVID-19 admitidos durante o período de coleta nos hospitais do estudo.

5.1.1. Proteína recombinante

A avaliação da pureza da proteína recombinante do Nucleocapsídeo (N) foi realizada através de um gel SDS-PAGE a 12%, como evidenciado na **Figura 10**.

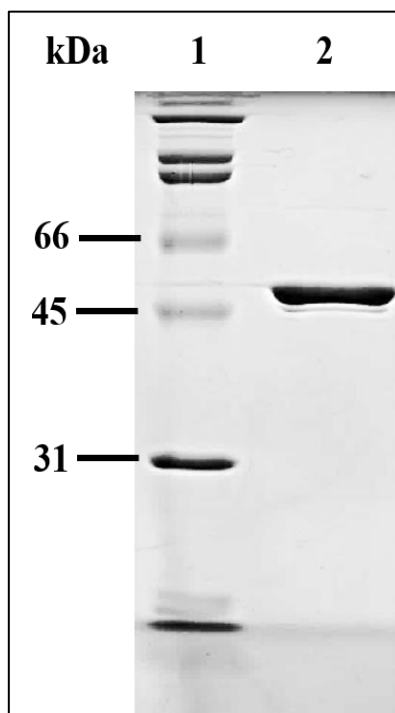


Figura 10. SDS-PAGE (12%) da proteína rSARS-CoV-2 N.

Canaleta 1: Peso molecular (Biorad® Broad-Range) e **Canaleta 2:** Proteína recombinante N de SARS-CoV-2.

5.1.2. Detecção de anticorpos específicos para SARS-CoV-2 em amostras de urina

De um total de 209 amostras de urina coletadas de 139 pacientes positivos para qRT-PCR, em diferentes dias após início dos sintomas, 187 amostras de urina reagiram com a proteína rSARS-CoV-2 N acima do valor de *index* positivo de $>1,1$, enquanto 15 amostras foram classificadas como “indeterminadas” (valores de *index* entre 0,8 a 1,1) e 7 tiveram *index* negativo ($<0,8$) (**Tabela 2**).

Tabela 2. Avaliação da presença de anticorpos anti-SARS-CoV-2 em amostras de urina.

	Amostra positiva *	Amostra negativa† (Controle)
<i>Index</i> positivo (>1,1)	187 (90%)	-
<i>Index</i> indeterminado (0,8 a 1,1)	15 (7%)	4 (13%)
<i>Index</i> negativo (<0,8)	7 (3%)	26 (87%)
Total de amostras	209 (100%)	30 (100%)

Legenda:

* Amostras positivas são coletadas de 139 pacientes positivos para qRT-PCR, em diferentes dias de início dos sintomas.

† Amostras negativas coletadas antes de 2019 foram consideradas verdadeiramente negativas e chamadas de “pré-COVID-19”. Amostras negativas de indivíduos que mantiveram um regime rigoroso de quarentena e não apresentaram nenhum sintoma foram consideradas teoricamente negativas e chamadas de “pós-COVID-19”.

Das 209 amostras, 11 indivíduos eram pacientes não hospitalizados e com sintomas leves, destas, 9 apresentaram valores *index* positivos (n=9) e 2 indeterminados (n=2), mas todos obtiveram *index* $\geq 0,9$. Nenhuma das amostras de urina obtidas de controles negativos pré e pós-COVID-19 (n=19 e n=11, respectivamente) reagiu com a proteína rSARS-CoV-2 N com *index* positivo acima de 1,1. Além disso, 26 amostras negativas tiveram um valor *index* negativo abaixo de 0,8 e 4 tiveram um valor *index* indeterminado de 0,81, 0,85, 0,87 ou 0,94 (**Tabela 3**).

Tabela 3. Valores *index* obtidos para pacientes não hospitalizados, de acordo com o dia após o início dos sintomas, por ELISA utilizando urina.

Indivíduos não hospitalizados (n=11)	Dias após início dos sintomas	<i>Index</i> (Valor)*
1	20	2,5
2	60	11,3
3	30	1,5
4	30	0,9
5	60	1,4
6	21	1,1
7	46	3,4
8	59	2,0
9	60	0,9
10	25	1,7
11	30	1,2

**Index* (valor): positivo acima de 1,1, indeterminado entre 0,8 e 1,1 e negativo abaixo de 0,8.

5.1.3. Avaliação da conversão imunológica de IgG

Uma avaliação seriada de anticorpos IgG foi realizada em amostras de urina e soro de 44 pacientes nos dias 1, 3, 7 e 14 após sua inclusão no estudo. A imunoconversão para a proteína SARS-CoV-2 N foi observada na urina, com aumento dos níveis de IgG após o início dos sintomas, que, no entanto, variou de acordo com o paciente (**Figura 11**).

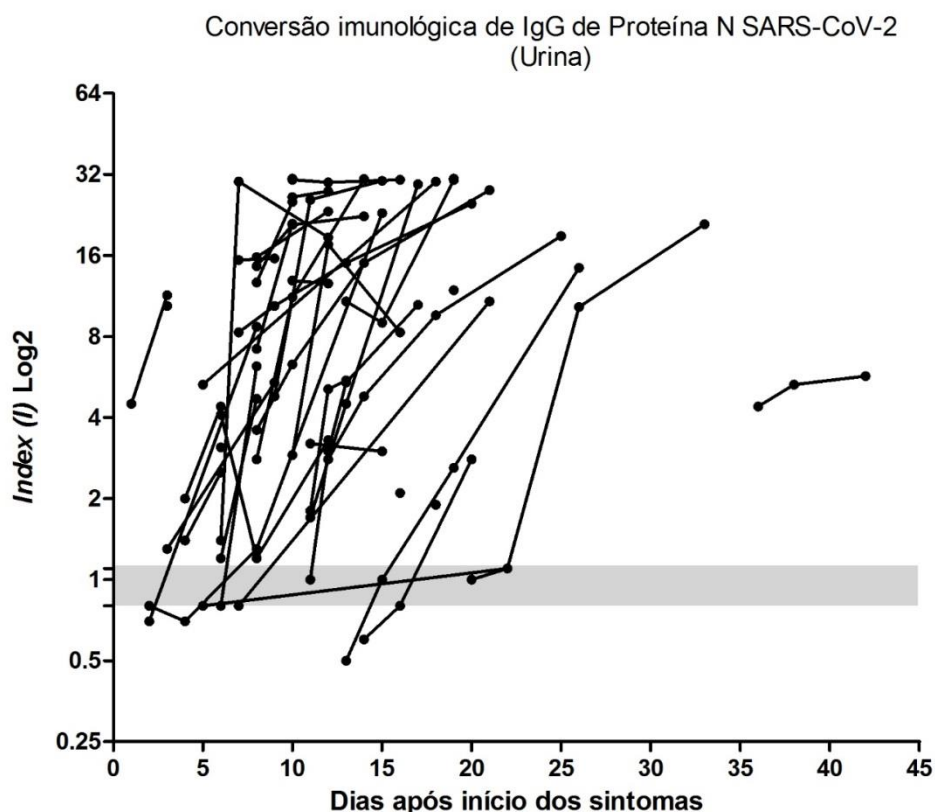


Figura 11. Gráfico representativo da conversão imunológica dos anticorpos IgGs contra SARS-CoV-2 na urina.

Os pacientes são representados pelas linhas interligadas pelos pontos (amostra coletada em diferentes dias de início dos sintomas). Os valores de *index* plotados (I) estão relacionados à razão de absorvância pelo *cut-off* ($DO/cut-off$). Valor do *index* positivo, acima de 1,1; valor de *index* indeterminado, entre 0,8 e 1,1 (cinza); e valor de *index* negativo, abaixo de 0,8.

Um ELISA comparativo usando amostras de urina ou soro de 34 pacientes com pelo menos 2 dias de coleta da amostra revelou que a conversão imunológica ocorre com pequena variação entre as diferentes amostras. No entanto, observamos valores de *index* mais elevados para as amostras de urina quando comparadas com soro, de forma individual (**Figuras 12, 13, 14 e 15**), mas que se explica pelo baixo valor de *cut-off* obtido experimentalmente, que ao determinar a razão $DO/cut-off$ gera valores de *index* proporcionalmente mais discrepantes para cada amostra, melhorando a visualização qualitativa do resultado.

Para os pacientes dos quais foi coletada apenas uma amostra, não foi possível determinar o dia, em relação ao início dos sintomas, em que ocorreu a conversão imune e, assim, só foi possível determinar se eram positivos ou negativos no dia da coleta da amostra.

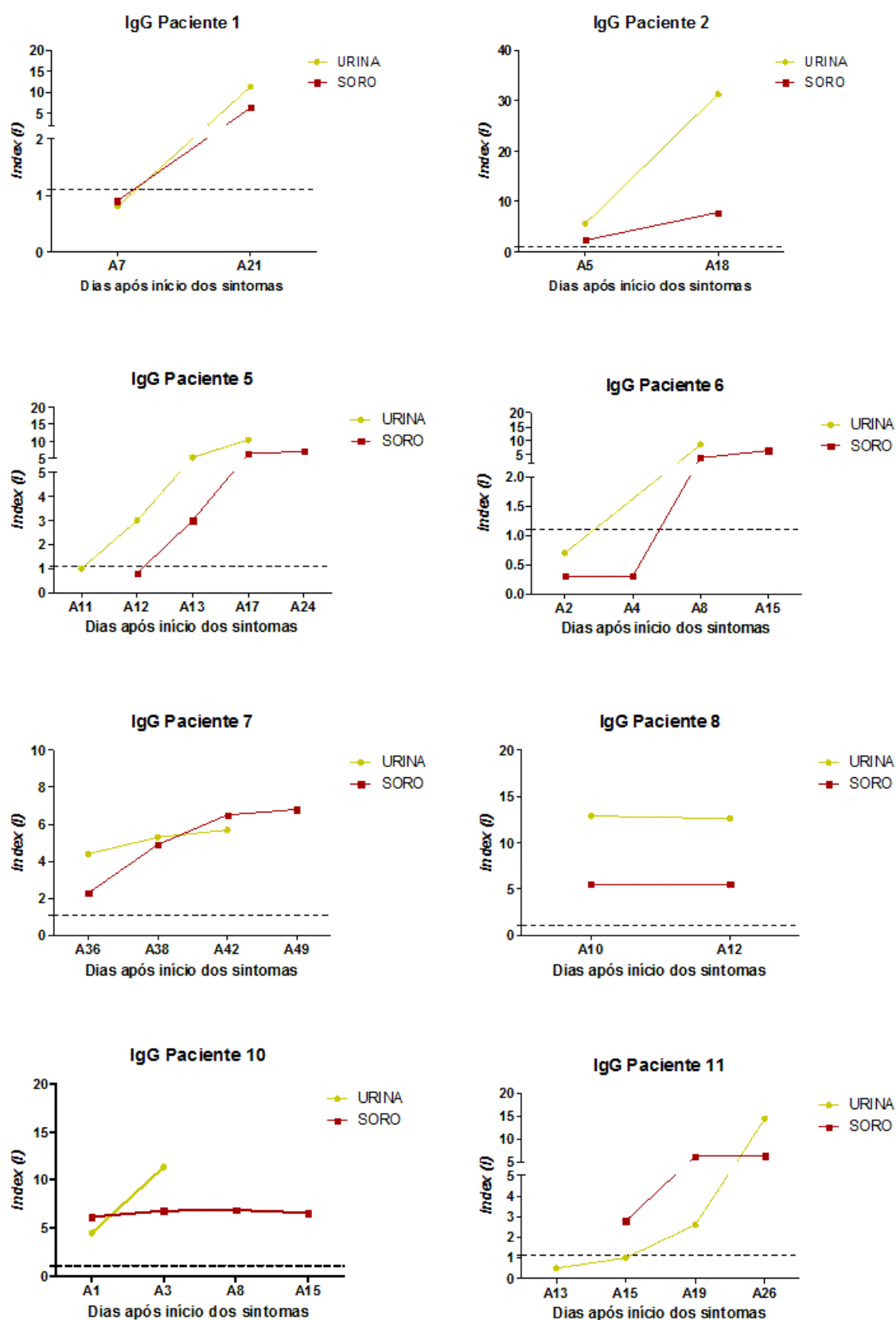


Figura 12. Conversão imunológica comparativa dos anticorpos contra SARS-CoV-2 na urina e no soro dos pacientes individualmente (A).

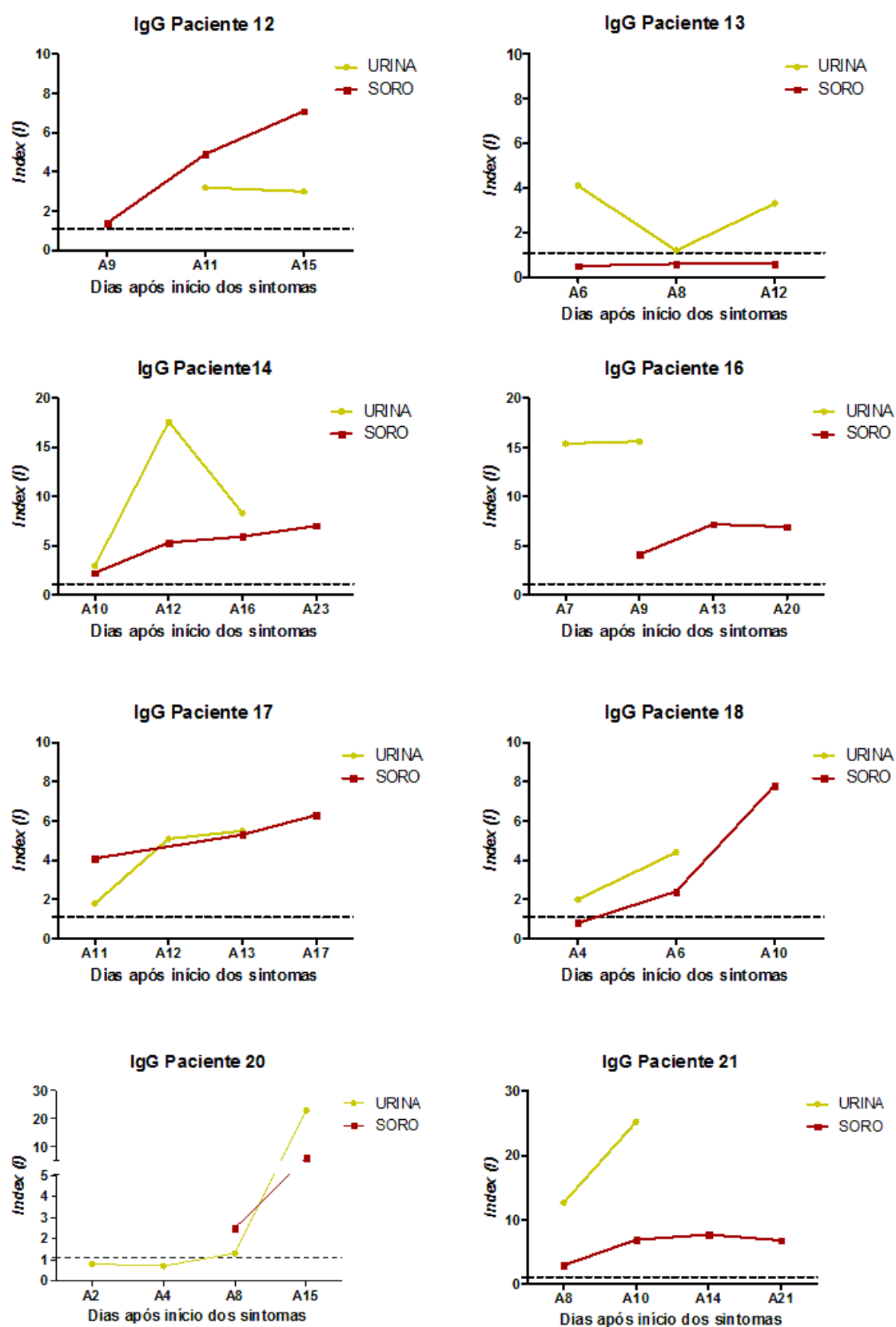


Figura 13. Conversão imunológica comparativa dos anticorpos contra SARS-CoV-2 na urina e no soro dos pacientes individualmente (B).

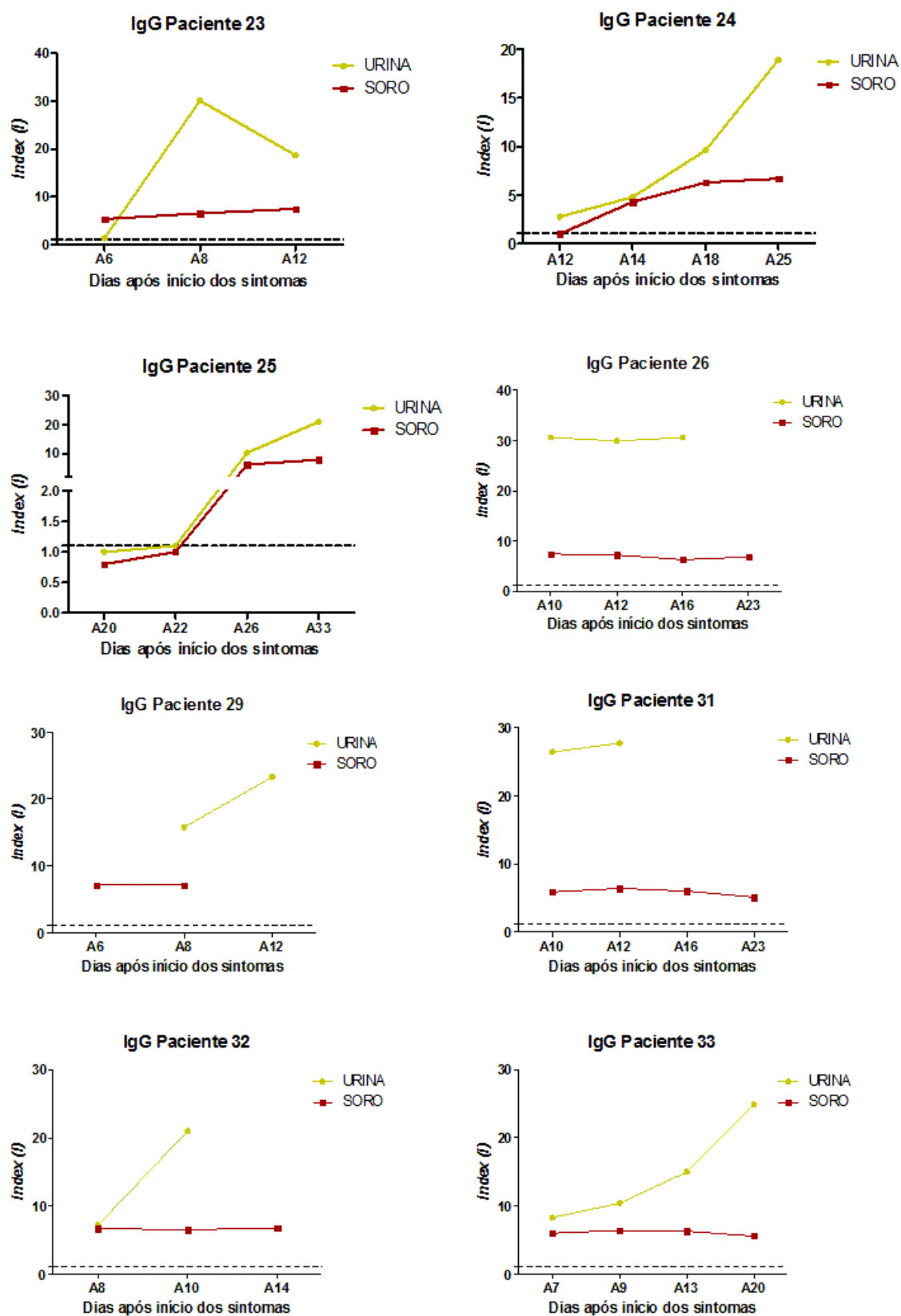


Figura 14. Conversão imunológica comparativa dos anticorpos contra SARS-CoV-2 na urina e no soro dos pacientes individualmente (C).

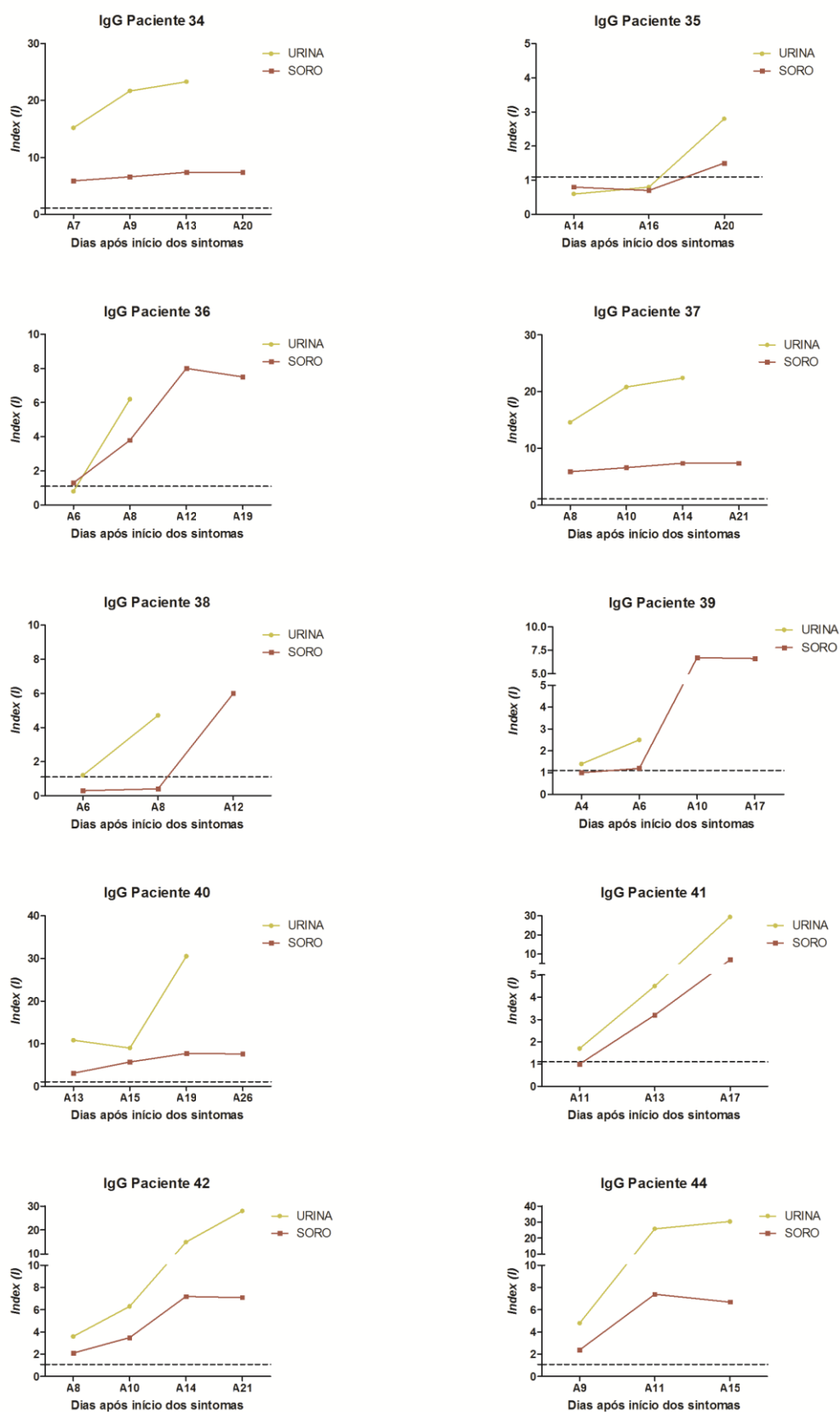


Figura 15. Conversão imunológica comparativa dos anticorpos contra SARS-CoV-2 na urina e no soro dos pacientes individualmente (D).

Os dias de coleta das amostras para cada paciente variaram em D1, D3, D7 e/ou D14 após a internação. Os valores *index* ($DO/cut-off$) estão plotados de acordo com o dia após início dos sintomas (A) e interligados por linhas, sendo cada cor específica para o tipo de amostra, urina (amarelo) e soro (vermelho). Valor de *index* é positivo acima de 1,1 (linha tracejada), indeterminado entre 0,8 e 1,1 e negativo abaixo de 0,8.

5.1.4. Distribuição de conversão imune de pacientes hospitalizados por dia de início dos sintomas

Um gráfico de distribuição foi gerado com base no dia de início dos sintomas da coleta de amostra de cada paciente para avaliar a janela de tempo em que a maioria dos pacientes apresentou um valor de *index* positivo, indicando a presença de anticorpos específicos. Para indivíduos com mais de uma coleta, plotamos apenas amostras da primeira coleta com valor de *index* positivo. De um total de 128 pacientes, 123 pacientes (96%) apresentaram valores de *index* positivos ($>1,1$) para suas amostras de urina coletadas antes de 60 dias após o início dos sintomas. De um total de 125 pacientes, 107 pacientes (86%) apresentaram um valor de *index* positivo ($>1,1$) para suas amostras de soro pareadas. Quatro pacientes tiveram um valor de *index* negativo ($<0,8$) para suas amostras de urina, enquanto oito pacientes tiveram um valor de *index* negativo para suas amostras de soro, coletadas antes de 20 dias do início dos sintomas, enquanto após 21 dias do início dos sintomas, 2 pacientes apresentaram soro com *index* negativo e nenhum teve sua urina com *index* negativo (**Figura 16**).

Uma possível janela de conversão imunológica, baseada no dia do início dos sintomas, pode ser determinada para alguns pacientes com mais de duas coletas de urina, visto que obtiveram um valor de *index* negativo ($<0,8$) para a primeira coleta de amostra e se tornaram reagentes ($index > 1,1$) nas coletas subsequentes. Cinco pacientes (pacientes 23, 29, 39, 86 e 104) se tornaram reagentes ($index > 1,1$) antes de 20 dias do início dos sintomas e dois pacientes (pacientes 16 e 105) após 21 dias, enquanto apenas um (paciente 21) manteve um valor do *index* indeterminado (de 0,8 a 1,1) após 21 dias do início dos sintomas, conforme destacado pelos símbolos emparelhados localizados abaixo do número do paciente na **Figura 16**.

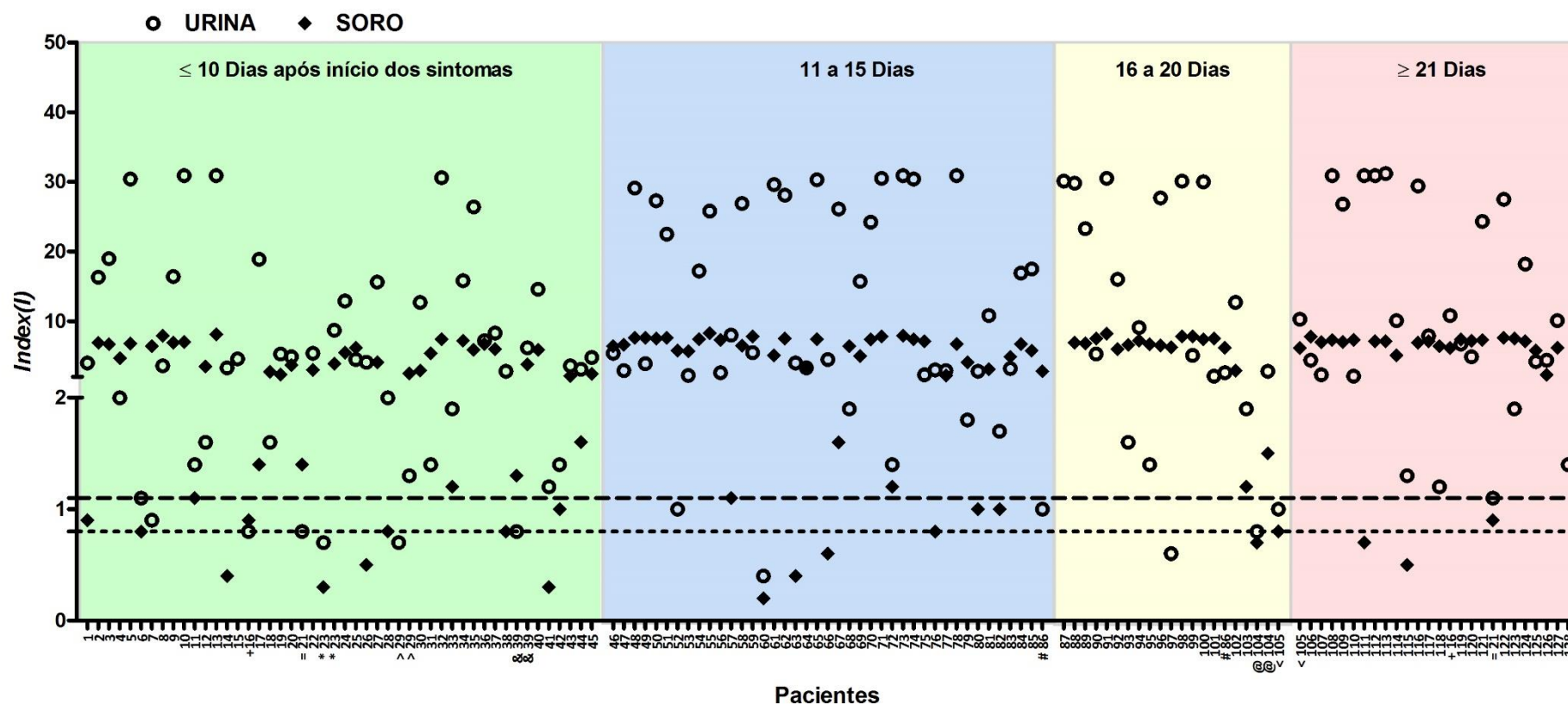


Figura 16. Valores do *index* (I) urinário e sérico de cada paciente de acordo com os dias de início dos sintomas.

Os valores de *index* obtidos das amostras de urina e soro de cada paciente são representados por círculos e losangos, respectivamente. Ambas as amostras, do último dia antes da conversão imunológica ($index < 1,1$) e do primeiro dia da conversão imunológica ($index > 1,1$), coletadas do mesmo paciente foram plotadas e são indicadas pelo símbolo correspondente abaixo do número do paciente. Apenas a primeira amostra coletada foi plotada para aqueles pacientes com todas as amostras com *index* positivo. Os dados individuais foram divididos de acordo com os dias do início dos sintomas: <10 (verde), 11 a 15 (azul), 16 a 20 (amarelo) e >21 dias (vermelho). Valor do *index* positivo, acima de 1,1; valor de *index* indeterminado, entre 0,8 e 1,1; e valor de *index* negativo, abaixo de 0,8.

5.1.5. Desempenho comparativo para detecção de anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2 N a partir de ELISA usando urina e soro

A eficiência diagnóstica para COVID-19 da proteína rSARS-CoV-2 N por ELISA foi avaliada contra um painel de amostras de urina e soro pareado, coletadas ao mesmo tempo, de pacientes hospitalizados e não hospitalizados. Para as análises, foram utilizadas amostras de urina e soro (n=209 e n=187, respectivamente) de pacientes positivos para qRT-PCR, bem como amostras negativas não pareadas de pré-COVID-19 (n=19) e pós-COVID -19 (n=11) urinas e soros pré-COVID-19 (n=30) e pós-COVID-19 (n=5). Os valores individuais de DO (densidade óptica) determinados para cada amostra de urina ou soro contra a proteína rSARS-CoV-2 N são mostrados em **Figura 17**.

Valores de sensibilidade e especificidade de 93,81 e 100%, respectivamente, foram calculados para amostras de urina testadas em ELISA, bem como 87,70 e 100%, respectivamente, para amostras de soro. O desempenho diagnóstico comparativo de ELISA baseado em urina e soro para COVID-19, sob protocolos experimentais ideais para cada amostra biológica, está apresentado na **Tabela 4**. As curvas ROC mostraram acurácia semelhante quando a urina foi testada (valor AUC=0,9856) em comparação com o soro (valor AUC=0,9577), mas sem diferença estatística significativa (**Figura 18**).

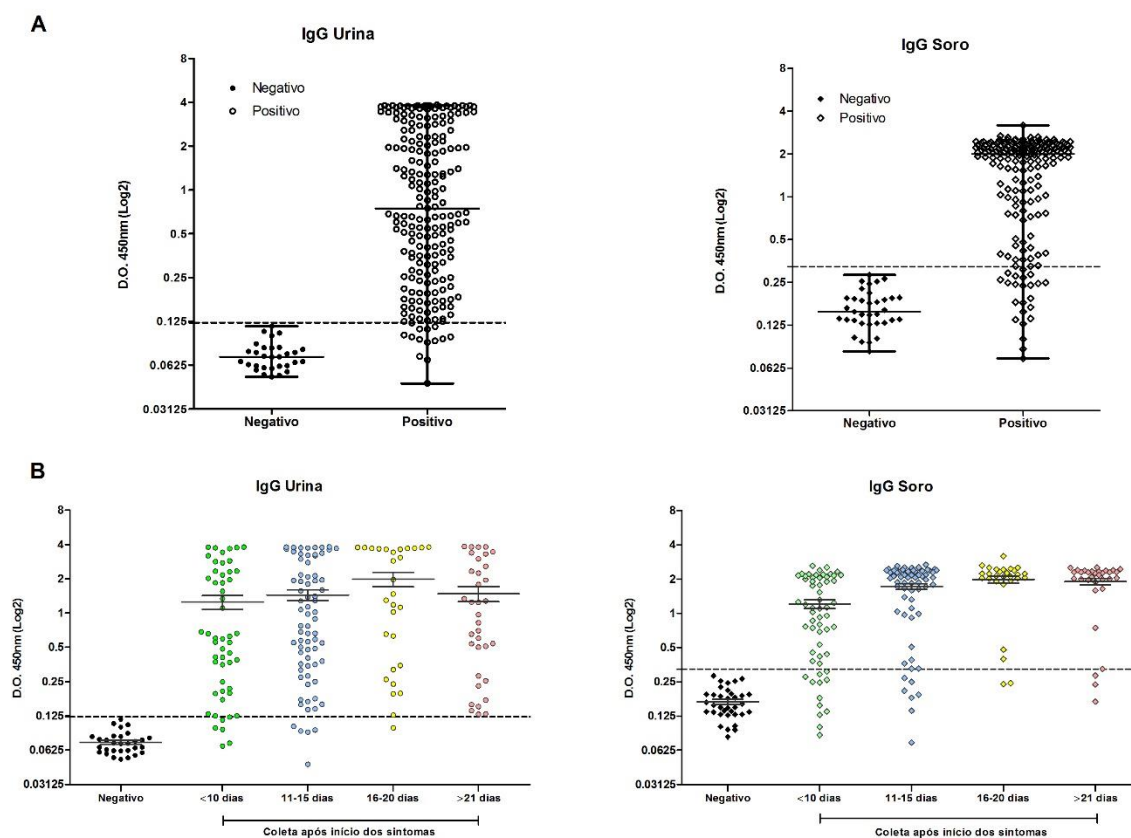


Figura 17. Avaliação de teste diagnóstico para COVID-19 utilizando a proteína rSARS-CoV-2 N baseado na pesquisa de anticorpos IgGs na urina e no soro.

O ELISA foi feito usando amostras de urina e soro ($n=209$ e $n=187$, respectivamente) de pacientes com COVID-19 com qRT-PCR positivo. **A)** Amostras de urina e soro não pareado de indivíduos saudáveis ($n = 30$ e $n= 37$, respectivamente) também foram usadas. A média de cada grupo é mostrada, e a linha tracejada indica o valor de *cut-off* determinado para cada tipo de amostra biológica (urina = 0,123 e soro = 0,323). Os valores de *cut-off* foram determinados como a média da DO dos negativos mais três vezes o DP de amostras negativas. **B)** Os grupos de amostras positivas foram divididos de acordo com os dias após o início dos sintomas: <10 (verde), 11 a 15 (azul), 16 a 20 (amarelo) e >20 dias (vermelho).

Tabela 4. Resultados comparativos do teste diagnóstico para COVID-19 baseado na pesquisa de anticorpos IgG anti-proteína N recombinante em urina e soro.

Amostra	AUC	valor P	Cut-off	Se (%)	95% IC	Esp (%)	95%IC	J	VPP	VPN
Urina	0,9856	<0,0001	0,123	93,81	89,65- 96,66	100,0	88,06- 100	0,938	1,0	0,788
Soro	0,9577	<0,0001	0,323	87,70	82,12- 92,04	100,0	90,00- 100	0,877	1,0	0,702

Amostras de pacientes sintomáticos para COVID-19 e com qRT-PCR positivo, bem como de indivíduos saudáveis pré-exposição ao vírus foram utilizadas. Os valores *index* individuais, gerado pela razão de densidade óptica sobre *cut-off* específico de cada grupo de amostra foram utilizados na construção das curvas ROC. O desempenho diagnóstico do antígeno em relação ao tipo de amostra utilizada se baseou na avaliação da sensibilidade (IC95%), especificidade (IC95%), área sobre a curva (AUC) e índice Youden (J). Legenda: J= (Se+Sp) -1.

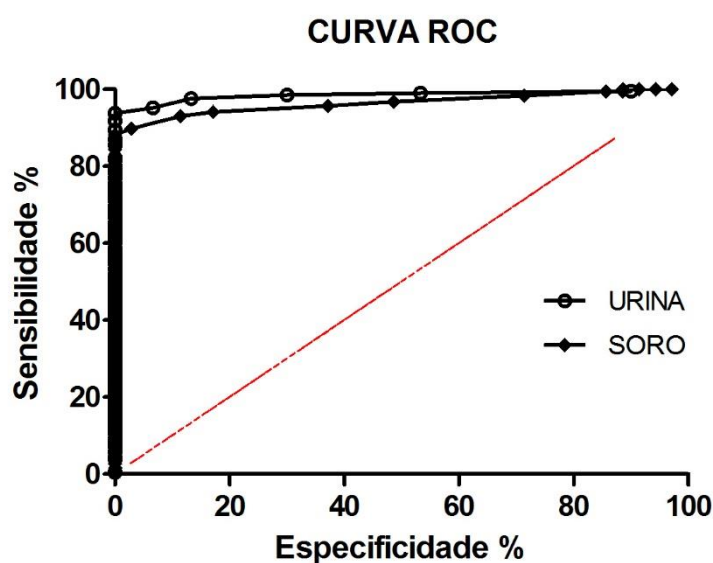


Figura 18. Desempenho diagnóstico comparativo de ELISA baseado em urina e soro para COVID-19.

Curvas ROC foram construídas a partir dos valores *index* (I) de cada grupo de amostras, para obter os valores de sensibilidade, especificidade e área sob a curva.

5.1.6. Avaliação de estabilidade da amostra de urina

Cinco amostras de urina escolhidas de forma aleatória, sem azida sódica, foram avaliadas por 5 dias consecutivos e após 10 dias, ou seja, 24, 48, 72, 96, 120 e 240h horas após a coleta da amostra.

Como observado na **Figura 19**, não houve alteração no desempenho do ensaio, entre a amostra fresca (dia 0) *versus* amostras armazenadas sob a forma refrigerada (2 a 8 °C) (dias 1, 2, 3, 4 e 10).

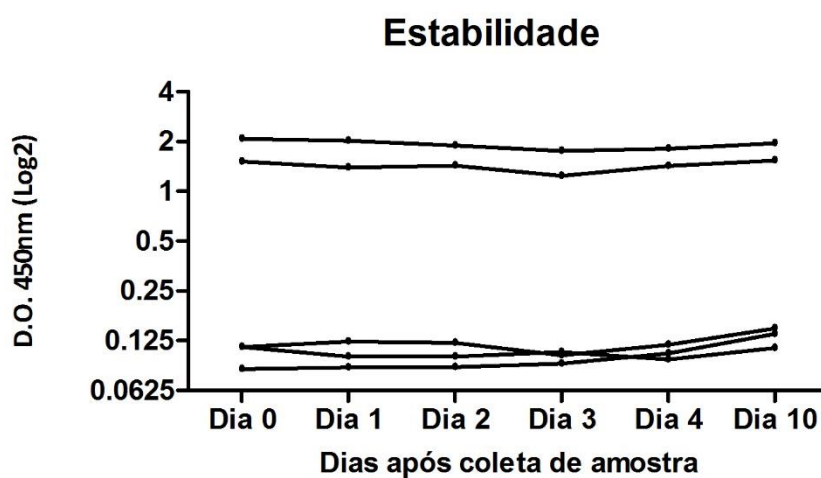


Figura 19. Estabilidade de amostras de urina armazenadas por vários dias após a coleta.

CAPÍTULO 2: PROTEÍNA *SPIKE* (S)

5.2. CAPÍTULO 2 - Proteína *Spike* (S)

Para avaliação do uso de urina como amostra no ensaio de ELISA frente a proteína S de SARS-CoV-2 foram incluídos pacientes adultos hospitalizados ou não hospitalizados, após confirmação positiva da infecção por SARS-CoV-2 por qRT-PCR. A eficiência imunodiagnóstica para COVID-19 foi avaliada para três proteínas recombinantes *Spike* de SARS-CoV-2, uma expressa em sistema eucariótico, S-Glic, e duas expressas em sistema procariótico, S1-NGlic e RBD-NGlic.

5.2.1. Proteína recombinante

As sequências de aminoácidos das proteínas recombinantes expressas no sistema procariótico, S1-NGlic e RBD-NGlic, e da proteína expressa no sistema eucariótico, S-Glic, foram comparadas por alinhamento com toda a sequência de aminoácidos da proteína *Spike* de SARS-CoV-2 (QIG55994.1). Observamos que a sequência da proteína S1-NGlic corresponde ao aminoácido 250-667aa, a sequência da proteína RBD-NGlic 319-591aa e a sequência da S-Glic 330-554aa (**Figura 20A**). A avaliação da pureza da proteína recombinante foi realizada através de um gel SDS-PAGE a 12%, evidenciado na **Figura 20B**.

A MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWF
HAIHVSGTNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLIVNNATNVIKVC
EQFCNDPFLGVYHKNKSWMESEFRVYSSANNCTFEYVSQPFMDLEGKQGNFKNLREFVFK
NIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTPGDSSSGWTAGA
AAYYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVR
FPNITNLCPPGEVFNATRFASVYAWNKRKISNCVADYSVLVNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCF
TNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNLDKVGNGYNYLYRLF
RKSNLKPFERDISTEYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLOSYGFOPTNGVGYQPYRVVLSFELLHA
PATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNENGLTGTGVLTESNKKFLPFQOQGRDIADTTDAVRDPQTL
LDITPCSFGGVSVITPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGC
LIGAEHVNNSECDIPIGAGICASYQTQTNPPRRARSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNNSIAIPT
NFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECNLLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVF
AQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTADAGFIKQYGDCLGDIAARDLI
CAQKFENGLTVLPLLTDEMIAQYTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNV
LYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILS
RLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGY
HLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHGDKAHFPREGVVFVSNGTHWFVTQRNFY
EPQIITTDNTFVSGNCDVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVV
NIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKWPWYIWLGLFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSC
KGCCSCGSCCKFDEDDSEPVLLKGVKLHYT

Figura 20A. Proteína rSARS-CoV-2 S: S1-NGlic, RBD-NGlic e S-Glic.

Sequência de aminoácidos da Proteína *Spike* de SARS-CoV-2: S1-NGlic (250-667aa) em **vermelho** > RBD-NGlic (319-591aa) **sublinhado** > S-Glic (330-554aa) em **negrito**.

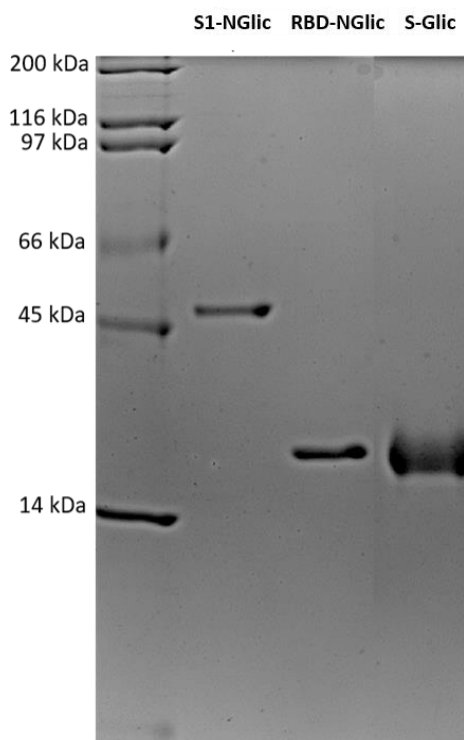
B

Figura 20B. Proteínas rSARS-CoV-2 S: S1-NGlic, RBD-NGlic e S-Glic. SDS-PAGE (12%) das proteínas recombinantes.

5.2.2. Proteína recombinante S-glicosilada (rSARS-CoV-2 S-Glic)

A proteína rSARS-CoV-2 S-Glic foi avaliada frente a um amplo painel de amostras de urina de indivíduos positivos e negativos para SARS-CoV-2 por RT-qPCR. Os resultados mostraram que 31 de 44 amostras de urina, coletadas de 19 pacientes qRT-PCR positivos, em diferentes dias do início dos sintomas, reagiram com a proteína rSARS-CoV-2 S-Glic, mostrando *index* positivo (valores >1,1), enquanto 6 amostras apresentaram valor de *index* indeterminado” (0,8 a 1,1) e 7 tiveram valor de *index* negativo (valores <0,8). Das 31 amostras de urina de controle negativo, apenas uma obteve *index* indeterminado e uma se mostrou positiva (Figura 21A).

Em paralelo, os resultados para soro mostraram que 30 de 44 amostras, coletadas de 19 pacientes qRT-PCR positivos, em diferentes dias do início dos sintomas, reagiram com a proteína rSARS-CoV-2 S-Glic, apresentando um valor *index* positivo (>1,1), enquanto uma das amostras apresentou valor de *index* indeterminado (0,8 a 1,1) e 13 tiveram valor *index* negativo (<0,8). Das 31 amostras

de soro de controles negativos, 2 obtiveram valores *index* indeterminados e 2 positivos (**Fig. 21A**).

O valor *index* (I) obtido pela razão $DO/cut-off$ foi utilizado para padronização e comparação dos resultados. Valores de sensibilidade e especificidade de 75,00% e 96,00%, respectivamente, foram obtidos para amostras de urina testadas em ELISA, bem como 68,18 e 93,55%, respectivamente, para amostras de soro. A comparação do desempenho diagnóstico de ELISA baseado em urina e soro, sob protocolos experimentais ideais para cada amostra biológica, é apresentada na **Tabela 5**. As curvas ROC foram construídas e mostraram que a ELISA utilizando urina apresentou uma acurácia (AUC 0,9450) ligeiramente superior quando comparada com o soro (AUC 0,8237) (**Fig. 21B e tabela 5**).

Os valores de VPP e VPN foram calculados com base no valor do *index*, que excluiu as amostras de valor indeterminado, e os resultados estão descritos na **tabela 6**.

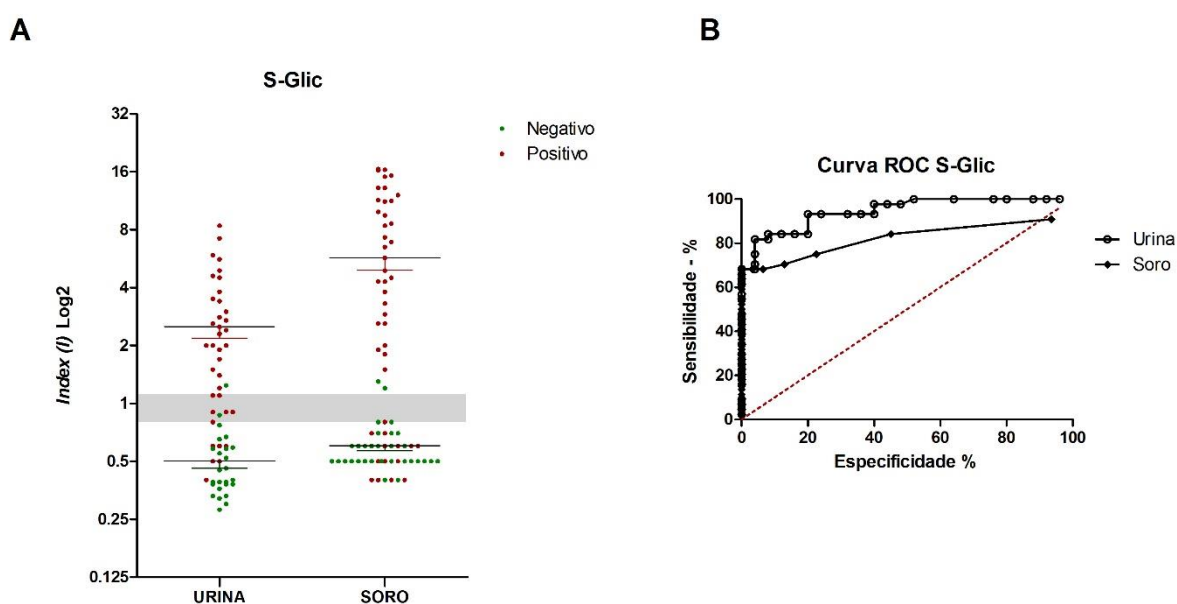


Figura 21. Avaliação da presença de anticorpos anti-rSARS-CoV-2 S-Glic em urina e soro pareadas.

A) Os ensaios foram realizados usando amostras positivas (n=44 urinas e n=44 soros) de pacientes qRT-PCR positivos e amostras negativas (n=31 urinas e n= 31 soros). A média de cada grupo é mostrada e a faixa cinza indica valores indeterminados para cada amostra, enquanto valores de *index* abaixo do intervalo (<0,8) são considerados negativos e valores acima (>1,1) positivos. **B)** Curvas ROC foram construídas utilizando o valor do *index* individual (I) para cada amostra, a fim de obter a sensibilidade, especificidade e área sob a curva.

Tabela 5. Resultados obtidos do teste diagnóstico de anticorpos IgG específicos para COVID-19 utilizando rSARS-CoV-2 S-Glic.

rSARS-CoV-2 Antígeno	Amostra	n	AUC	valor P	Cut-off	Se (%)	IC 95%	Esp (%)	IC 95%	J
S-Glic	URINA	+ 44 - 25	0,9450	< 0,0001	> 1,000	75,00	59,66% a 86,81%	96,00	79,65% a 99,90%	0,71
	SORO	+ 44 - 31	0,8237	< 0,0001	> 1,000	68,18	52,42% a 81,39%	93,55	78,58% a 99,21%	0,62

Foram utilizadas amostras de pacientes sintomáticos para COVID-19 e com RT-qPCR+ para SARS-CoV-2, bem como de indivíduos saudáveis pré-expostos ao vírus. O *index* individual (I) valores obtidos pela razão DO/ *cut-off* foram utilizados na construção das curvas ROC. O desempenho diagnóstico do antígeno em relação ao tipo de amostra utilizada foi baseado na avaliação da sensibilidade (IC 95%), especificidade (IC 95%), área sob a curva (AUC) e índice Youden (J). Legenda: J = (Se+Esp) –1; n = número de amostras; + = amostra positiva; - = amostra negativa.

Tabela 6. Valores preditivos positivos e preditivos negativos da proteína rSARS-CoV-2 S-Glic para amostras de urina e soro.

rSARS-CoV-2 (Antígeno)	Amostra	VPP	VPN	Indeterminado
S-Glic	URINA	0,969	0,767	7
	SORO	0,938	0,675	3

O VPP e o VPN foram calculados com base no valor do *index*, excluindo as amostras de valor indeterminado e utilizando a equação: VPN=verdadeiro negativo/falso negativo+verdadeiro negativo e VPP=verdadeiro positivo/falso positivo+verdadeiro positivo.

A comparação de perfis reativos de amostras de urina e soro contra a proteína rSARS-CoV-2 S-Glic está demonstrada de maneira estratificada de acordo com dias após o início dos sintomas, ≤ 7 dias, 8 a 21 dias e >21 dias. (**Figura 22**). Todas as amostras positivas utilizadas nas análises são pareadas e foram coletadas no mesmo dia. Até 7 dias do início dos sintomas, foi observada 1/6 amostra de urina com valor de *index* positivo ($>1,1$), enquanto para soro, nenhuma das 6 amostras apresentou valor de *index* positivo. No período de 8 a 21 dias, 31/38 amostras de urina tiveram *index* positivo e 30/38 amostras de soro tiveram valor de *index* positivo.

Após 21 dias do início dos sintomas, todas as 2 amostras de urina e soro apresentaram um valor de *index* positivo (**Figura 22**).

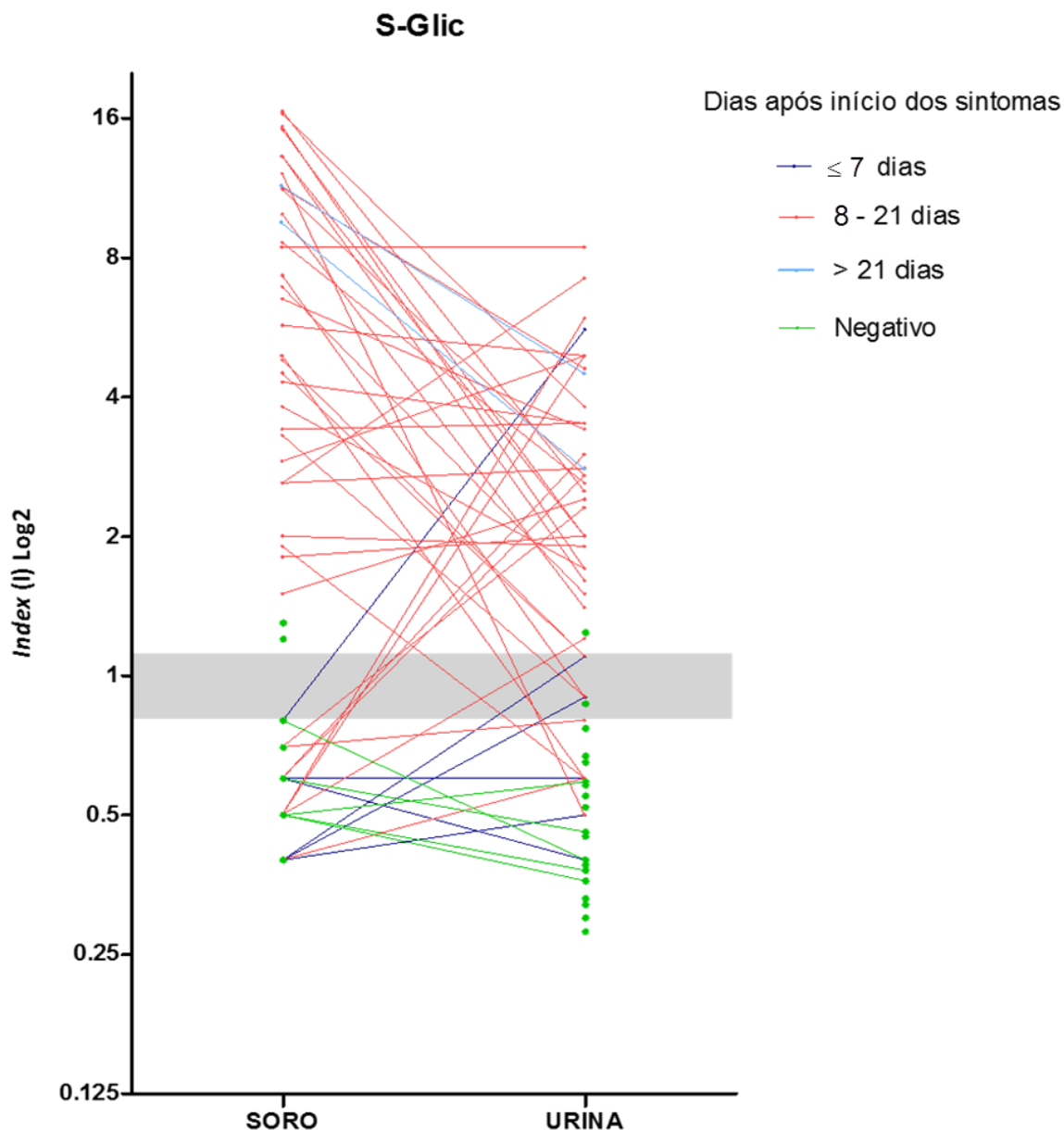


Figura 22. Avaliação comparativa dos valores de *index* (I) urinário e sérico de cada paciente de acordo com os dias após início dos sintomas usando a proteína rSARS-CoV-2 S-Glic.

Os valores de *index* obtidos das amostras de urina e soro de cada paciente são representados por círculos e quando pareados são interligados por linhas, sendo cada cor específica para o período de coleta após o início dos sintomas. Os dados individuais foram divididos de acordo com os dias após início dos sintomas: ≤ 7 dias, 8 a 21 dias e >21 dias.

5.2.3. Proteína recombinante não glicosilada - S1 (rSARS-CoV-2 S1-NGlic)

A proteína rSARS-CoV-2 S1-NGlic foi avaliada em um amplo painel de amostras de urina de indivíduos positivos e negativos para SARS-CoV-2 por RT-qPCR. Os resultados mostraram que 117 de 145 amostras de urina, coletadas de 109 pacientes qRT-PCR positivos, em diferentes dias de início dos sintomas, reagiram com a proteína rSARS-CoV-2 S1-NGlic, com um valor de *index* positivo > 1,1, enquanto 11 amostras apresentaram valor de *index* indeterminado (0,8 a 1,1) e 17 tiveram valor de *index* negativo (<0,8). Das 31 amostras de urina do controle negativo, apenas uma obteve valores de *index* indeterminados e um positivo (**Figura 23A**).

Paralelamente, os resultados mostraram que 83 de 145 amostras de soro, coletadas de 109 pacientes qRT-PCR positivos, em diferentes dias de início dos sintomas, reagiram com a proteína rSARS-CoV-2 S1-NGlic, apresentando um valor de *index* positivo ($I > 1,1$), enquanto 19 amostras apresentaram valor de *index* indeterminado (0,8 a 1,1) e 43 tiveram valor de *index* negativo (<0,8). Das 46 amostras de soro de controle negativo, 9 obtiveram valores de *index* indeterminados e um positivo (**Figura 23A**).

O valor *index* individual (*I*) obtido pela razão *DO/cut-off* foi utilizado para padronização e comparação dos resultados. Valores de sensibilidade e especificidade de 81,38 e 96,77%, respectivamente, foram calculados para amostras de urina testadas no ELISA, bem como 60,69 e 95,65%, respectivamente, para amostras de soro. O desempenho diagnóstico comparativo do ELISA baseado em urina e soro, sob protocolos experimentais ideais para cada amostra biológica, é apresentado na **Tabela 7**. As curvas ROC foram construídas indicando uma precisão marginalmente superior quando a urina foi testada ($AUC=0,9422$) em comparação com o soro ($AUC=0,8247$) (**Fig. 23B e tabela 7**).

Os valores de VPP e VPN foram calculados com base no valor *index*, excluindo as amostras de valor indeterminado, e os resultados estão descritos na **tabela 8**.

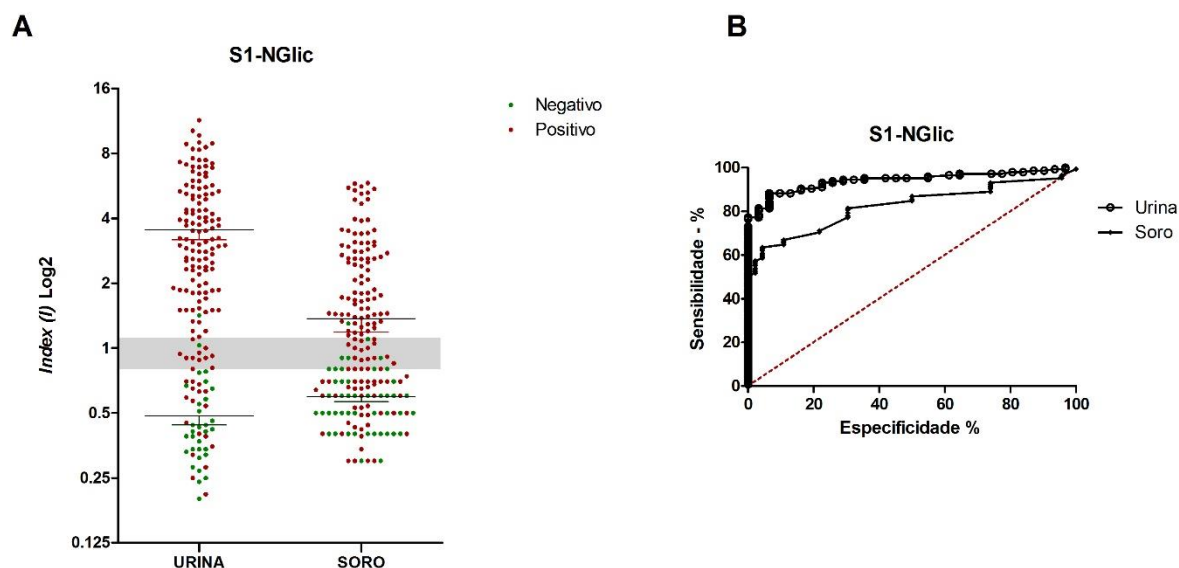


Figura 23. Avaliação da presença de anticorpos anti-rSARS-CoV-2 S1-NGlic em urina e soro pareadas.

A) Os ensaios foram realizados usando amostras positivas ($n = 145$ urinas e $n = 145$ soros) de pacientes qRT-PCR positivos e amostras negativas ($n = 31$ urinas e $n = 46$ soros). A média de cada grupo é mostrada e a faixa cinza indica valores indeterminados para cada amostra, enquanto valores de *index* abaixo do intervalo ($<0,8$) são considerados negativos e valores acima ($>1,1$) positivos. **B)** Curvas ROC foram construídas utilizando o valor do *index* individual (I) para cada amostra, a fim de obter a sensibilidade, especificidade e área sob a curva.

Tabela 7. Resultados obtidos do teste diagnóstico de anticorpos IgG específicos para COVID-19 utilizando rSARS-CoV-2 S1-NGlic.

rSARS-CoV-2 Antígeno	Amostra	n	AUC	valor P	Cut-off	Se (%)	IC 95%	Esp (%)	IC 95%	J
S1-NGlic	URINA	+ 145 - 30	0,9422	< 0,0001	> 1,065	81,38	74,08% a 87,36%	96,77	83,30% a 99,92%	0,78
	SORO	+ 145 - 46	0,8247	< 0,0001	> 1,020	60,69	52,24% a 68,69%	95,65	85,16% a 99,47%	0,56

Foram utilizadas amostras de pacientes sintomáticos para COVID-19 e com qRT-PCR+ para SARS-COV-2, bem como de indivíduos saudáveis pré-expostos ao vírus. O *index* individual (I) valores obtidos pela razão $DO / cut-off$ foram utilizados na construção das curvas ROC. O desempenho diagnóstico do antígeno em relação ao tipo de amostra utilizada foi baseado na avaliação da sensibilidade (IC 95%), especificidade (IC 95%), área sob a curva (AUC) e índice Youden (J).

Legenda: $J = (Se + Esp) - 1$; n = número de amostras; + = amostra positiva; - = amostra negativa.

Tabela 8. Valores preditivos positivos e preditivos negativos da proteína rSARS-CoV-2 S1-NGlic para amostras de urina e soro.

rSARS-CoV-2 (Antígeno)	Amostra	VPP	VPN	Indeterminado
S1-NGlic	URINA	0,992	0,630	12
	SORO	0,988	0,456	28

O VPP e o VPN foram calculados com base no valor do *index*, excluindo as amostras de valor indeterminado e utilizando a equação: $VPN = \frac{\text{verdadeiro negativo}}{\text{falso negativo} + \text{verdadeiro negativo}}$ e $VPP = \frac{\text{verdadeiro positivo}}{\text{falso positivo} + \text{verdadeiro positivo}}$.

A comparação de perfis reativos de amostras de urina e soro contra a proteína rSARS-CoV-2 S1-NGlic está demonstrada de maneira estratificada de acordo com dias após o início dos sintomas, ≤ 7 dias, 8 a 21 dias e >21 dias. (**Fig. 24**). Todas as amostras positivas são pareadas e foram coletadas no mesmo dia. Até 7 dias do início dos sintomas, 10/15 amostras de urina foram observadas com valor *index* positivo ($>1,1$), enquanto para soro, 4/15 amostras apresentaram valor *index* positivo. No período de 8 a 21 dias, 86/102 amostras de urina tiveram valor *index* positivo e 62 /102 amostras de soro tiveram valor *index* positivo. Após 21 dias do início dos sintomas, 22/26 urinas e 19/26 amostras de soro tiveram um valor *index* positivo (**Figura 24**).

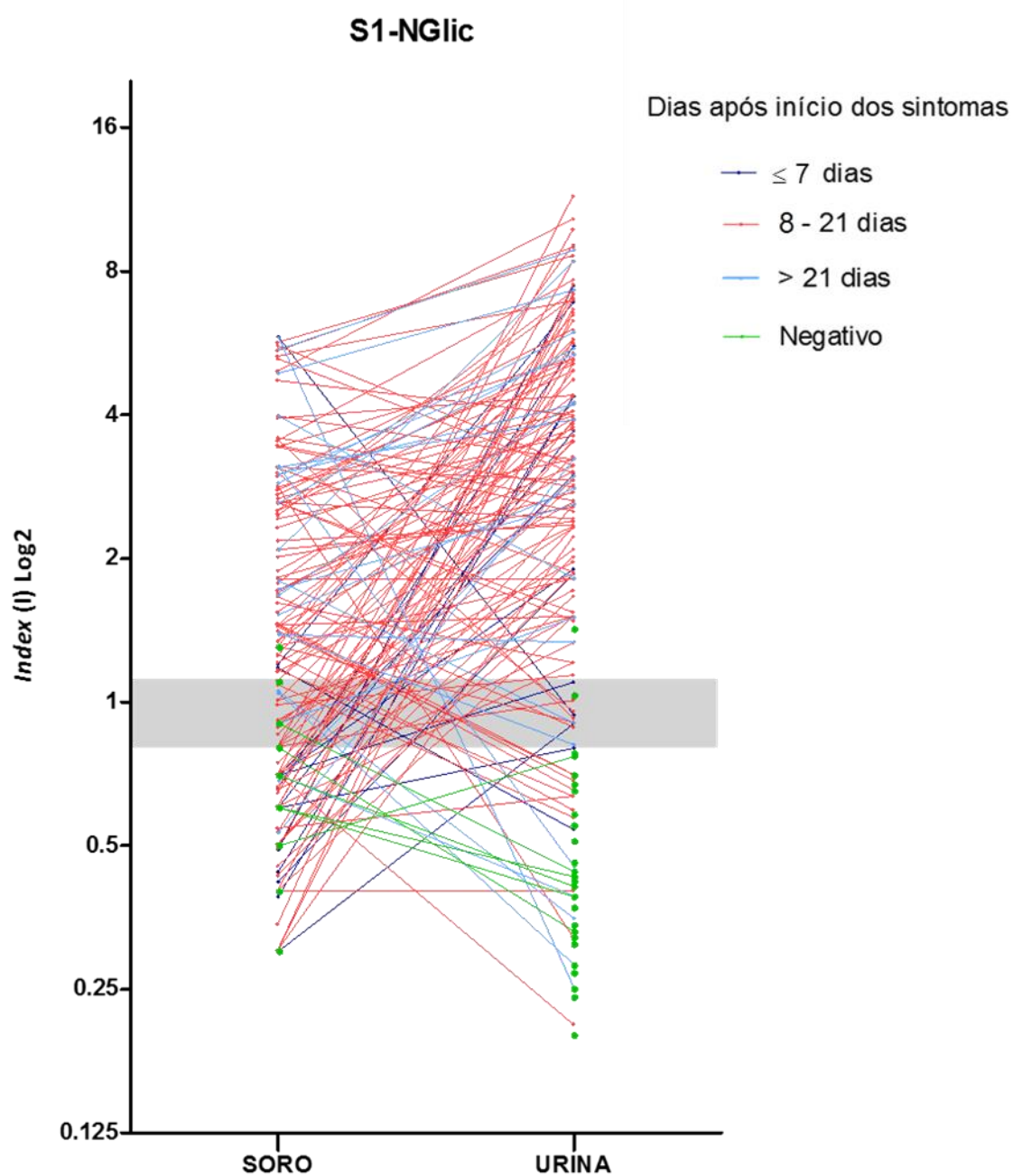


Figura 24. Avaliação comparativa dos valores de *index* (I) urinário e sérico de cada paciente de acordo com os dias após início dos sintomas usando a proteína rSARS-CoV-2 S1-NGlic.

Os valores de *index* obtidos das amostras de urina e soro de cada paciente são representados por círculos e quando pareados são interligados por linhas, sendo cada cor específica para o período de coleta após o início dos sintomas. Os dados individuais foram divididos de acordo com os dias após início dos sintomas da coleta data: ≤ 7 dias, 8 a 21 dias e >21 dias.

5.2.4. Proteína recombinante não glicosilada - RBD (rSARS-CoV-2 RBD-NGlic)

A proteína rSARS-CoV-2 RBD-NGlic A proteína foi avaliada contra um amplo painel de amostras de urina de indivíduos positivos e negativos. Os resultados mostraram que 130 de 145 amostras de urina, coletadas de 109 pacientes qRT-PCR positivos, em diferentes dias de início dos sintomas, reagiram com a proteína rSARS-CoV-2 RBD-NGlic, mostrando um valor de *index* positivo de $>1,1$, enquanto 9 amostras apresentaram valor de *index* indeterminado (0,8 a 1,1) e 6 tiveram valor de *index* negativo ($<0,8$). Dos 31 controles negativos, 3 amostras de urina obtiveram valor de *index* indeterminado e apenas um positivo (**Fig. 25A**).

Em paralelo, os resultados mostraram que 47 de 145 amostras de soro, coletadas de 109 pacientes qRT-PCR positivos, em diferentes dias de início dos sintomas, reagiram com a proteína rSARS-CoV-2 RBD-NGlic, apresentando valor de *index* positivo $>1,1$, sendo que 36 amostras apresentaram valor de *index* indeterminado (0,8 a 1,1) e 62 tiveram valor de *index* negativo ($<0,8$). Das 46 amostras de soro de controlo negativo, 10 obtiveram valor de *index* indeterminado e nenhum positivo (**Figura 25A**).

O valor *index* individual (I) obtido pela razão $DO/cut-off$ foi utilizado para padronização e comparação dos resultados. Valores de sensibilidade e especificidade de 89,66 e 96,77%, respectivamente, foram calculados para amostras de urina testadas em ELISA, bem como 39,31 e 97,83%, respectivamente, para amostras de soro. O desempenho diagnóstico comparativo de ELISA baseado em urina e soro para COVID-19, sob protocolos experimentais ideais para cada amostra biológica, está apresentado na **tabela 9**. As curvas ROC foram construídas e mostraram uma precisão marginalmente superior quando a urina foi testada ($AUC=0,9803$) em comparação com o soro ($AUC=0,7601$) (**Figura 25B e tabela 9**).

Os valores de VPP e VPN foram calculados com base no valor do *index*, que excluiu as amostras de valor indeterminado, e os resultados estão descritos na **tabela 10**.

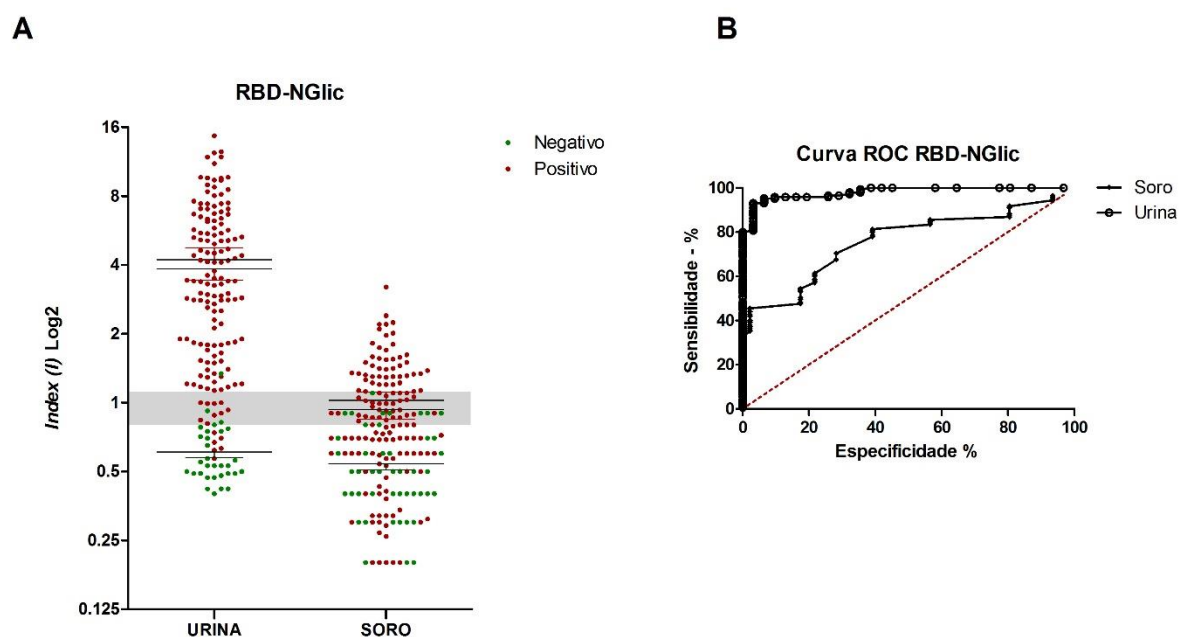


Figura 25. Avaliação da presença de anticorpos anti-rSARS-CoV-2 RBD-NGlic em urina e soro pareadas.

A) Os ensaios foram realizados usando amostras positivas (n=145 urinas e n=145 soros) de pacientes qRT-PCR positivos e amostras negativas (n=31 urinas e n= 46 soros). A média de cada grupo é mostrada e a faixa cinza indica valores indeterminados para cada amostra, enquanto valores de *index* abaixo do intervalo (<0,8) são considerados negativos e valores acima (>1,1) positivos. **B)** Curvas ROC foram construídas utilizando o valor do *index* individual (I) para cada amostra, a fim de obter a sensibilidade, especificidade e área sob a curva.

Tabela 9. Resultados obtidos do teste diagnóstico de anticorpos IgG específicos para COVID-19 utilizando rSARS-CoV-2 RBD-NGlic.

rSARS-CoV-2 Antígeno	Amostra	n	AUC	valor P	Cut-off	Se (%)	IC 95%	Esp (%)	IC 95%	J
RBD-NGlic	URINA	+ 145 - 30	0,9803	< 0,0001	> 1,065	89,66	83,51% a 94,09%	96,77	83,30% a 99,92%	0,86
	SORO	+ 145 - 46	0,7601	< 0,0001	> 1,010	39,31	31,31% a 47,76%	97,83	88,47% a 99,94%	0,37

Foram utilizadas amostras de pacientes sintomáticos para COVID-19 e com qRT-PCR+ para SARS-CoV-2, bem como de indivíduos saudáveis pré-expostos ao vírus. O *index* individual (I) valores obtidos pela razão $DO / cut-off$ foram utilizados na construção das curvas ROC. O desempenho diagnóstico do antígeno em relação ao tipo de amostra utilizada foi baseado na avaliação da sensibilidade (IC 95%), especificidade (IC 95%), área sob a curva (AUC) e índice Youden (J).

Legenda: $J = (Se + Esp) - 1$; n = número de amostras; + = amostra positiva; - = amostra negativa.

Tabela 10. Valores preditivos positivos e preditivos negativos da proteína rSARS-CoV-2 RBD-NGlic para amostras de urina e soro.

rSARS-CoV-2 (Antígeno)	Amostra	VPP	VPN	Indeterminado
RBD-NGlic	URINA	0,992	0,818	11
	SORO	1,000	0,367	46

O VPP e o VPN foram calculados com base no valor do *index*, excluindo as amostras de valor indeterminado e utilizando a equação: $VPN = \text{verdadeiro negativo} / \text{falso negativo} + \text{verdadeiro negativo}$ e $VPP = \text{verdadeiro positivo} / \text{falso positivo} + \text{verdadeiro positivo}$.

A comparação de perfis reativos de amostras de urina e soro contra a proteína rSARS-CoV-2 RBD-NGlic está demonstrada de maneira estratificada de acordo com dias após o início dos sintomas, ≤ 7 dias, 8 a 21 dias e >21 dias. (**Figura 26**). Todas as amostras positivas são pareadas e foram coletadas no mesmo dia. Até 7 dias do início dos sintomas, 12/15 amostras de urina foram observadas com valor *index* positivo ($>1,1$), enquanto para soro, nenhuma das 15 amostras apresentou valor *index* positivo. No período de 8 a 21 dias, 93/102 amostras de urina tiveram *index* positivo e 47/102 amostras de soro tiveram valor *index* positivo. Após 21 dias do início dos sintomas, 23/26 urinas e 10/26 amostras de soros tiveram um valor *index* positivo (**Figura 26**).

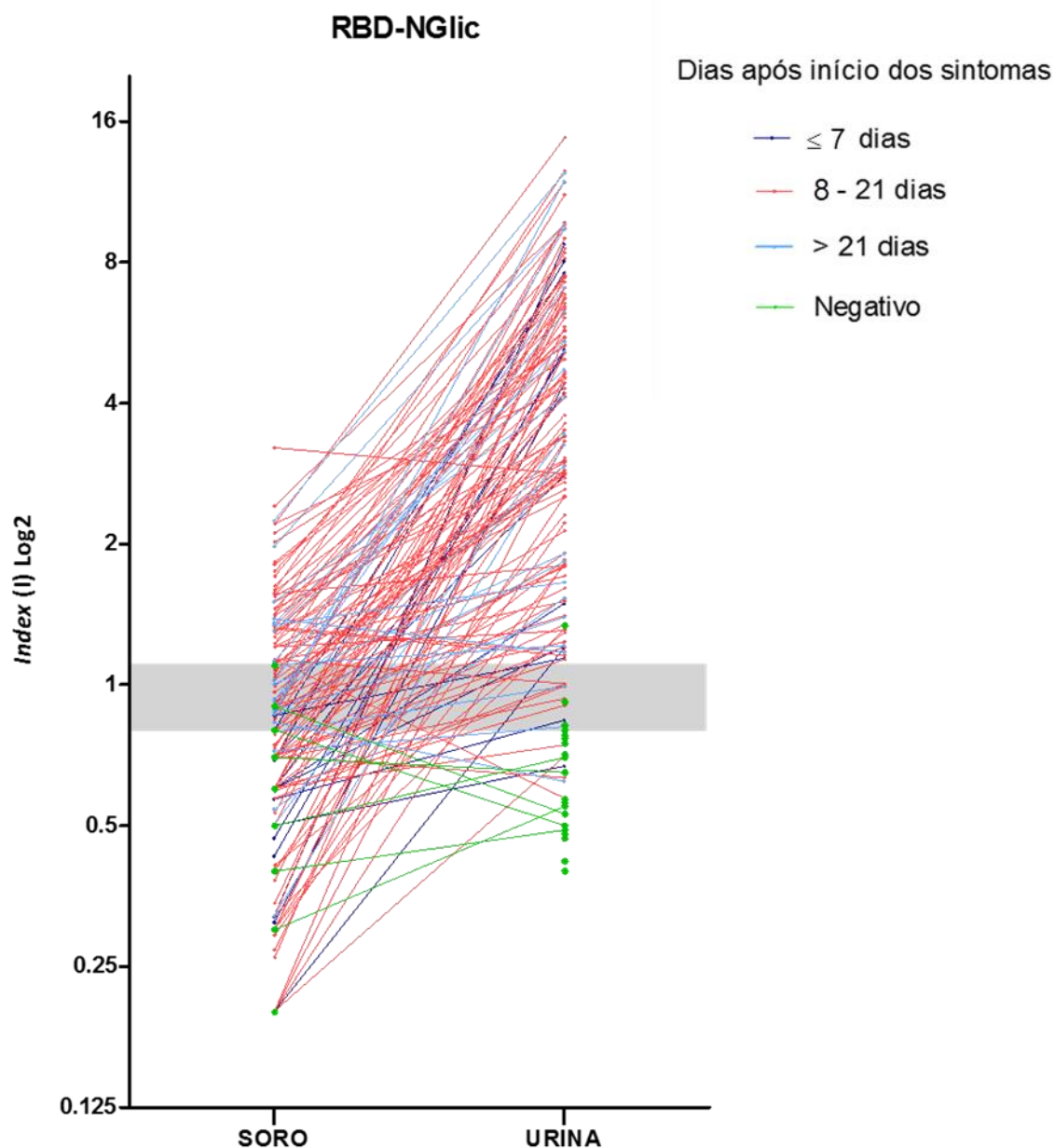


Figura 26. Avaliação comparativa dos valores de *index* (I) urinário e sérico de cada paciente de acordo com os dias após início dos sintomas usando a proteína rSARS-CoV-2 RBD-NGlic.

Os valores de *index* obtidos das amostras de urina e soro de cada paciente são representados por círculos e quando pareados são interligados por linhas, sendo cada cor específica para o período de coleta após o início dos sintomas. Os dados individuais foram divididos de acordo com os dias após o início dos sintomas: ≤ 7 dias, 8 a 21 dias e >21 dias.

5.2.5. Avaliação comparativa das proteínas recombinantes *Spike* glicosilada e não glicosilada

Realizou-se a comparação do desempenho diagnóstico para as três proteínas (rSARS-CoV-2 S-Glic, S1-NGlic, RBD-S1) frente a amostras pareadas de urina e soro comuns às três proteínas. Com isso, tornou-se possível uma melhor visualização da capacidade antigênica da proteína utilizada em relação a cada amostra, urina ou soro.

Foram utilizadas um total de 75 amostras de urina e soro pareadas na avaliação comparativa do desempenho diagnóstico, sendo 44 amostras de pacientes qRT-PCR positivos para SARS-CoV-2 (n=44) e 31 amostras de indivíduos negativos (n=31). A comparação foi realizada entre as proteínas não glicosiladas produzidas em laboratório (rSARS-CoV-2 RBD-NGlic e rSARS-CoV-2 S1-NGlic) com a comercial glicosiladas (rSARS-CoV-2 S-Glic) (**Figuras 27 e 28**).

Correlações mais altas foram observadas quando comparamos *index* da ELISA baseados em urina ($r=0,7567$ e $r=0,7779$, para rSARS-CoV-2 RBD-NGlic e rSARS-CoV-2 S1-NGlic, respectivamente) em comparação com o *index* da ELISA baseada em soro ($r=0,3562$ e $r=0,3981$) (**Figura 29**).

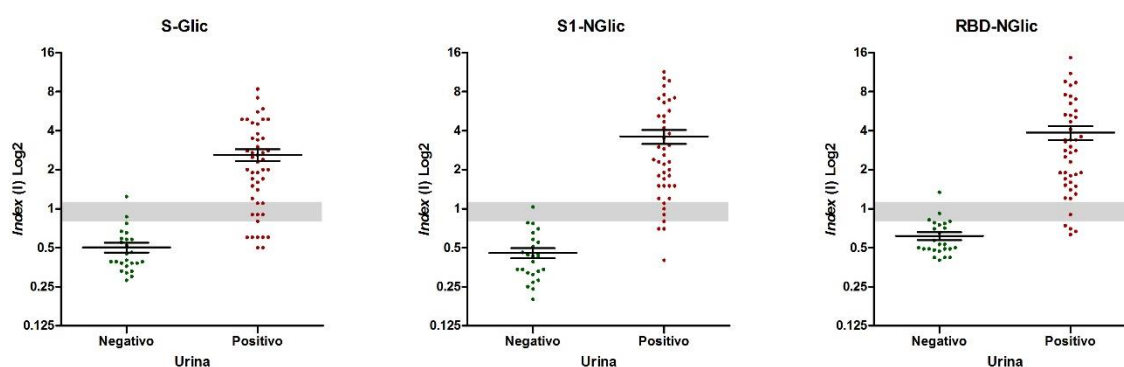


Figura 27. Avaliação da presença de anticorpos anti-rSARS-CoV-2 S (S-Glic, S1-NGlic e RBD-NGlic) na urina.

Amostras (n=75) foram coletadas de pacientes com COVID-19 (n=44) e de indivíduos saudáveis (n=31), e usadas para comparar as proteínas produzidas internamente (não glicosiladas) com a comercial (glicosilada).

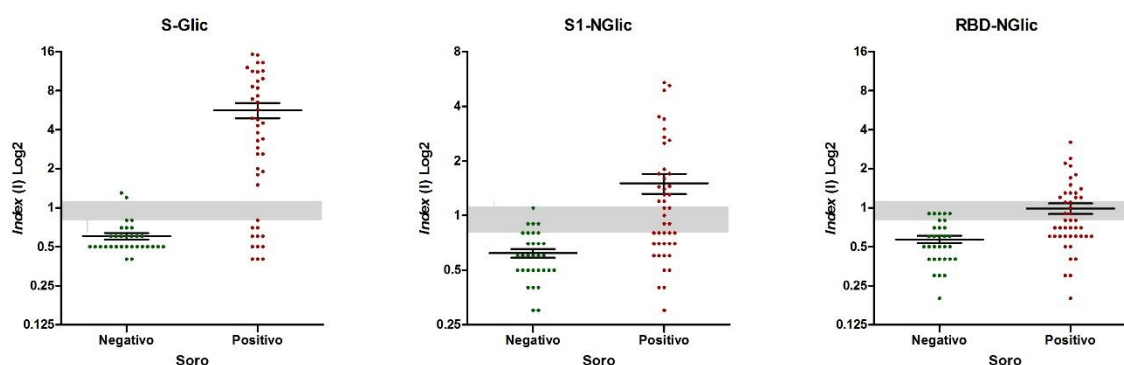


Figura 28. Avaliação da presença de anticorpos anti-rSARS-CoV-2 S (S-Glic, S1-NGlic e RBD-NGlic) no soro.

Amostras (n=75) foram coletadas de pacientes com COVID-19 (n=44) e de indivíduos saudáveis (n=31), e usadas para comparar as proteínas produzidas internamente (não glicosiladas) com a comercial (glicosilada).

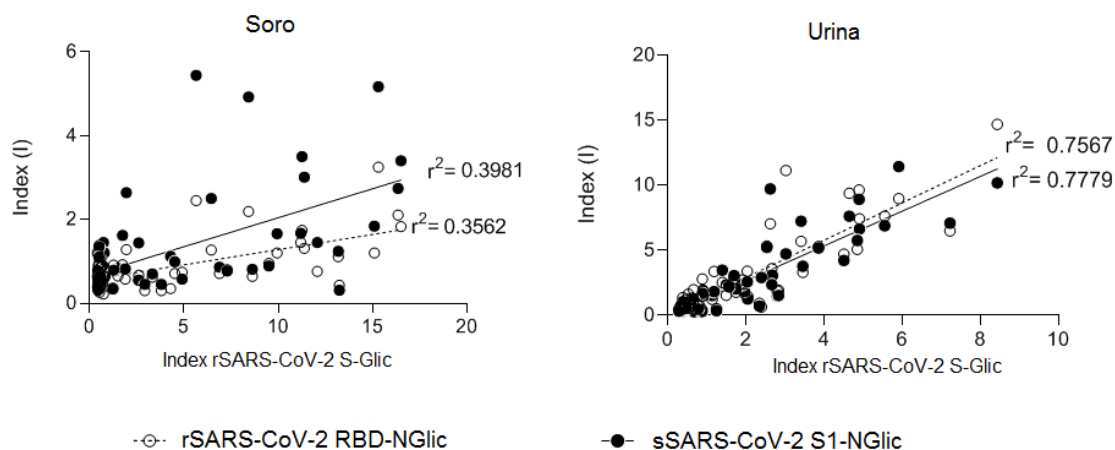


Figura 29. Correlação entre rSARS-CoV-2 RBD-NGlic (branco) e rSARS-CoV-2 S1-NGlic (preto) versus rSARS-CoV-2 S-Glic usando amostras de soro e urina.

Amostras (n=75) foram coletadas de pacientes com COVID-19 (n=44) e de indivíduos saudáveis (n=31), e usadas para comparar as proteínas produzidas internamente (não glicosiladas) com a comercial (glicosilada).

A conversão imunológica foi possível de visualizar em amostras de dois pacientes utilizando as três proteínas recombinantes *Spike* (**Figuras 30 A e B**), variando o dia após o início dos sintomas.

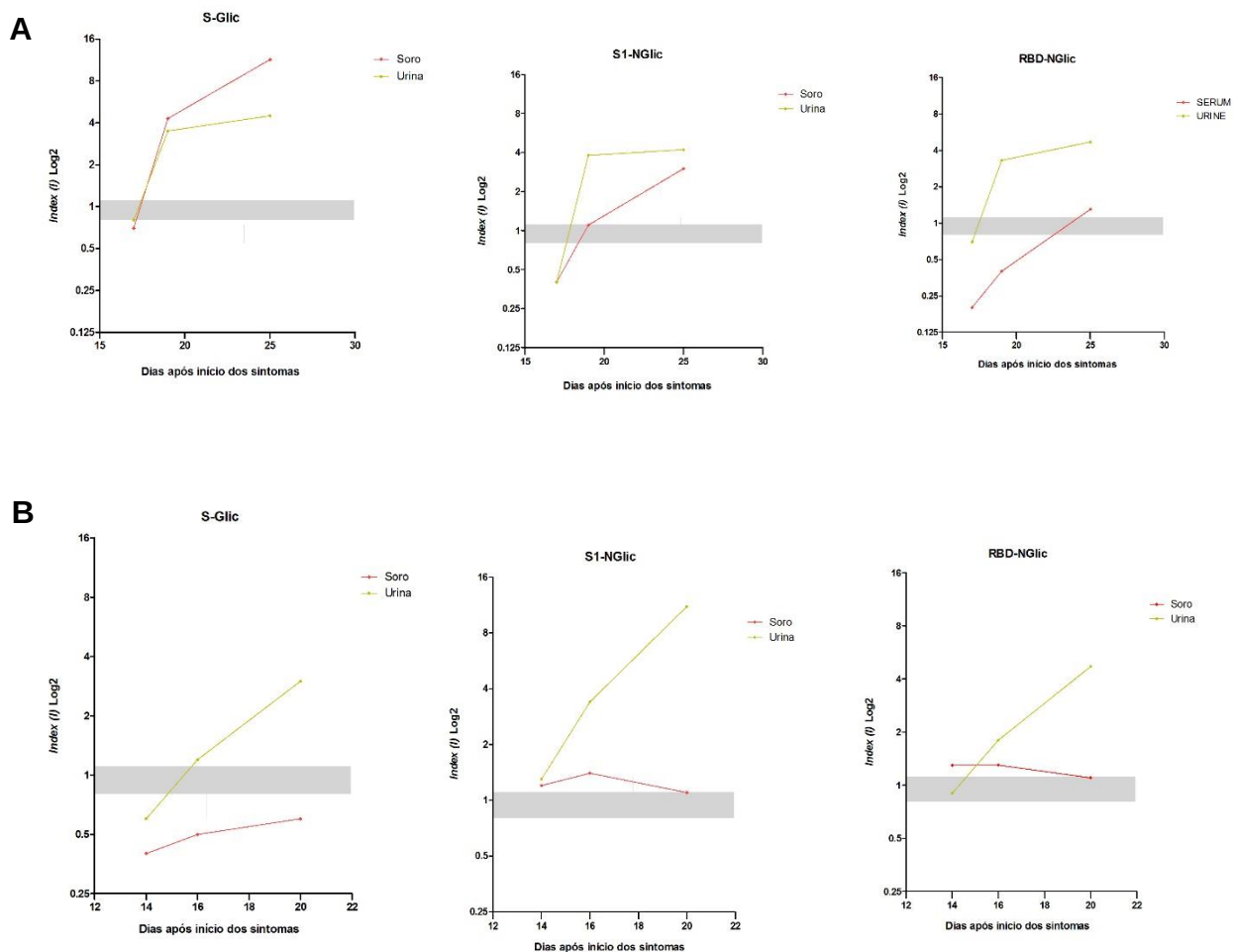


Figura 30. Avaliação comparativa das proteínas S recombinantes frente amostras de urina e soro de pacientes com coletas sucessivas após início dos sintomas.

Os valores de *index* obtidos das amostras de urina e soro de cada paciente (A e B) são representados por círculos, plotados de acordo com o dia após início dos sintomas e interligados por linhas, sendo cada cor específica para o tipo de amostra, urina (amarelo) e soro (vermelho).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Testes de ELISA baseados em soro têm sido usados para diagnosticar a infecção pelo SARS-CoV-2 por meio da detecção de anticorpos específicos contra o vírus (AMANAT *et al.*, 2020, BAGNO *et al.*, 2021). No entanto, dados apresentados neste trabalho mostram pela primeira vez um teste *in house* de ELISA baseado em urina para identificar anticorpos específicos contra proteínas do vírus SARS-CoV-2. O uso da urina para detectar anticorpos pode ser considerado mais conveniente para a prática clínica e para a vigilância epidemiológica em comparação com os desafios encontrados com a punção venosa, já que permite que os pacientes colem suas próprias amostras e elimina os riscos inerentes envolvidos no manuseio de sangue e a necessidade de flebotomistas treinados para a coleta da amostra (EAMUDOMKARN *et al.*, 2018).

O vírus SARS-CoV-2 possui quatro proteínas estruturais – proteínas *Spike* (S), envelope (E), membrana (M) e Nucleocapsídeo (N) – e todas elas já foram testadas como antígenos para o imunodiagnóstico de COVID-19, usando proteínas recombinantes, peptídeos sintéticos e/ou quimeras polipeptídicas (WEISSLEDER *et al.*, 2020; FDA, 2022; SCUSSEL *et al.*, 2022). A seleção, a fonte e a pureza do antígeno são aspectos cruciais no desenvolvimento de um imunoensaio, pois determinam a eficiência do teste, seu campo de aplicação e a taxa de produção em massa (KLAUSBERGER *et al.*, 2021).

Neste trabalho, foi avaliado o emprego de amostras de urina na discriminação de pacientes com qRT-PCR positivos para SARS-CoV-2, a partir da plataforma de ELISA indireto *in house* utilizando-se proteínas recombinantes de SARS-CoV-2 do Nucleocapsídeo (N) e da *Spike* (S). A utilização das proteínas recombinantes de SARS-CoV-2 N e S confirmaram a capacidade de proteínas recombinantes (r) de SARS-CoV-2 em discriminar pacientes COVID-19 comprovadamente positivos utilizando a urina como amostra biológica.

Para a proteína recombinante do Nucleocapsídeo (N) de SARS-CoV-2, foram obtidos valores de sensibilidade e especificidade de 94,0 e 100%, respectivamente, quando a urina foi utilizada, e a presença de anticorpos na urina dos pacientes foi observada alguns dias após o início dos sintomas. O uso de urina apresentou maior sensibilidade para detectar imunoconversão em relação ao uso de soro

(sensibilidade e especificidade de 87,7 e 100%, respectivamente) em condições experimentais otimizadas para cada tipo de amostra.

Para a proteína recombinante *Spike* (S) de SARS-CoV-2 foram obtidos valores de sensibilidade (75,00%, 81,38% e 89,66%) e especificidade (96,00%, 96,77% e 96,77%) para S-Glic, S1-NGlic e RBD-NGlic respectivamente, para ELISA à base de urina. Comparativamente, foram encontrados valores de sensibilidade (68,18%, 60,69% e 39,31%) e especificidade (93,55%, 95,65% e 97,83%) para S-Glic, S1-NGlic e RBD-NGlic respectivamente, em amostras de soro pareadas.

A proteína rSARS-CoV-2 S-Glic foi expressa em sistema eucariótico, enquanto rSARS-CoV-2 S1-NGlic e RBD-NGlic foram expressas no sistema procariótico, evidenciando que a proteína rSARS-CoV-2 S expressa em sistema procarioto apresenta melhor índice de sensibilidade quando aplicado ELISA baseado em urina, quando comparado à utilização do soro. Além disso, quando comparamos as proteínas não glicosiladas com a rSARS-CoV-2 S-Glic, maiores correlações foram observadas no ELISA de urina. Ainda, essa avaliação com a proteína S permitiu verificar a aplicação da urina em ELISA utilizando proteínas recombinantes expressas em sistema procarioto, obtendo valores de sensibilidade e especificidade significativos, comparativamente ao soro, que não apresenta boa eficiência.

A associação de ELISA usando urina em reação contra as proteínas *Spike* (S1-NGlic e RBD-NGlic) expressas em sistema procariótico permitiu uma triagem da população avaliada quanto à presença de anticorpos anti-SARS-CoV-2 *Spike*, superando as dificuldades decorrentes da coleta de amostras e da expressão eucariótica. A proteína *Spike* de SARS-CoV-2 é uma glicoproteína de superfície transmembrana, extensivamente glicosilada com glicanos derivados do hospedeiro em 22 sítios de glicosilação ligados à proteína N e pelo menos dois sítios de O-glicano. O vírus adquire glicosilação apropriando-se da maquinaria de glicosilação nos compartimentos intermediários retículo-Golgi da célula hospedeira quando as partículas virais descendentes são formadas (WATANABE *et al.*, 2020).

A produção de proteínas recombinantes pode ser realizada através de sistemas de expressão procarióticos e eucarióticos, sendo o sistema procariótico vantajoso no que diz respeito a sua capacidade produtiva, mas a falta de modificação pós-traducional pode se tornar uma limitação (KLAUSBERGER *et al.*, 2021). Não há atualmente teste sorológico disponível ou estudo publicado sobre a

detecção de anticorpos anti-rSARS-CoV-2 S expressa em sistemas procarióticos, provavelmente devido à influência da modificação pós-traducional no desempenho do diagnóstico. Assim, a proteína rSARS-CoV-2 *Spike* utilizada nos diagnósticos sorológicos atuais são expressas usando sistema eucariótico, que muitas vezes retêm modificações pós-traducionais de glicano do antígeno, ao contrário de ELISAs baseados em proteínas recombinantes bacterianas ou peptídeos (LIU, Z.-L. *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020).

Até o momento, a glicosilação da proteína S parecia ser essencial para testes sorológicos e, desde o início, existem estudos significativos dedicados ao desenvolvimento de construções de proteína SARS-CoV-2 S que permitem maior produção e estabilidade proteica. Diferentes sistemas de expressão mostraram impactar na glicosilação da proteína SARS-CoV-2 *Spike* e no tipo de glicanos incorporados (WANG *et al.*, 2021), além do rendimento de produção e até mesmo na variação entre lotes (KLAUSBERGER *et al.*, 2021; REIS; TAUBER; BLANCHARD, 2021).

As proteínas recombinantes, particularmente S1, são um dos principais reagentes usados para produzir imunoenaios para detectar IgG, IgM ou IgA de SARS-CoV-2, no entanto, é difícil expressar a proteína S1 na conformação correta e, em alguns casos, os anticorpos que reconhecem a proteína S de membrana são incapazes de se ligar à proteína S recombinante (WAN *et al.*, 2020). Além disso, a complexidade na produção e a capacidade limitada para produzir proteína glicosilada S1 recombinante de alta qualidade podem prejudicar a acessibilidade ao imunoenensaio em regiões pobres ou remotas ao redor do mundo (WANG; *et al.*, 2021).

Porém, essa dificuldade pode ser sido solucionada ao se modificar o tipo de amostra empregada na metodologia, como foi possível visualizar nos resultados deste trabalho quando a urina é a amostra teste utilizada na detecção de anticorpos anti-rSARS-CoV-2 S expressa em sistemas procarióticos, bem como em sistemas eucarióticos. A associação do uso de ELISA à base de urina e proteínas *Spike* (S1 e RBD) expressas em um sistema procariótico permitiria uma estratégia conveniente para triagem da população quanto à presença de anticorpos da proteína *Spike*, superando as dificuldades e custos decorrentes da coleta da amostra e da produção de proteína (EAMUDOMKARN *et al.*, 2018).

Essa aplicabilidade estimula novos estudos a avaliarem o uso da urina no ELISA para outras doenças que têm seu diagnóstico sorológico realizado apenas pelo uso de antígenos glicosilados. Especialmente para doenças negligenciadas em que não é possível um estudo completo para melhorar o desempenho da produção. Observou-se para *Strongyloides stercoralis* uma diminuição significativa na DO obtida em imunoenaios quando as moléculas de carboidratos foram rompidas. Esses achados sugerem uma redução da reatividade imune específica quando os epítomos glicosilados são removidos dos antígenos do parasito, como demonstrado em imunoenaios com soros de pacientes infectados por *Hemonchus contortus*, *Taenia solium*, *Leishmania sp.* e *S. stercoralis* (INÊS *et al.*, 2013).

Embora os achados do trabalho sugiram a aplicabilidade do uso de proteínas rSARS-CoV-2 S não glicosiladas em ensaios de ELISA usando amostras de urina, não foi encontrado na literatura nenhuma evidência biológica/imunológica que explique porque esse reconhecimento de proteínas não glicosiladas é melhor quando se usa urina em vez de amostras de soro, e estudos futuros devem ser realizados para responder a essa pergunta.

As amostras de urina foram coletadas de pacientes qRT-PCR positivos, porém algumas não apresentaram valores de *index* positivos podendo ter sido coletadas próximo do início dos sintomas e antes da ocorrência da imun conversão. Confirmou-se isso a partir de uma análise longitudinal das amostras, coletadas dos mesmos pacientes em dias diferentes após início dos sintomas, que se tornaram reagentes imunologicamente ao longo do curso da doença para ambas as proteínas recombinantes N e S, evidenciando uma conversão imune para urina e soro a uma taxa semelhante, com aumento da produção de IgG ao longo dos dias. Esses achados corroboram a estudos que evidenciam a ocorrência da soroconversão para IgG específica anti-SARS-CoV-2 geralmente ocorrendo entre 7 a 14 dias após a infecção (WEISSLEDER *et al.*, 2020).

O tempo de soroconversão de anticorpos totais e IgM e IgG apareceu consecutivamente ($p < 0,05$), sendo a média de dia de soroconversão de 11, 12 e 14, respectivamente (ZHAO *et al.*, 2020). Nos estágios iniciais da infecção, os testes comerciais de anticorpos baseados em soro mostram baixa sensibilidade, já que a maior parte da resposta imune do paciente ainda está em desenvolvimento. A eficiência dos testes sorológicos pode ser próxima de 100%, quando as amostras

são adquiridas após 20 dias do início dos sintomas (CDC, 2020b; HUANG *et al.*, 2020; WEISSLEDER *et al.*, 2020), e apresentam taxa cumulativa de 50% de soropositividade no 11º dia e 100% no 39º dia, de acordo com Zhao e colaboradores (2020).

Paralelamente, os valores de *index* positivo para ELISA foram obtidos para muitas amostras coletadas antes de 10 dias após início dos sintomas, pelo menos para os indivíduos hospitalizados. No entanto, não podemos supor que a detecção precoce esteja ligada à gravidade da doença ou a uma anterior infecção por SARS-CoV-2, pois tais informações são escassas. Assim como relatado por outros estudos que não encontraram evidências da associação entre gravidade da doença e títulos de anticorpos (ADAMS *et al.*, 2020; CHRISTENSEN; AZAR; TURBETT, 2022). Por outro lado, poucas amostras apresentaram valor negativo de *index* mesmo após 10 dias do início dos sintomas.

A urina é negligenciada para uso como amostra biológica, já que testes imunológicos baseados em sua utilização são escassos. No presente estudo, foram incluídas 19 amostras de urina coletadas antes do surto em 2019, e todas elas apresentaram valores de *index* <1,1. Também foram incluídas 11 amostras de urina coletadas durante 2021 de indivíduos que permaneceram em quarentena e que não apresentaram nenhum sintoma ao longo de 2020/2021, embora não possam ser consideradas como verdadeiro negativas. Ressaltando que todas essas amostras apresentaram *index* <1,1 (não positivo).

Não obstante, neste estudo foram utilizadas amostras com até 60 dias após início dos sintomas, com a identificação de anticorpos, mas um estudo de acompanhamento mais longo ainda é necessário para estabelecer a janela de detecção diagnóstica de anticorpos anti-SARS-CoV-2 em amostras de urina. A identificação de anticorpos na urina anti-vírus da hepatite A pode durar até 130 dias após início dos sintomas, sendo compatível para diagnóstico de infecção recente ou passada (JOSHI *et al.*, 2002).

Somado a isso, é importante saber que o período de detecção de anticorpos baseado em ELISA pode ser distinto para urina e soro. Essa diferença é encontrada para a leishmaniose visceral (LV), em que a detecção de anticorpos específicos no soro persiste após a cura, enquanto a presença de anticorpos desaparece completamente após 6 meses quando se utiliza um ELISA de urina. Essa

observação indica uma possível utilização para o diagnóstico específico da LV e também para o monitoramento da resposta ao tratamento (EJAZI *et al.*, 2016).

Bagno e colaboradores (2021) evidenciaram a especificidade das proteínas utilizadas no ensaio de ELISA para anticorpos específicos anti-SARS-CoV-2, pois não se observou reatividade humoral em amostras de soro de pacientes com infecções virais do trato respiratório (influenza, sarampo e parvovirose), pacientes com arboviroses (vírus da febre amarela, chikungunya, dengue e Zika vírus) e indivíduos vacinados contra influenza (30 a 60 dias). Porém, não foi testado em amostras obtidas de pacientes com infecções respiratórias causadas por outros tipos de coronavírus.

Todavia, a ausência de reatividade cruzada de anticorpos anti-SARS-CoV-2 RBD entre os vírus SARS-CoV e MERS-CoV foi relatada na literatura, sugerindo que as regiões RBDs são imunogênicas de formas distintas, com respostas específicas à espécie viral identificadas nos pacientes (JU *et al.*, 2020). Além disso, estudos anteriores demonstraram que há diminuição do nível de anticorpos específicos anti-SARS-CoV (vírus que não circula mais desde 2004), se tornando indetectável após 6 anos em 91% das amostras de soro em pacientes recuperados da doença (TANG *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2020). Esses fatores são importantes para evidenciar a confiabilidade das amostras utilizadas no estudo, uma vez que o vírus SARS-CoV não circula na população humana desde 2004 (AHMED; QUADEER; MCKAY, 2020) e amostras negativas pré-COVID utilizadas no presente projeto data de período posterior a 2016 e anterior a 2019, apesar de não ter sido testadas amostras de urina provenientes de pacientes com outras infecções.

Paralelamente, o uso comparativo de amostras séricas pareadas como referência foi fundamental para o estudo devido ao seu uso convencional em ELISA, lembrando que a plataforma de ELISA baseada em soro já havia sido validada anteriormente (BAGNO *et al.*, 2021).

O ELISA baseado em urina e baseado em soro alcançou um perfil qualitativo muito semelhante para as diferentes proteínas, N e S, exceto para as proteínas S expressas em sistema procarioto, como relatado acima. No entanto, a comparação quantitativa da intensidade da reação entre as amostras deve ser avaliada com cuidado, pois as amostras de urina foram coletadas sem um tempo fixo de retenção, podendo gerar variação na concentração de anticorpos. Um estudo futuro seria

importante para determinar e fixar o tempo de retenção, bem como para seu uso na prática clínica.

Um estudo de avaliação do emprego da urina na filariose mostrou que coletas de urina no início da manhã ou ao fim do dia apresentaram apenas uma pequena flutuação nas unidades de anticorpos e todas as amostras permaneceram positivas (ITOH *et al.*, 2001; NAGAOKA *et al.*, 2021). Outro estudo com uso de ELISA baseado em urina realizado para *Helicobacter pylori*, evidenciou que o teor de água na urina influenciou na concentração de anticorpos na urina, porém o desempenho do ensaio qualitativo na urina pós-jejum correlacionou-se bem com as amostras de soro (ALEMOHAMMAD; FOLEY; COHEN, 1993; NAGAOKA *et al.*, 2021).

Várias características da urina, além do tempo de retenção, podem gerar influências na força do sinal em relação ao soro e merece investigação futura, como hidratação, comorbidades, proteinúria significativa ou uso concomitante de medicamentos.

Mudanças no pH da urina e a presença de microrganismos não tiveram efeito significativo no valor de absorbância em ELISA para *H. pylori*. Além disso, a azida sódica é comumente adicionada para evitar alterações no pH da urina resultantes da contaminação e crescimento de bactérias (ALEMOHAMMAD; FOLEY; COHEN, 1993). No presente estudo, azida sódica (NaN_3) foi utilizada nas amostras de urina como conservante, pois a presença de anticorpos detectáveis em amostras de urina armazenadas a 4°C foi relatada por até 6 anos (EJAZI *et al.*, 2016). No entanto, a estabilidade de cinco amostras de urina refrigeradas sem conservante foi examinada por cinco dias consecutivos, e os dados mostraram que não houve alteração no desempenho do ensaio entre amostras frescas ou armazenadas.

Em suma, a combinação de testes diretos e indiretos aumenta significativamente as chances de se detectar pacientes com SARS-CoV-2, em convalescença, ou imunizados por vacinas com diferentes tecnologias de desenvolvimento, como a aplicação da proteína N no diagnóstico de SARS-CoV-2 em pessoas imunizadas somente com vacinas que codificam IgG anti-proteína S. Isso sugere que os testes imunológicos possam contribuir para a confirmação e acompanhamento da doença em seus aspectos agudos ou pós-infecção (COVID-longa) (ZHAO *et al.*, 2020; MATTA *et al.*, 2022).

E diante de todos os dados apresentados, a urina se apresenta como uma fonte biológica importante de biomarcadores sorológicos para diversas doenças, permitindo sua descoberta, visto que é uma amostra que reflete o estado metabólico e fisiopatológico do corpo em um determinado momento (ZHAO *et al.*, 2017).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso trabalho de avaliação do uso da urina como amostra para teste diagnóstico de anticorpos específicos contra SARS-CoV-2 ampliou o conhecimento a respeito da utilização da urina como espécime de avaliação imunológica, assim como influenciou no entendimento imunofisiológico sobre a presença de anticorpos na urina, remetendo ao proteoma urinário, que pode ser surpreendentemente complexo e útil na descoberta de futuros biomarcadores.

Nosso estudo foi de caráter básico e exploratório, com o objetivo de identificar a presença de anticorpos específicos para as proteínas recombinantes N e S em pacientes RT-qPCR positivos para SARS-CoV-2 usando a urina como amostra biológica.

Os resultados apresentados mostraram que os testes de diagnóstico utilizando a urina apresentaram eficiência semelhante quando comparados ao uso do soro como amostra biológica, evidenciando que a urina pode ser empregada no diagnóstico da infecção pelo SARS-CoV-2 baseado na detecção de anticorpos. Além disso, a urina também permitiu a avaliação da evolução imunológica de IgG de amostras individuais em diferentes pontos de coleta.

Entretanto, embora tenhamos comprovado a aplicabilidade do uso de proteínas SARS-CoV-2 S não glicosiladas em ELISA usando amostras de urina, não há evidências na literatura que explique biológica/imunologicamente porque esse reconhecimento de proteínas não glicosiladas é melhor quando se utiliza a urina em detrimento das amostras de soro.

Por fim, além da prova de conceito, fomos capazes de realizar uma validação clínica da plataforma de ELISA baseada no uso de urina, visto que avaliamos mais de 200 amostras previamente caracterizadas. Prototipagem e regulamentação da ANVISA se tornam os próximos passos para que o teste aqui proposto possa gerar uma inovação em benefício da sociedade.

Esses achados são de extrema importância, uma vez que evidenciam a necessidade de mais estudos a respeito desse espécime biológico, sua composição, além da imunopatologia da doença, somados à análise de amostras de pacientes vacinados.

CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

O estudo evidenciou o uso da urina como potencial amostra biológica para detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 em plataformas de ELISA contra diferentes proteínas do vírus. Como vantagens inerentes à amostra de urina, têm-se a facilidade na coleta, baixo custo, estabilidade biológica e altos níveis de precisão. O ensaio à base de urina para detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 se mostrou um método não invasivo e que poderia ser implementado para relatar a extensão da exposição no nível populacional e/ou avaliar o risco de infecção ao nível individual.

PERSPECTIVAS

9. PERSPECTIVAS

Pretende-se dar continuidade no projeto com a realização de:

- Ensaios com amostras de indivíduos vacinados para análise de desempenho das proteínas na avaliação diagnóstica da imunoconversão de imunoglobulinas anti-SARS-CoV-2;
- Propor um protótipo de teste imunocromatográfico sensível e específico para SARS-CoV-2, empregando amostras de urina dos pacientes;
- Avaliar as amostras de urina frente a proteínas de variantes do vírus SARS-CoV-2;
- Propor o uso da estratégia empregada neste trabalho para outras doenças infecto-contagiosas.

REFERÊNCIAS

10. REFERÊNCIAS

ABEIJON, C. *et al.* Urine-based antigen detection assay for diagnosis of visceral leishmaniasis using monoclonal antibodies specific for six protein biomarkers of *Leishmania infantum* / *Leishmania donovani*. PLoS neglected tropical diseases, v. 14, n. 4, p. e0008246, 23 abr. 2020.

ADAMS, E. R. *et al.* Antibody testing for COVID-19: A report from the National COVID Scientific Advisory Panel. Wellcome Open Research, v. 5, p. 139, 11 jun. 2020.

AHMED, S. F.; QUADEER, A. A.; MCKAY, M. R. Preliminary Identification of Potential Vaccine Targets for the COVID-19 Coronavirus (SARS-CoV-2) Based on SARS-CoV Immunological Studies. Viruses, v. 12, n. 3, 25 fev. 2020.

AINSWORTH, M. *et al.* Performance characteristics of five immunoassays for SARS-CoV-2: a head-to-head benchmark comparison. The Lancet Infectious Diseases, v. 20, n. 12, p. 1390–1400, dez. 2020.

ALEEM, A.; SAMAD, A. B. A.; SLENKER, A. K. Emerging Variants of SARS-CoV-2 And Novel Therapeutics Against Coronavirus (COVID-19) - PubMed. 1 jan. 2022.

ALEMOHAMMAD, M. M.; FOLEY, T. J.; COHEN, H. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Helicobacter pylori* in urine by an enzyme immunoassay method. Journal of Clinical Microbiology, v. 31, n. 8, p. 2174–2177, ago. 1993.

ALENE, M. *et al.* Magnitude of asymptomatic COVID-19 cases throughout the course of infection: A systematic review and meta-analysis. PLOS ONE, v. 16, n. 3, 23 mar. 2021.

ALVES, P. A. *et al.* Optimization and clinical validation of colorimetric reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, a fast, highly sensitive and specific COVID-19 molecular diagnostic tool that is robust to detect SARS-CoV-2 variants of concern. Frontiers in microbiology, v. 12, 2021.

AMANAT, F. *et al.* A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. Nature Medicine, v. 26, n. 7, p. 1033–1036, 12 maio 2020.

ANKA, A. U. *et al.* Coronavirus disease 2019 (COVID-19): An overview of the immunopathology, serological diagnosis and management. Scandinavian Journal of Immunology, v. 93, n. 4, 3 dez. 2020.

ANVISA, 2022. Produtos para diagnóstico in vitro de COVID-19 regularizados - Informações Técnicas. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/saude/q/?nomeTecnico=coronav%C3%ADrus>>. Acesso em: 11 jul. 2022.

ASFARAM, S. *et al.* Is urine a reliable clinical sample for the diagnosis of human visceral leishmaniasis? A systematic review and meta-analysis - PubMed. Parasitology international, v. 67, n. 5, 1 out. 2018.

BAGNO, F. F. *et al.* Development and validation of an Enzyme-Linked Immunoassay kit for diagnosis and surveillance of COVID-19. [S.l.]: Cold Spring Harbor Laboratory, 29 jun. 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/2021.06.23.21259392>>.

BAGNO, F. F. *et al.* Previous Infection with SARS-CoV-2 Correlates with Increased Protective Humoral Responses after a Single Dose of an Inactivated COVID-19 Vaccine. Viruses, v. 14, n. 3, p. 510, 2022.

BEAVIS, Kathleen G. *et al.* Evaluation of the EUROIMMUN Anti-SARS-CoV-2 ELISA Assay for detection of IgA and IgG antibodies. Journal of Clinical Virology, v. 129, p. 104468, 2020.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022. Vacinas. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/vacinas>>. Acesso em: 12 jul. 2022.

BURDON, D. W. Immunoglobulins of normal human urine and urethral secretions. Immunology, v. 21, n. 2, p. 363–8, ago. 1971.

CDC. 2019 Novel Coronavirus. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/index.html>>. Acesso em: 11 jul. 2022.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. First travel-related case of 2019 novel coronavirus detected in United States. US Department of Health & Human Services. 2020 Jan 19. Acesso em: 11 jul. 2022.

CDC. Labs. 2022. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antibody-tests-guidelines.html#anchor_1590280385631>. Acesso em: 15 jul. 2022.

CERRADA-ROMERO *et al.* Excretion and viability of SARS-CoV-2 in feces and its association with the clinical outcome of COVID-19. Scientific Reports, v. 12, n. 1, p. 1–5, 5 maio 2022.

CHRISTENSEN, Bianca B.; AZAR, Marwan M.; TURBETT, Sarah E. Laboratory Diagnosis for SARS-CoV-2 Infection. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 36, n. 2, 1 jun. 2022.

Coronavirus disease (COVID-19) – World Health Organization (WHO), 2022. Disponível em: <<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>>. Acesso em: 12 jul. 2022.

CSG. Coronaviridae Study Group of The International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature microbiology*, v. 5, n. 4, p. 536–544, abr. 2020. Acesso em: 11 jul. 2022.

CUI, J.; LI, F.; SHI, Z.-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, v. 17, n. 3, p. 181–192, 10 dez. 2018.

DAVID, P. *et al.* The PD-1/PD-L1 Pathway Affects the Expansion and Function of Cytotoxic CD8⁺ T Cells During an Acute Retroviral Infection. *Frontiers in Immunology*, v. 10, 1 jan. 2019.

DE VEERDONK, VAN *et al.* A guide to immunotherapy for COVID-19. *Nature Medicine*, v. 28, n. 1, p. 39–50, 21 jan. 2022.

DIPIAZZA, A. T.; GRAHAM, B. S.; RUCKWARDT, T. J. T cell immunity to SARS-CoV-2 following natural infection and vaccination. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 538, 29 jan. 2021.

DOS SANTOS, W. G. Natural history of COVID-19 and current knowledge on treatment therapeutic options. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 129, p. 110493, set. 2020.

EAMUDOMKARN, C. *et al.* Diagnostic performance of urinary IgG antibody detection: A novel approach for population screening of strongyloidiasis. *PloS one*, v. 13, n. 7, p. e0192598, 9 jul. 2018.

EJAZI, S. A. *et al.* Noninvasive Diagnosis of Visceral Leishmaniasis: Development and Evaluation of Two Urine-Based Immunoassays for Detection of *Leishmania donovani* Infection in India. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 10, 1 out. 2016.

FDA SAFETY COMMUNICATION; MEDICAL DEVICES. Antibody Testing Is Not Currently Recommended to Assess Immunity After COVID-19 Vaccination: FDA Safety Communication. Disponível em: <<https://www.fda.gov/medical-devices/safety->

communications/antibody-testing-not-currently-recommended-assess-immunity-after-COVID-19-vaccination-fda-safety>. Acesso em: 2 jul. 2022.

FDA. EUA Authorized Serology Test Performance. Disponível em: <<https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-COVID-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/eua-authorized-serology-test-performance>>. Acesso em: 26 jun. 2022.

FDA; U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2022. In Vitro Diagnostics EUAs. Disponível em: <<https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-COVID-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/in-vitro-diagnostics-euas>>. Acesso em: 12 jul. 2022.

FEHR, A. R.; PERLMAN, S. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. *Coronaviruses*. New York, NY: Springer New York, 2015. p. 1–23. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1>.

FIOLET, T. *et al.* Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: a narrative review. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 28, n. 2, p. 202–221, fev. 2022.

Folha informativa sobre COVID-19 - OPAS/OMS, 2022. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/COVID19>>. Acesso em: 1 jun. 2022.

Food and Drug Administration, Antibody testing is not currently recommended to assess immunity after COVID-19 vaccination: FDA safety communication (2021); www.fda.gov/medical-devices/safety-communications/antibody-testing-not-currently-recommended-assess-immunity-after-COVID-19-vaccination-fda-safety. Acesso em: 11 jul. 2022.

GAO *et al.* Identification and functional analysis of the SARS-COV-2 nucleocapsid protein. *BMC Microbiology*, v. 21, n. 1, p. 1–10, 22 fev. 2021.

GONG, Fanwu *et al.* Evaluation and Comparison of Serological Methods for COVID-19 Diagnosis. *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 0, 1 jan. 2021.

GONG, Y.; LI, Q.; YUAN, Y. Accuracy of testing for anti-Helicobacter pylori IgG in urine for H. pylori infection diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*, v. 7, n. 4, 1 jan. 2017.

GUPTA *et al.* Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nature Medicine*, v. 26, n. 7, p. 1017–1032, 10 jul. 2020.

HAAS, E. J. *et al.* Impact and effectiveness of mRNA BNT162b2 vaccine against SARS-CoV-2 infections and COVID-19 cases, hospitalizations, and deaths following a nationwide vaccination campaign in Israel: an observational study using national surveillance data. *Lancet* (London, England), v. 397, n. 10287, 15 maio 2021.

HARPOLE, M.; DAVIS, J.; ESPINA, V. Current state of the art for enhancing urine biomarker discovery. *Expert review of proteomics*, v. 13, n. 6, 1 jun. 2016.

HU *et al.* Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, v. 19, n. 3, p. 141–154, 6 out. 2020.

HUANG *et al.* A systematic review of antibody mediated immunity to coronaviruses: kinetics, correlates of protection, and association with severity. *Nature Communications*, v. 11, n. 1, p. 1–16, 17 set. 2020.

INÊS, E. DE J. *et al.* The role of glycosylated epitopes in the serodiagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 76, n. 1, p. 31–35, maio 2013.

International Anesthesia Research Society. Disponível em: <https://journals.lww.com/aacr/Abstract/2020/04000/Coronavirus_Disease_2019__In_Home_Isolation_Room.28.aspx>. Acesso em: 11 jul. 2022.

ITOH, M *et al.* Sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection in urine samples. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 65, n. 4, p. 362–365, 1 out. 2001.

ITOH, MAKOTO *et al.* Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay with urine samples: a tool for surveillance of schistosomiasis japonica - PubMed. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, v. 34, n. 3, 1 set. 2003.

JACKSON, C. B. *et al.* Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, v. 23, n. 1, 1 jan. 2022.

JAMISON *et al.* A comprehensive SARS-CoV-2 and COVID-19 review, Part 1: Intracellular overdrive for SARS-CoV-2 infection. *European Journal of Human Genetics*, p. 1–10, 16 maio 2022.

JIA, L. *et al.* An Attempt to Understand Kidney's Protein Handling Function by Comparing Plasma and Urine Proteomes. *PLoS ONE*, v. 4, n. 4, 1 jan. 2009.

JOSHI, M. S. *et al.* Evaluation of Urine as a Clinical Specimen for Diagnosis of Hepatitis A. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 9, n. 4, 1 jul. 2002.

JU, B. *et al.* Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection - PubMed. *Nature*, v. 584, n. 7819, 1 ago. 2020.

KASHIR, J.; YAQINUDDIN, A. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-19. *Medical Hypotheses*, v. 141, p. 109786, ago. 2020.

KATSURAGI, K. *et al.* Highly Sensitive Urine-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Antibody to *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, v. 3, n. 4, p. 289–295, dez. 1998.

KHAZAAL, S. *et al.* The Pathophysiology of Long COVID throughout the Renin-Angiotensin System. *Molecules*, v. 27, n. 9, 1 maio 2022.

KLAUSBERGER, M. *et al.* A comprehensive antigen production and characterization study for easy-to-implement, specific and quantitative SARS-CoV-2 serotests. *EBioMedicine*, v. 67, p. 103348, maio 2021.

KWOK, Hang Fai. The significance of advanced COVID-19 diagnostic testing in pandemic control measures. *International Journal of Biological Sciences*, v. 18, n. 12, 1 jan. 2022.

LEE, C. Y.-P. *Et al.* Serological Approaches for COVID-19: Epidemiologic Perspective on Surveillance and Control. *Frontiers in Immunology*, v. 0, 1 jan. 2020.

LI, D.; LI, J. Immunologic Testing for SARS-CoV-2 Infection from the Antigen Perspective. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 59, n. 5, 20 abr. 2021.

LI, Xinwei *et al.* The utility of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein in laboratory diagnosis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, v. 36, n. 7, 3 jun. 2022.

LI, Y. *et al.* Systematic evaluation of IgG responses to SARS-CoV-2 *Spike* protein-derived peptides for monitoring COVID-19 patients. *Cellular and Molecular Immunology*, v. 18, n. 3, 1 mar. 2021.

LIU, A. *et al.* Antibody responses against SARS-CoV-2 in COVID-19 patients. *Journal of Medical Virology*, v. 93, n. 1, 1 jan. 2021.

LIU, Y. *et al.* Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 20, n. 6, p. 656–657, 1 jun. 2020.

LIU, Z.-L. *Et al.* Antibody Profiles in Mild and Severe Cases of COVID-19. *Clinical Chemistry*, v. 66, n. 8, p. 1102–1104, 10 jun. 2020.

LONG *et al.* Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nature Medicine*, v. 26, n. 8, p. 1200–1204, 18 jun. 2020.

LOPEZ-LEON *et al.* More than 50 long-term effects of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 1–12, 9 ago. 2021.

LYTRAS, S. *et al.* The animal origin of SARS-CoV-2. *Science*, v. 373, n. 6558, p. 968-970, 2021.

MALIK, Y. A. Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2 - PubMed. *The Malaysian journal of pathology*, v. 42, n. 1, 1 abr. 2020.

MATTA, J. *et al.* Association of Self-reported COVID-19 Infection and SARS-CoV-2 Serology Test Results With Persistent Physical Symptoms Among French Adults During the COVID-19 Pandemic. *JAMA Internal Medicine*, v. 182, n. 1, p. 19, 1 jan. 2022.

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

MURALIDAR, S. *et al.* The emergence of COVID-19 as a global pandemic: Understanding the epidemiology, immune response and potential therapeutic targets of SARS-CoV-2. *Biochimie*, v. 179, p. 85–100, dez. 2020.

NAGAOKA, F. *et al.* Detection of Urinary Antibodies and Its Application in Epidemiological Studies for Parasitic Diseases. *Vaccines*, v. 9, n. 7, p. 778, 12 jul. 2021.

NALBANDIAN *et al.* Post-acute COVID-19 syndrome. *Nature medicine*, v. 27, n. 4, p. 601–615, 22 mar. 2021.

NI, L. *et al.* Detection of SARS-CoV-2-Specific Humoral and Cellular Immunity in COVID-19 Convalescent Individuals. *Immunity*, v. 52, n. 6, 16 jun. 2020.

NIH GUIDELINES, 2022. What's New. Disponível em: <<https://www.COVID19treatmentguidelines.nih.gov/about-the-guidelines/whats-new/>> Acesso em: 13 jul. 2022.

NIH. National Institutes of Health. 2022. Disponível em: <<https://COVID19.nih.gov/COVID-19-topics/COVID-19-treatments>>. Acesso em: 13 jul. 2022.

NKAM, E. T. *et al.* Implication of serum Nitric oxide and IgE in urinary schistosomiasis: The case of Bamendjing, Cameroon. *Acta tropica*, v. 232, p. 106504, maio 2022.

NUCCETELLI, M. *et al.* Combined anti-SARS-CoV-2 IgA, IgG, and IgM Detection as a Better Strategy to Prevent Second Infection Spreading Waves. *Immunological Investigations*, v. 51, n. 2, p. 233–245, 18 set. 2020.

OKBA, Nisreen MA *et al.* SARS-CoV-2 specific antibody responses in COVID-19 patients. *MedRxiv*, p. 2020.03. 18.20038059, 2020.

PELUSO, M. J. *et al.* SARS-CoV-2 antibody magnitude and detectability are driven by disease severity, timing, and assay. *Science Advances*, v. 7, n. 31, 30 jul. 2021.

PREPAREDNESS, Emergencies. Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection. World Health Organization, 6 out. 2021. Disponível em: <<http://www.who.int/publications/i/item/antigen-detection-in-the-diagnosis-of-sars-cov-2infection-using-rapid-immunoassays>>.

PU, R. *et al.* The screening value of RT-LAMP and RT-PCR in the diagnosis of COVID-19: systematic review and meta-analysis. *Journal of Virological Methods*, v. 300, p. 114392, fev. 2022.

REIS, C. A.; TAUBER, R.; BLANCHARD, V. Glycosylation is a key in SARS-CoV-2 infection. *Journal of Molecular Medicine*, v. 99, n. 8, p. 1023–1031, 22 maio 2021.

Respiratory Virus Infections: Understanding COVID-19. *Immunity*, v. 52, n. 6, p. 905–909, [S.d.]. Acesso em: 29 jun. 2022.

RIDGE, S. E.; VIZARD, A. L. Determination of the optimal cutoff value for a serological assay: an example using the Johne's Absorbed EIA. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, n. 5, p. 1256–1261, maio 1993.

ROSANO GL, CECCARELLI EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol.* 2014;5:172. Published 2014 Apr 17.

SCIENCE. Disponível em: <<https://www.science.org/content/blog-post/COVID-visual-library>>. Acesso em: 29 jun. 2022.

SCUSSEL, R. *et al.* Peptide-Integrated Superparamagnetic Nanoparticles for the Identification of Epitopes from SARS-CoV-2 *Spike* and Nucleocapsid Proteins. *ACS applied nano materials*, v. 5, n. 1, p. 642–653, 28 jan. 2022.

SHI *et al.* COVID-19 infection: the perspectives on immune responses. *Cell Death & Differentiation*, v. 27, n. 5, p. 1451–1454, 23 mar. 2020.

SUBBARAO, K.; MAHANTY, S. Respiratory Virus Infections: Understanding COVID-19. *Immunity*, v. 52, n. 6, p. 905–909, jun. 2020.

TANG, Fang *et al.* Lack of peripheral memory B cell responses in recovered patients with severe acute respiratory syndrome: a six-year follow-up study - PubMed. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, v. 186, n. 12, 15 jun. 2011.

TENFORDE, M. W. Symptom Duration and Risk Factors for Delayed Return to Usual. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 69, 30 jul. 2020.

ULLAH, H. *et al.* Novel coronavirus 2019 (COVID-19) pandemic outbreak: A comprehensive review of the current literature. *Vacunas*, v. 22, n. 2, 1 ago. 2021.

V'KOVSKI, P. *et al.* Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews. Microbiology*, v. 19, n. 3, 1 jan. 2021.

VABRET, N. *et al.* Immunology of COVID-19: Current State of the Science. *Immunity*, v. 52, n. 6, 16 jun. 2020.

VÁZQUEZ, S. *et al.* Kinetics of antibodies in sera, saliva, and urine samples from adult patients with primary or secondary dengue 3 virus infections - PubMed. *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*, v. 11, n. 3, 1 maio 2007.

VIANA, K. *et al.* Infection in asymptomatic carriers of SARS-CoV-2 can interfere with the achievement of robust immunity on a population scale. *The Journal of General Virology*, v. 102, n. 11, 1 jan. 2021.

VITIELLO, A. *et al.* COVID-19 vaccines and decreased transmission of SARS-CoV-2. *Inflammopharmacology*, v. 29, n. 5, 1 jan. 2021.

WALKER, G. J. *et al.* Serological Detection of SARS-CoV-2 IgG Using Commercially Available Enzyme Immunoassays on Dried Blood Spots Collected from Patients. *Microbiology Spectrum*, v. 9, n. 3, 1 dez. 2021.

WAN, J. *et al.* Human-IgG-Neutralizing Monoclonal Antibodies Block the SARS-CoV-2 Infection. *Cell reports*, v. 32, n. 3, p. 107918, 21 jul. 2020.

WANG, Mei-Yue et al. SARS-CoV-2: structure, biology, and structure-based therapeutics development. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 10, p. 587269, 2020.

WANG, Y. et al. Impact of Expressing Cells on Glycosylation and Glycan of the SARS-CoV-2 *Spike* Glycoprotein. *ACS Omega*, v. 6, n. 24, p. 15988–15999, 11 jun. 2021a.

WANG, Zijun et al. Enhanced SARS-CoV-2 neutralization by dimeric IgA. *Science translational medicine*, v. 13, n. 577, p. eabf1555, 2021b.

WATANABE, Y. et al. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 *Spike*. *Science*, v. 369, n. 6501, p. 330–333, 17 jul. 2020.

WATSON, O. J. et al. Global impact of the first year of COVID-19 vaccination: a mathematical modelling study. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 0, n. 0, 23 jun. 2022.

WEISSLEDER, R. et al. COVID-19 diagnostics in context. *Science Translational Medicine*, v. 12, n. 546, 3 jun. 2020.

WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Disponível em: <<https://COVID19.who.int/>>. Acesso em: 20 jul. 2022.

WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Disponível em: <<https://COVID19.who.int/>>. Acesso em: 26 jun. 2022.

WHO Guidelines on Drawing Blood: Best Practices in Phlebotomy - PubMed. 1 jan. 2010. Acesso em: 15 jul. 2022.

World Health Organization (WHO) Coronavirus disease (COVID-2019) situation reports. Available at: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports/> Acesso em: 15 jul. 2022.

World Health Organization (WHO), Novel Coronavirus (2019-nCoV) Situation report-100, July, 13, 2022. Accessed in July 20, 2022. Available at: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-report>

World Health Organization (WHO), Novel Coronavirus (2019-nCoV) Situation report-6, 26 January 2020. Accessed in July 06, 2022 Available at: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200126-sitrep-6-2019--ncov.pdf> s/

WU, J. et al. Detection and analysis of nucleic acid in various biological samples of COVID-19 patients. *Travel Medicine and Infectious Disease*, v. 37, 1 out. 2020.

XU *et al.* Characteristics of pediatric SARS-CoV-2 infection and potential evidence for persistent fecal viral shedding. *Nature Medicine*, v. 26, n. 4, p. 502–505, 13 mar. 2020.

YANG, Y.; YANG, M.; *et al.* Laboratory Diagnosis and Monitoring the Viral Shedding of SARS-CoV-2 Infection. *The Innovation*, v. 1, n. 3, p. 100061, nov. 2020.

YANG; LIU; *et al.* COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 5, n. 1, p. 1–8, 25 jul. 2020.

YANG; WANG. COVID-19: a new challenge for human beings. *Cellular & Molecular Immunology*, v. 17, n. 5, p. 555–557, 31 mar. 2020.

YOSHIMOTO, F. K. The Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS CoV-2 or n-COV19), the Cause of COVID-19. *The protein journal*, v. 39, n. 3, p. 198–216, jun. 2020.

YU, Y. *et al.* Comprehensive Metaproteomic Analyses of Urine in the Presence and Absence of Neutrophil-Associated Inflammation in the Urinary Tract. *Theranostics*, v. 7, n. 2, p. 238–252, 2017.

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

ZHANG *et al.* Development and evaluation of a serological test for diagnosis of COVID-19 with selected recombinant *Spike* proteins. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 40, n. 5, p. 921–928, 12 nov. 2020.

ZHAO *et al.* Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients with Novel Coronavirus Disease 2019. *Clinical Infectious Diseases*, v. 71, n. 16, p. 2027–2034, 28 maio 2020.

ZHAO, M. *et al.* A comprehensive analysis and annotation of human normal urinary proteome. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, 8 jun. 2017.

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

ZHOU; YANG; *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, v. 579, n. 7798, p. 270–273, 3 fev. 2020.

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.

ANEXOS

11. ANEXOS

11.1. ANEXO 1. Comitê de Ética

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Características clínicas, de imagem pulmonar e laboratoriais de pacientes com infecção por SARS-CoV-2 admitidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

Pesquisador: Vandack Alencar Nobre Jr

Área Temática: A critério do CEP

Versão: 7

CAAE: 30437020.9.0000.5149

Instituição Proponente: PRO REITORIA DE PESQUISA

Patrocinador Principal: Hospital das Clínicas - Universidade Federal de Minas Gerais

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.828.788

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_1580819_E2.pdf, de 27/06/2021) e/ou do Projeto Detalhado (Projeto_pesquisa_emergencial_COVID_300320_VERSAO_APROVADA_CONEP_HMCC__sem_marcacoes_junho_21.docx).

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.828.788

Recomendações:

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

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram identificados óbices éticos nesta emenda.

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 da emenda proposta ao projeto de pesquisa.

Situação: Emenda aprovada.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1580819_E2.pdf	27/06/2021 10:53:18		Aceito
Outros	Projeto_pesquisa_emergencial_COVID_300320_VERSAO_APROVADA_CONEP_HMCC_com_marcacoes_junho_21.docx	27/06/2021 10:51:04	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
Outros	Projeto_pesquisa_emergencial_COVID_300320_VERSAO_APROVADA_CONEP_HMCC_sem_marcacoes_junho_21.docx	27/06/2021 10:50:34	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
Outros	Resposta_analise_documental_junho_2021.pdf	27/06/2021 10:50:08	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CONEP_4085678_E1.pdf	29/05/2021 15:11:59	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CONEP_4082383_E1.pdf	29/05/2021 15:09:55	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
Outros	Aprovacao_Departamento_Clinica_Medicina_FM_UFMG.pdf	29/05/2021 15:06:54	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
Outros	Aprovacao_GEP_HC_UFMG.pdf	29/05/2021 15:06:31	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CONEP_3974420_APROVADO.pdf	29/05/2021 15:06:09	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.828.788

Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CONEP_3965370_PENDENTE.pdf	29/05/2021 15:05:58	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
Outros	Anuencia_HSH_Projeto_Covid.pdf	29/05/2021 15:03:53	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Resposta_parecer_4645345.pdf	29/05/2021 15:03:39	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TERMO_BIORREPOSITORIO_PROJETO_COVID.pdf	29/05/2021 15:03:10	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_modificado_com_marcas_responsavel_emenda_3.pdf	22/03/2021 18:22:12	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_modificado_sem_marcas_responsavel_emenda_3.pdf	22/03/2021 18:21:59	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_modificado_com_marcas_participante_emenda_3.pdf	22/03/2021 18:21:00	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_modificado_sem_marcas_participante_emenda_3.pdf	22/03/2021 18:20:45	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_CONSENTIMENTO_LIVRE_E_SCLARECIDO_Pac_V3.pdf	03/08/2020 13:05:59	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_CONSENTIMENTO_LIVRE_E_SCLARECIDO_Resp_V3.pdf	03/08/2020 13:04:36	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
Outros	SEI_GOVMG_Parecer_Tecnico.pdf	03/06/2020 13:57:00	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	SOLICITACAO_INCLUSAO_HEM.pdf	03/06/2020 13:56:39	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_pesquisa_emergencial_COVID_300320.pdf	31/03/2020 17:44:07	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_COVID.pdf	31/03/2020 17:21:41	Vandack Alencar Nobre Jr	Aceito

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

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

11.2. ANEXO 2. Patente



16/07/2021 870210064818
15:32

29409161927748827

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2021 014066 6

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 17217985000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: Brasil

Telefone: (31) 3409-6430

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 16/07/2021 às 15:32, Petição 870210064818

Dados do Pedido**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)**Título da Invenção ou Modelo de** MÉTODO DE ELISA PARA DIAGNÓSTICO DA COVID-19**Utilidade (54):** UTILIZANDO AMOSTRAS DE URINA**Resumo:** A presente tecnologia trata de um método baseado na plataforma de ELISA para o diagnóstico da COVID-19 por meio da detecção de anticorpos específicos em amostras de urina coletadas em qualquer período do dia dos pacientes através da utilização das proteínas recombinantes Nucleocapsídeo (N) ou Spike (S), ou sua subunidade S1 ou seu domínio RBD, do SARS-CoV-2.**Figura a publicar:** 4**Dados da Prioridade do Depósito**☒ Declaro que os dados identificadores fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

Tipo da Prioridade:	Data Prioridade:	Número Prioridade:	Pais Prioridade:	Código DAS:
Prioridade Interna (66)	27/04/2021	BR102021008051-5	BRASIL	

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 16/07/2021 às 15:32, Petição 870210064818

11.3. ANEXO 3. Artigo 1 - Science Advances

SCIENCE ADVANCES | RESEARCH ARTICLE

CORONAVIRUS

Detecting anti-SARS-CoV-2 antibodies in urine samples: A noninvasive and sensitive way to assay COVID-19 immune conversion

Fernanda Ludolf^{1†*}, Fernanda F. Ramos¹, Flávia F. Bagno^{2,3}, João A. Oliveira-da-Silva¹, Thiago A. R. Reis¹, Myron Christodoulides⁴, Paula F. Vassallo⁵, Cecilia G. Ravetti⁶, Vandack Nobre^{1,6†}, Flavio G. da Fonseca^{2,3†}, Eduardo A. F. Coelho^{1,7†}

Serum-based ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) has been widely used to detect anti-severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) antibodies. However, to date, no study has investigated patient urine as a biological sample to detect SARS-CoV-2 virus-specific antibodies. An in-house urine-based ELISA was developed using recombinant SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. The presence of SARS-CoV-2 antibodies in urine was established, with 94% sensitivity and 100% specificity for the detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies with the urine-based ELISA and 88% sensitivity and 100% specificity with a paired serum-based ELISA. The urine-based ELISA that detects anti-SARS-CoV-2 antibodies is a noninvasive method with potential application as a facile COVID-19 immunodiagnostic platform, which can be used to report the extent of exposure at the population level and/or to assess the risk of infection at the individual level.

Copyright © 2022
The Authors, some
rights reserved;
exclusive licensee
American Association
for the Advancement
of Science. No claim to
original U.S. Government
Works. Distributed
under a Creative
Commons Attribution
License 4.0 (CC BY).

INTRODUCTION

The outbreak of coronavirus disease 2019 (COVID-19) caused by infection with SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) spread rapidly throughout the world, and in just 3 months, it was declared as a pandemic (1). This outbreak has highlighted the importance of readily available diagnostic tests to contain emerging and reemerging diseases. Diagnosis of COVID-19 can be done by direct detection of either SARS-CoV-2 RNA or SARS-CoV-2 antigens, as well as by indirect detection of specific antibodies (serological assays) (2–5). These strategies play different roles in distinct settings, from point-of-care testing to large-scale epidemiological surveillance (4). However, independently of the used tests, it is important to understand their performance, characteristics, and limitations to use them properly (6).

Many different serological assays are available for COVID-19, including the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). These tests rely on the use of SARS-CoV-2 proteins to assess the presence of host-specific antibodies, such as immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA. Serological tests can identify individuals who have developed immunity to SARS-CoV-2 approximately 2 weeks post symptoms onset (PSO), and this information contributes substantially to

epidemiological studies by helping to determine previous exposure to SARS-CoV-2 on an individual and/or population level (4, 5).

Drawing blood for serological tests is one of the most common invasive procedures in health care, and although it has a low rate of complications, it can be unpleasant and difficult to perform in some circumstances. Collecting blood from children can be difficult, and even some adults might not wish to provide blood samples because of religious and/or personal reasons. The procedure also requires a trained phlebotomist, who may potentially be exposed to blood-borne pathogens. Blood collection via venipuncture can be especially challenging in some environments such as rural areas with limited health care resources and access (7, 8). Dried blood spots collected by finger or heel prick are a minimally invasive alternative with the potential to solve some of the logistical challenges associated with venipuncture and offer the advantages of sample stability and the possibility of self-collection (9). Urine is a potentially useful sample for serological testing because collection is noninvasive, simple, and safe, and urine is easy to handle and store and very convenient for the individual and for clinical practice.

It has been known since the mid-1950s that γ -globulins can be detected in urine (10, 13). Although not widely studied or reported, urine-based diagnostic tests that detect antibodies have been suggested as a possible noninvasive alternative to diagnose several conditions, such as dengue, *Helicobacter pylori* infection, hepatitis A and C, human immunodeficiency virus, strongyloidiasis, schistosomiasis, paragonimiasis, and leishmaniasis (11–20). To the best of our knowledge, there is no published study on detecting anti-SARS-CoV-2 antibodies in urine. In the present study, we used a recombinant (r)SARS-CoV-2 nucleocapsid (N) protein as part of an in-house ELISA to examine the presence of antiviral antibodies in urine samples collected from patients with SARS-CoV-2 infection, which was confirmed previously by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR).

RESULTS

We customized an in-house urine-based ELISA protocol using rSARS-CoV-2 N protein to evaluate the presence of anti-SARS-CoV-2

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 30.130-100, Minas Gerais, Brazil. ²Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31.270-901, Minas Gerais, Brazil. ³Centro de Tecnologia em Vacinas (CT Vacinas), BH-Tec, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 30.130-100, Minas Gerais, Brazil. ⁴Neisseria Research Group, Molecular Microbiology, School of Clinical and Experimental Sciences, University of Southampton Faculty of Medicine, Southampton General Hospital, Southampton SO16 6YD, UK. ⁵Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 30.130-100, Minas Gerais, Brazil. ⁶Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 30.130-100, Minas Gerais, Brazil. ⁷Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31.270-901, Minas Gerais, Brazil.

*Corresponding author. Email: feludolf@gmail.com

†These authors contributed equally to this work as co-senior authors.

antibodies in the urine of patients with SARS-CoV-2 infection that had been confirmed previously by qRT-PCR. We used the original and well-established serum-based ELISA to compare accuracy and to validate our data. We included 139 adult hospitalized or non-hospitalized patients in this study (Table 1), only after positive confirmation of SARS-CoV-2 infection by qRT-PCR. Hospitalized patients recruited for this study accounted for 16.3% of the total number of COVID-19–confirmed patients admitted during the collection period at the study hospitals. For this study, we collected 209 urine and 187 serum paired samples, which varied from the 2nd to the 60th day PSO. We also included unpaired negative samples collected before 2019 and from individuals who had maintained a rigorous quarantine regimen and did not show any symptoms of COVID-19.

Detection of specific SARS-CoV-2 antibodies in urine samples

From a total of 209 urine samples collected from 139 qRT-PCR–positive patients, at different days PSO, we found that 187 urine samples reacted with the rSARS-CoV-2 N protein above the positive index value of >1.1 , whereas 15 samples were classified as “indeterminate” (index values from 0.8 to 1.1) and 7 had a negative index value (<0.8) (Table 2). In addition, nonhospitalized individuals with mild symptoms ($n = 11$) showed positive ($n = 9$) or indeterminate ($n = 2$) index values, all of which were ≥ 0.9 (table S1). None of the urine samples obtained from pre- and post-COVID-19 negative controls ($n = 19$ and $n = 11$, respectively) reacted with the rSARS-CoV-2 N protein with a positive index above 1.1. Moreover, 26 samples had a negative index value below 0.8 and 4 had an indeterminate index value of 0.81, 0.85, 0.87, or 0.94 (Table 2).

Evaluation of IgG immunological conversion

We did a serial evaluation of IgG antibody in urine and serum samples from 44 patients on days 1, 3, 7, and 14 after their inclusion in the study. Immune conversion for SARS-CoV-2 N protein was observed in urine, with an increase in IgG levels after symptoms onset, which varied depending on the patient (Fig. 1). A comparative ELISA using either urine or serum samples, from 34 patients, with at least 2 days of sample collection, revealed that immune conversion takes places with small variation between the different samples. However, we observed higher index values for the urine samples (figs. S1, A to D). For patients from whom only one sample was collected, it was not possible to determine the PSO day when immune conversion occurred, and thus, it was only possible to determine whether they were positive or negative on the day of sample collection.

Immune conversion distribution of hospitalized patients by days PSO

A distribution plot was generated based on the PSO day of each patient's sample collection to assess the time window when most patients reported a positive index value, thus indicating the presence of specific antibodies. For individuals with more than one collection, we plotted only samples from the first collection with a positive index value. From a total of 128 patients, 123 patients (96%) showed positive index values (>1.1) for their urine samples collected before 60 days PSO. From a total of 125 patients, 107 patients (86%) showed a positive index value (>1.1) for their paired collected serum samples. Four patients had a negative index value (<0.8) for their urine samples, while eight patients had a negative index value for their serum samples, collected before 20 days PSO. After 20 days PSO, no patient had a negative index value (<0.8) for their urine samples, whereas two patients had a negative index value for their serum samples (Fig. 2).

A possible immune conversion window, based on the day of PSO, could be determined for some patients with more than two urine collections, who obtained a negative index value (<0.8) for the first sample collection and became positive (index > 1.1) on subsequent collections. Five patients (patients 23, 29, 39, 86, and 104) turned positive (index > 1.1) before 20 days PSO and two patients (patients 16 and 105) after 20 days PSO, while only one (patient 21) maintained an indeterminate index value (from 0.8 to 1.1) after 20 days PSO, as highlighted by the paired symbols located below the patient number in Fig. 2.

Comparing the accuracy of urine- and serum-based ELISA

We evaluated the diagnostic efficacy for COVID-19 of the rSARS-CoV-2 N protein by ELISA against a panel of urine and paired serum samples, collected at the same time, from hospitalized and nonhospitalized patients. For the analyses, urine and serum ($n = 209$ and $n = 187$, respectively) samples from qRT-PCR–positive patients were used, as well as unpaired negative samples from pre-COVID-19 ($n = 19$) and post-COVID-19 ($n = 11$) urines and pre-COVID-19 ($n = 30$) and post-COVID-19 ($n = 5$) sera. The individual OD (optical density) values determined for each urine or serum sample against the rSARS-CoV-2 N protein are shown in Fig. 3. Sensitivity and specificity values of 93.81 and 100%, respectively, were calculated for urine samples tested in ELISA, as well as 87.70 and 100%, respectively, for serum samples. Comparative diagnostic performance of urine- and serum-based ELISA for COVID-19, under optimal experimental protocols for each biological specimen, is presented in Table 3. Receiver operating characteristic (ROC) curves showed marginally superior accuracy when urine was tested (R value = 0.9856)

Table 1. Demographic breakdown of the study cohort. ICU, intensive care unit.

Characteristics	Healthy subjects ($n = 30$)	Nonhospitalized patients ($n = 11$)	Hospitalized patients* ($n = 128$)
Age, mean ($\pm$ SD)	40.5 $\pm$ 16.6	45.1 $\pm$ 5	62 $\pm$ 21
Female sex, %	75	45.5	41.8
Ward, %	0	0	29.75
ICU admission, %	0	0	70.35

*Hospitalized patients recruited for this study accounted for 16.3% of the total number of COVID-19–confirmed patients admitted during the collection period at the study hospitals.

Table 2. Evaluation of the presence of anti-SARS-CoV-2 antibodies in urine samples.

	Positive sample*	Negative sample†
Positive index (>1.1)	187 (90%)	-
Indeterminate index (0.8 to 1.1)	15 (7%)	4 (13%)
Negative index (<0.8)	7 (3%)	26 (87%)
Total samples	209 (100%)	30 (100%)

*Positive samples are collected from 139 qRT-PCR-positive patients, in different days PSO. †Negative samples collected before 2019 were considered truly negative and called "pre-COVID-19." Negative samples from individuals who had maintained a rigorous quarantine regimen and did not show any symptoms were considered theoretically negative and called "post-COVID-19."

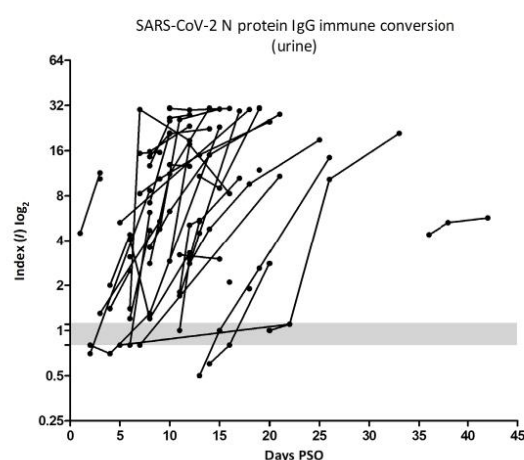


Fig. 1. IgG immunological conversion to SARS-CoV-2 N protein in patient urine samples. Patients are represented by the lines interconnected by the points (sample collected in different days PSO). The immunological conversion observed for each patient varied in days PSO. The plotted index values (*I*) are related to the absorbance ratio of the cutoff values. Positive index value, above 1.1; indeterminate index value, between 0.8 and 1.1 (gray); and negative index value, below 0.8.

compared to serum (R value = 0.9577), but this was not statistically significant (Fig. 4).

DISCUSSION

In the present study, we compared the ability of an rSARS-CoV-2 N protein-based ELISA to discriminate serologically positive patients with COVID-19 using either urine or serum samples. Our data showed sensitivity and specificity values of 94.0 and 100%, respectively, when urine was used, and the presence of antibodies in patients' urine was observed a few days PSO. The use of urine gave higher sensitivity to detect seroconversion over the use of sera under optimal experimental conditions. Serum-based ELISA tests

have been used to diagnose SARS-CoV-2 seropositivity by detecting specific antibodies in patient serum samples (4). However, to the best of our knowledge, this is the first study using a noninvasive urine-based ELISA test to identify specific antibodies against a SARS-CoV-2 protein. The use of urine to detect antibodies could be considered more convenient for clinical practice and for epidemiological surveillance compared to the challenges encountered with venipuncture, because it (i) allows patients to collect their own samples and (ii) eliminates the need for trained phlebotomists to draw blood and the attendant risks involved in handling potential blood-borne pathogens (11). We used sodium azide as a preservative for this study, as the presence of detectable antibodies in urine samples stored at 4°C has been reported for as long as 6 years (14). Nonetheless, the stability of five refrigerated urine samples without sodium azide was examined for five consecutive days, and our data showed that there was no change in assay performance between fresh and stored samples (fig. S2).

SARS-CoV-2 has four structural proteins—spike (S), envelope (E), membrane (M), and nucleocapsid (N) proteins—and all of them have already been tested as antigens for COVID-19 diagnosis using recombinant proteins, synthetic peptides, and/or polypeptide chimeras (4, 6, 22). Although many diagnostic tests use the recombinant protein S as the antigen, ELISA-based assays using a recombinant N protein have also been widely used with high sensitivity to detect antibodies in mildly infected patients (21, 23). In the current study, we found that the diagnostic performance of the serum-based ELISA (sensitivity and specificity of 87.7 and 100%, respectively) was marginally lower than that of the urine-based ELISA using recombinant N protein.

Specific IgG SARS-CoV-2 seroconversion usually occurs at 7 to 14 days after infection, and it is presumably accompanied by the development of protective immunity (4). In the early stages of infection, commercial serum-based antibody tests show low accuracy because most of the patient's immune response is still developing. The accuracy of serological tests can be near 100%, when samples are acquired at 20 days PSO (4, 8, 24–26). Note that urine samples collected from positive qRT-PCR patients who did not demonstrate positive index values might have been collected too early for seroconversion to occur. We confirmed this with a longitudinal analysis of the samples, collected from the same patients on different days PSO, who turned positive along the course of the disease (fig. S1). In our study, immune conversion for urine and serum occurred at a similar rate, with an increase in IgG production along the days PSO, when individual index values were plotted for such samples (fig. S1). ELISA-positive index values were obtained with many of the samples collected before 10 days PSO, at least for the hospitalized individuals. Nonetheless, we cannot assume at this moment that early detection and more rapid rise of antibodies would be due to a first or prior SARS-CoV-2 infection, as such information is lacking. Conversely, few samples showed a negative index value even after 10 days PSO collection.

We identified antibodies in patients up to 60 days PSO; however, a longer follow-up study is still necessary to establish the diagnostic detection window of anti-rSARS-CoV nucleocapsid antibodies in urine samples. The identification of anti-hepatitis A virus antibodies in urine appeared to be comparable to serum for the diagnosis of recent and past infection and could last for as long as 130 days PSO (15). It is important to be aware that a distinct diagnostic detection window may be found for urine- and serum-based ELISA. This

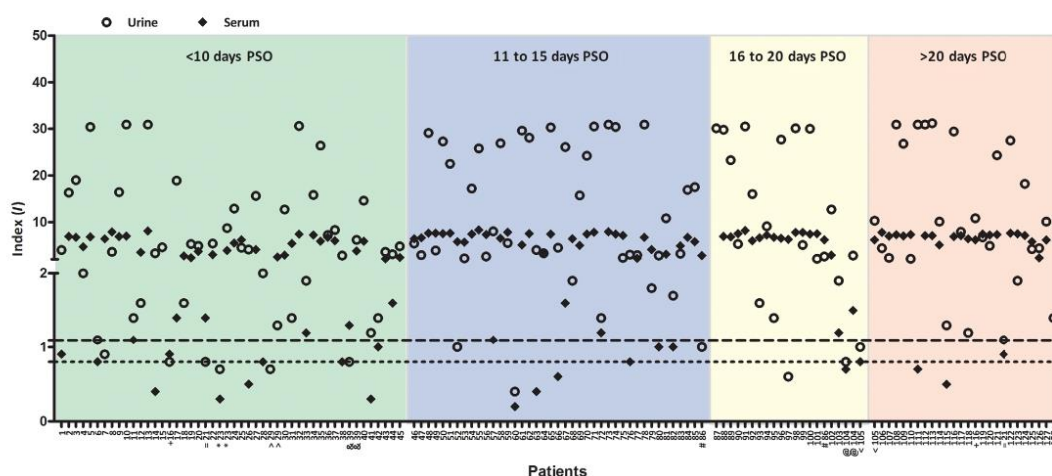


Fig. 2. Urine and serum index values (I) of each patient according to the days PSO. The index values obtained from urine and serum samples for each patient are represented by circles and diamonds, respectively. Both samples, from the last day before immune conversion (index < 1.1) and from the first day of immune conversion (index > 1.1), collected from the same patient were plotted and are indicated by the matching symbol below the patient number. Only the first sample collected was plotted for those patients with positive index. Individual data were divided according to the PSO days of the collection date: < 10 (green), 11 to 15 (blue), 16 to 20 (yellow), and > 20 days (red). Positive index value, above 1.1; indeterminate index value, between 0.8 and 1.1; and negative index value, below 0.8.

difference is found for visceral leishmaniasis (VL), for which the detection of specific antibodies in serum persists after cure, while the presence of antibodies completely disappears after 6 months when using a urine-based ELISA. This observation indicates a possible use for the specific diagnosis of VL and also for monitoring the treatment response (20).

Our study has suggested similar patterns of baseline antibody responses for urine-based ELISA to those found for serum-based ELISA and with substantial variation in the magnitude of the responses between participants within each severity category, hospitalized or nonhospitalized (27). The degree and duration of immunity that antibodies confer, from infection or vaccination, remain unclear (28). Notably, if IgG antibodies are present, they often indicate a previous infection, but do not exclude an ongoing infection.

Vaccines approved to protect against SARS-CoV-2 infection and administered around the world, such as Oxford/AstraZeneca adenovirus viral vector AZD1222, Pfizer-BioNTech mRNA vaccine BNT162b2, Johnson & Johnson's Janssen modified viral vector, Moderna mRNA Spikevax, and Sputnik V adenovirus viral vector, use only the S protein of SARS-CoV-2 to elicit protective immunity. For these vaccines, the SARS-CoV-2 N protein antibody response evaluated by ELISA in our study could be used potentially as a reliable tool for assessing antibody responses to COVID-19 versus antibody responses induced by vaccination. On the other hand, the inactivated CoronaVac/Sinovac or Sinopharm viral vaccines contain the N protein in their formulation and could be evaluated to confirm vaccine-induced antibody conversion. Because of the diversity of the vaccines licensed in each country and the types of immunological tests used (SARS-CoV-2 N and/or S proteins), humoral conversion results can be misinterpreted by patients who may not always know what type of antibody test was used (29, 30).

Many individuals do not have their infectious status confirmed by the direct detection of either SARS-CoV-2 RNA or antigens, because of the limitations of tests, the short detection window, or the availability of tests to the patients. While antibody tests should not be used to establish the presence or absence of acute SARS-CoV-2 infection, they can be a useful tool for identifying people with resolving or past SARS-CoV-2 infection, which can aid diagnosis and complications arising from COVID-19 (8). In this sense, the development of our N protein urine-based ELISA becomes an additional available tool for individual and epidemiological use. Furthermore, because we have identified antibodies to the SARS-CoV-2 N protein in urine, the development of a urine-based spike ELISA test may also be feasible to cover other applications of serological tests such as the detection of vaccine-induced antibodies.

Urine collection has been neglected as a biological specimen because urine-based serological tests are uncommon. Our study included 19 urine samples collected before the outbreak in 2019, and all of them showed index values of < 1.1 . We also included 11 urine samples collected during 2021 from individuals who remained in quarantine and who did not show any symptoms throughout 2020/2021, although they cannot be considered as true negatives. Nevertheless, all these samples also showed an index of < 1.1 (no positive).

A minimum of 98% specificity was stated in some countries for lateral flow immunoassay home tests, as false-positive results may increase the risk of self-exposure of nonimmune protected individuals (31). ELISA is an analytical method used to identify and measure analytes in low concentrations with less risk of interference. As a quantitative and qualitative assay, its cutoff is defined to distinguish between positive and negative samples with accuracy (32). The N protein was specific for SARS-CoV-2 in our ELISA, because we observed no humoral reactivity in serum samples from patients with

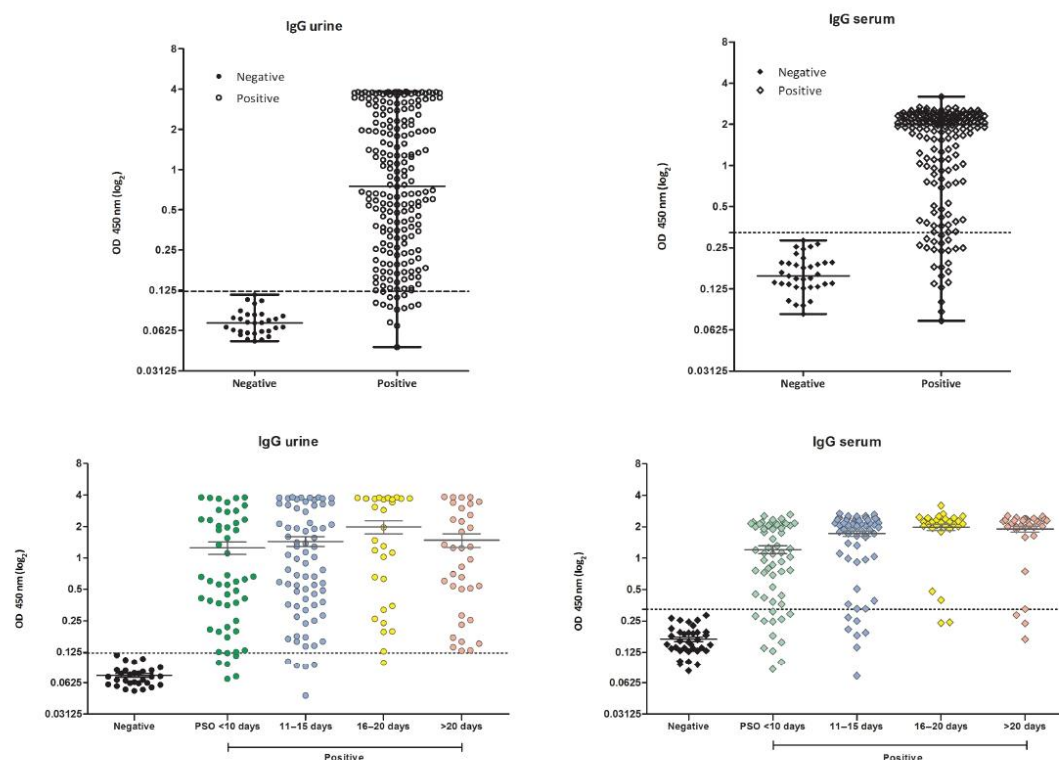


Fig. 3. Evaluation for SARS-CoV-2 diagnosis by using rSARS-CoV-2 N protein against patient urine and serum samples. ELISA was done using urine and serum samples ($n = 209$ and $n = 187$, respectively) from COVID-19 patients with positive qRT-PCR. Urine and unpaired serum samples from healthy subjects ($n = 30$ and $n = 37$, respectively) were also used. The mean of each group is shown, and the dashed line indicates the cutoff value determined for each type of biological sample (urine = 0.123 and serum = 0.323). The cutoff values were determined as the mean plus three times the SD of negative samples. Bottom: Positive sample groups are divided according to the PSO days of the collection date: <10 (green), 11 to 15 (blue), 16 to 20 (yellow), and >20 days (red).

Table 3. Comparative IgG anti-SARS-CoV-2 N protein diagnostic performance of the in-house urine- and serum-based ELISA. The diagnostic performance of the antigen against the urine and serum samples was based on the estimation of sensitivity (Se), specificity (Sp), area under the curve (AUC), 95% confidence level (95% CI), and Youden index (J). Positive and negative predictive values (PPV and NPV, respectively) were calculated on the basis of the index value, excluding the indeterminate value samples, and using the following equations: $NPV = \text{true negative} / \text{false negative} + \text{true negative}$ and $PPV = \text{true positive} / \text{false positive} + \text{true positive}$. CI, confidence interval.

Sample	AUC	P value	Cutoff	Se (%)	95% CI	Sp (%)	95% CI	J	PPV	NPV
Urine	0.9856	<0.0001	0.123	93.81	89.65–96.66	100	88.06–100	0.94	1.0	0.79
Serum	0.9577	<0.0001	0.323	87.70	82.12–92.04	100	90.00–100	0.88	1.0	0.70

respiratory tract viral infections (influenza, measles, and parvovirus), patients with arboviruses (yellow fever virus, chikungunya, dengue, and Zika), and individuals vaccinated against influenza (30 to 60 days) (21). Nonetheless, our study has limitations, as we have not tested our ELISA against samples obtained from patients with respiratory

infections caused by other types of coronavirus. Therefore, we cannot rule out the possibility of cross-reactivity with other human coronaviruses.

The comparative use of paired serum samples as reference was fundamental for our study because of their conventional use in

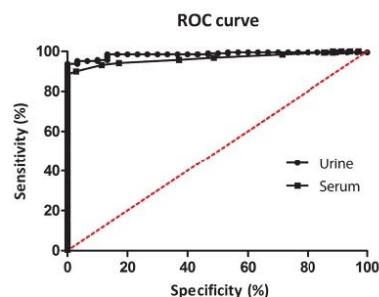


Fig. 4. ROC curve for comparative diagnostic performance of urine- and serum-based ELISA for COVID-19. ROC curves were constructed using the individual OD values for each sample to obtain the sensitivity, specificity, and area under the curve.

ELISA, noting that Bagno *et al.* (21) had already validated the serum-based ELISA platform used here. Urine-based and serum-based ELISA achieved a very similar qualitative profile. However, we should interpret the quantitative comparison of reaction intensity between samples with care, as urine samples were collected without a fixed standard retention time; thus, there may be variation in antibody concentration. It would be important in a future study to determine and fix retention time, as well as for its use in clinical practice. When the effect of the timing of urine collection was studied for *Wuchereria bancrofti* infection, with urine collections in the early morning and later throughout the day, only a small fluctuation in antibody units was observed and all samples remained positive (33, 34). In a urine-based ELISA study conducted for *H. pylori*, it was observed that the urine water content influenced the concentration of antibody in urine; however, the performance of the qualitative assay on post-fasting urine correlated well with those of serum samples (33, 35). Various features of urine, beyond retention time, could influence signal strength relative to serum and deserve future investigation. Changes in urine pH and the presence of microorganisms had no significant effect on the absorbance value of the *H. pylori* urine-based ELISA. Moreover, sodium azide is commonly added to prevent changes in urine pH resulting from contamination and growth of bacteria (33, 35). Patients with significant proteinuria should be tested with caution as demonstrated for the *H. pylori* urine-based ELISA (35).

In summary, our preliminary study suggests that a urine-based ELISA using a recombinant N protein could be useful for diagnosing SARS-CoV-2 immune conversion. Advantages of the assay included ease of sample collection, biological sample stability, easy assay standardization, and high levels of accuracy. This noninvasive immunoassay can become a useful tool to guide public health policy across the clinical and research environment, with effects to be provided at the individual and population level.

MATERIALS AND METHODS

Experimental design

First, we evaluated the presence of anti-SARS-CoV-2 nucleocapsid-specific antibodies in 209 urine samples, collected between the 2nd and 60th PSO day, from 139 infected patients previously confirmed with qRT-PCR. We then checked the immune conversion window

of 44 patients with follow-up collections on days 1, 3, 7, and 14 after their inclusion in the study. We used the original and well-established serum-based ELISA to compare accuracy and validate our findings. To assess the detection window time on which most patients found a positive index value, we plotted the PSO day distribution of the first day of positive urine and serum sample collection of 128 and 125 patients, respectively. Last, we compared the diagnostic accuracy of the rSARS-CoV-2 N protein against a panel of 209 urine and 187 serum paired samples, which we collected at the same time, between the 2nd and the 60th day PSO, from hospitalized and nonhospitalized patients. We also included unpaired negative samples collected before 2019 and from individuals who had maintained a rigorous quarantine and did not show any symptoms.

Research subjects and biological samples

The study was approved by the Human Research Ethics Committee from the Federal University of Minas Gerais (UFMG; Belo Horizonte, Brazil) under protocol number CAAE 30437020.9.0000.5149. Patients seeking hospital assistance presenting respiratory symptoms were assessed by the attending physician and included in this study after confirmation of a positive qRT-PCR test for SARS-CoV-2. Nonhospitalized individuals who experienced mild COVID-19 symptoms and tested positive for SARS-CoV-2 by qRT-PCR were also included in this study. All included participants were adults, male or female, and signed an informed consent form. Hospitalized patients ($n = 128$) were recruited at Hospital das Clínicas of the UFMG (Belo Horizonte, Brazil) and Hospital Santa Helena (Betim, Brazil), and nonhospitalized individuals ($n = 11$) were recruited through active search in the general population (Belo Horizonte, Brazil).

Urine and serum samples from hospitalized patients were collected on the first day of inclusion and, whenever possible, on days 1, 3, 7, and 14 after recruitment, thus varying the corresponding day PSO for each patient. Urine and serum samples from nonhospitalized individuals, who tested positive for SARS-CoV-2 infection by qRT-PCR, were collected between 20 and 60 days PSO. Samples collected before 2019 were considered truly negative and called “pre-COVID-19.” Samples from individuals who had maintained a rigorous quarantine and did not show any symptoms were considered theoretically negative and called “post-COVID-19 negative.” Both sample sets were used as negative controls. The total number of urine samples used herein was 198 hospitalized and 11 nonhospitalized, and 19 and 11 pre- and post-COVID-19 negative, respectively. The total number of serum samples was of 226 hospitalized and 4 nonhospitalized, and 30 pre-COVID and 5 post-COVID negative.

Urine samples were collected any time of the day, using a 80-ml urine collection cup, when the liquid was transferred to 15-ml tubes containing 0.1% (w/v) sodium azide. Tubes were kept at room temperature for a few days or at 4°C for long time storage. The pre-COVID-19 urine samples were previously collected in 2018/2019 and kept at 4°C until use. Blood was collected in 20-ml tubes without anticoagulant, and serum was separated by centrifugation at 3000g for 15 min at 4°C and stored at −20°C until use.

Enzyme-linked immunosorbent assay

ELISA was performed according to Bagno *et al.* (21) under optimal experimental conditions for urine or serum, as described below. Plates were coated with 0.4 µg per well of rSARS-CoV-2 N protein diluted in carbonate buffer for 18 hours at 4°C. After antigen binding, blocking was done with a solution of phosphate-buffered saline

SCIENCE ADVANCES | RESEARCH ARTICLE

(PBS) containing 0.05% (v/v) Tween 20 (PBS-T) and 1% (w/v) bovine serum albumin for 2 hours at 25°C. Then, the wells were washed using PBS-T and incubated with 100 µl per well of urine (undiluted) or serum (1/100 dilution in PBS-T) samples for 1 hour or 30 min, respectively, at 37°C, when they were again washed. Using urine as samples, peroxidase-conjugated anti-human IgG antibody (Sigma-Aldrich), 1/10,000 dilution in PBS-T, was added, and the plates were incubated for 1 hour at 37°C. Using serum as samples, the conjugated antibody was diluted 1/80,000, and the plates were incubated for 30 min at 37°C. Next, the wells were washed, and reactions were developed by the addition of TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) for 15 min in the dark. Reactions were stopped by adding 0.5 M H₂SO₄, and the OD values were read on a microplate spectrophotometer (Multiskan Go) at λ 450 nm. The cutoff values were determined as the mean plus three times the SD of negative samples. The index (I) value for each sample was calculated using the following equation: $I = (OD_{450\text{ nm}})/(\text{cutoff})$. The index value was classified positive above 1.1, indeterminate between 0.8 and 1.1, and negative below 0.8.

Statistical analysis

Data collected from the included individuals were recorded in a dedicated form. The analyses were done using the GraphPad Prism program (version 8.0 for Windows). Value distributions (means ± SD, as indicated) were obtained for continuous variables, while categorical ones were evaluated as proportions. ROC curves were constructed with OD values of the positive versus negative (pre- and post-COVID negative) samples. The diagnostic performance was evaluated by estimation of sensitivity, specificity, area under the curve, and Youden index. Confidence intervals (CIs) were defined with 95% confidence level (95% CI). The paired *t* test was used to compare the distinct groups. *P* < 0.05 values were considered significant. Positive and negative predictive values (PPV and NPV, respectively) were calculated on the basis of the index value, excluding the indeterminate value samples, and using the following equations: NPV = true negative/false negative + true negative and PPV = true positive/false positive + true positive.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary material for this article is available at <https://science.org/doi/10.1126/sciadv.abn7424>

View/request a protocol for this paper from [Bio-protocol](#).

REFERENCES AND NOTES

- World Health Organization, Coronavirus (COVID-19) dashboard (World Health Organization, 2021); <https://COVID19.who.int/>.
- World Health Organization, Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection (World Health Organization, 2021); www.who.int/publications/i/item/antigen-detection-in-the-diagnosis-of-sars-cov-2-infection-using-rapid-immunoassays.
- Y. Yang, M. Yang, J. Yuan, F. Wang, Z. Wang, J. Li, M. Zhang, L. Xing, J. Wei, L. Peng, G. Wong, H. Zheng, W. Wu, C. Shen, M. Liao, K. Feng, J. Li, Q. Yang, J. Zhao, L. Liu, Y. Liu, Laboratory diagnosis and monitoring the viral shedding of SARS-CoV-2 infection. *Innovation* **1**, 100061 (2020).
- R. Weissleder, H. Lee, J. Ko, M. J. Pittet, COVID-19 diagnostics in context. *Sci. Transl. Med.* **12**, eabc1931 (2020).
- F. Amanat, D. Stadlbauer, S. Strohmaier, T. H. O. Nguyen, V. Chromikova, M. McMahon, K. Jiang, G. A. Arunkumar, D. Jurczyszak, J. Polanco, M. Bermudez-Gonzalez, G. Kleiner, T. Aydllo, L. Miorin, D. S. Fierer, L. A. Lugo, E. M. Kojic, J. Stoeber, S. T. H. Liu, C. Cunningham-Rundles, P. L. Felgner, T. Moran, A. Garcia-Sastre, D. Caplivski, A. C. Cheng, K. Kedzierska, O. Vapalahti, J. M. Hepojoki, V. Simon, F. Krammer, A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nat. Med.* **26**, 1033–1036 (2020).
- Food and Drug Administration, EUA authorized serology test performance (Food and Drug Administration, 2021); www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/eua-authorized-serology-test-performance.
- World Health Organization, Guidelines on drawing blood: Best practices in phlebotomy (World Health Organization, 2010).
- Centers for Disease Control and Prevention, Interim guidelines for COVID-19 antibody testing: Current status of antibody testing in the United States: Antigenic targets (Centers for Disease Control and Prevention, 2021); www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antibody-tests-guidelines.html#anchor_1590280385631.
- G. J. Walker, R. Davis, Z. Naing, B. McEntee, Y. Lu, T. Denadja, W. D. Rawlinson, Serological detection of SARS-CoV-2 IgG using commercially available enzyme immunoassays on dried blood spots collected from patients. *Microbiol. Spectr.* **9**, e0124521 (2021).
- D. W. Burdon, Immunoglobulins of normal human urine and urethral secretions. *Immunology* **21**, 363–368 (1971).
- C. Eamudomkarn, P. Sithithaworn, C. Kamamia, A. Yakovleva, J. Sithithaworn, S. Kaewke, A. Techasen, W. Lailome, P. Yongvanit, C. Wangboon, P. Saichua, M. Itoh, J. M. Bethony, Diagnostic performance of urinary IgG antibody detection: A novel approach for population screening of strongyloidiasis. *PLOS ONE* **13**, e0192598 (2018).
- A. K. Sahni, A. Nagendra, P. Roy, S. Patrikar, Usefulness of enzyme immunoassay (EIA) for screening of anti HIV antibodies in urinary specimens: A comparative analysis. *Med. J. Armed Forces India* **70**, 211–214 (2014).
- S. Vázquez, S. Cabezas, A. B. Pérez, M. Puppo, D. Ruiz, N. Calzada, L. Bernardo, O. Castro, D. González, T. Serrano, A. Sanchez, M. G. Guzmán, Kinetics of antibodies in sera, saliva, and urine samples from adult patients with primary or secondary dengue 3 virus infections. *Int. J. Infect. Dis.* **11**, 256–262 (2017).
- S. A. Ejaz, P. Bhattacharya, M. A. Bakhtey, A. A. Mumtaz, K. Pandey, V. N. Das, P. Das, M. Rahaman, R. P. Goswami, N. Ali, Noninvasive diagnosis of visceral leishmaniasis: Development and evaluation of two urine-based immunoassays for detection of Leishmania donovani infection in India. *PLOS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0005035 (2016).
- M. S. Joshi, S. D. Chitambar, V. A. Arankall, M. S. Chadha, Evaluation of urine as a clinical specimen for diagnosis of hepatitis A. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**, 840–845 (2002).
- M. Itoh, N. Ohta, T. Kanazawa, Y. Nakajima, M. Sho, M. Minai, Z. Daren, Y. Chen, H. He, Y. K. He, Z. Zhong, Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay with urine samples: A tool for surveillance of schistosomiasis japonica. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* **34**, 469–472 (2003).
- X. G. Qiu, F. Nakamura-Uchiyama, Y. Nawa, M. Itoh, A tool for mass-screening of paragonimiasis: An enzyme-linked immunosorbent assay with urine samples. *Trop. Med. Health* **44**, 19 (2016).
- Y. Gong, Q. Li, Y. Yuan, Accuracy of testing for anti-*Helicobacter pylori* IgG in urine for *H. pylori* infection diagnosis: A systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* **7**, e013248 (2017).
- S. Asfaram, S. Hosseini Teshnizi, M. Fakhar, E. S. Banimostafavi, M. Soosaraei, Is urine a reliable clinical sample for the diagnosis of human visceral leishmaniasis? A systematic review and meta-analysis. *Parasitol. Int.* **67**, 575–583 (2018).
- S. A. Ejaz, A. Bhattacharya, S. T. Choudhury, S. Ghosh, A. Sabur, K. Pandey, V. N. R. Das, P. Das, M. Rahaman, R. P. Goswami, N. Ali, Immunoproteomic identification and characterization of Leishmania membrane proteins as non-invasive diagnostic candidates for clinical visceral leishmaniasis. *Sci. Rep.* **8**, 12110 (2018).
- F. F. Bagno, S. A. R. Sérgio, M. M. Figueiredo, L. C. Godoi, L. A. F. Andrade, N. C. Salazar, C. P. Soares, A. Aguiar, F. J. Almeida, Edmilson D. da Silva, A. G. P. Ferreira, E. L. Durigon, R. T. Gazzinelli, S. M. R. Teixeira, A. P. S. M. Fernandes, F. G. da Fonseca, Development and validation of an enzyme-linked immunoassay kit for diagnosis and surveillance of COVID-19. *medRxiv* 10.1101/2021.06.23.21259392 (29 June 2021); <https://doi.org/10.1101/2021.06.23.21259392>.
- M. A. Lorenzo, D. Pachón, A. Maier, H. Bermúdez, S. Losada, M. Toledo, F. H. Pujol, B. A. Noya, O. Noya, M. L. Serrano, Immunoinformatics and Peptscan strategies on the path of a peptide-based serological diagnosis of COVID-19. *J. Immunol. Methods* **495**, 113071 (2021).
- M. Touma, COVID-19: Molecular diagnostics overview. *J. Mol. Med.* **98**, 947–954 (2020).
- Q.-X. Long, B.-Z. Liu, H.-J. Deng, G.-C. Wu, K. Deng, Y.-K. Chen, P. Liao, J.-F. Qiu, Y. Lin, X.-F. Cai, D.-Q. Wang, Y. Hu, J.-H. Ren, N. Tang, Y.-Y. Xu, L.-H. Yu, Z. Mo, F. Gong, X. L. Zhang, W.-G. Tian, L. Hu, X.-X. Zhang, J.-L. Xiang, H.-X. Du, H.-W. Liu, C.-H. Lang, X.-H. Luo, S.-B. Wu, X.-P. Cui, Z. Zhou, M.-M. Zhu, J. Wang, C.-J. Xue, X.-F. Li, L. Wang, Z.-J. Li, K. Wang, C.-C. Niu, Q.-J. Yang, X.-J. Tang, Y. Zhang, X.-M. Liu, J.-J. Li, D.-C. Zhang, F. Zhang, P. Liu, J. Yuan, Q. Li, J.-L. Hu, J. Chen, A.-L. Huang, Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat. Med.* **26**, 845–848 (2020).
- A. T. Huang, B. Garcia-Carreras, M. D. T. Hitchings, B. Yang, L. C. Katzelnick, S. M. Rattigan, B. A. Borgert, C. A. Moreno, B. D. Solomon, L. Trimmer-Smith, V. Etienne, I. Rodriguez-Barraquer, J. Lessler, H. Salje, D. S. Burke, A. Wesolowski, D. A. T. Cummings,

- A systematic review of antibody mediated immunity to coronaviruses: Kinetics, correlates of protection, and association with severity. *Nat. Commun.* **11**, 4704 (2020).
26. J. Van Elslande, E. André, M. Van Ranst, K. Lagrou, P. Vermeersch, Immunoassays for anti-SARS-CoV-2 antibodies: Recent insights. *Lancet Infect. Dis.* **5**, e120 (2021).
 27. M. J. Peluso, S. Takahashi, J. Hakim, J. D. Kelly, L. Torres, N. S. Iyer, K. Turcios, O. Janson, S. E. Munter, C. Thanh, J. Donatelli, C. C. Nixon, R. Hoh, V. Tai, E. A. Fehrman, Y. Hernandez, M. A. Spinelli, M. Gandhi, M. A. Palafox, A. Vallari, M. A. Rodgers, J. Prostko, J. Hackett Jr., L. Trinh, T. Wrin, C. J. Petropoulos, C. Y. Chiu, P. J. Norris, C. DiGermanio, M. Stone, M. P. Busch, S. K. Elledge, X. X. Zhou, J. A. Wells, A. Shu, T. W. Kurtz, J. E. Pak, W. Wu, P. D. Burbelo, J. I. Cohen, R. L. Rutishauser, J. N. Martin, S. G. Deeks, T. J. Henrich, I. Rodriguez-Barraquer, B. Greenhouse, SARS-CoV-2 antibody magnitude and detectability are driven by disease severity, timing, and assay. *Sci. Adv.* **7**, eabh3409 (2021).
 28. National SARS-CoV-2 Serology Assay Evaluation Group, Performance characteristics of five immunoassays for SARS-CoV-2: A head-to-head benchmark comparison. *Lancet Infect. Dis.* **20**, 1390–1400 (2020).
 29. Food and Drug Administration, Antibody testing is not currently recommended to assess immunity after COVID-19 vaccination: FDA safety communication (2021); www.fda.gov/medical-devices/safety-communications/antibody-testing-not-currently-recommended-assesses-immunity-after-covid-19-vaccination-fda-safety.
 30. M. Narasimhan, L. Mahimainathan, E. Araj, A. E. Clark, J. Markantonis, A. Green, J. Xu, J. A. Soelle, C. Alexis, K. Fankhauser, H. Parikh, K. Wilkinson, A. Reczek, N. Kopplin, S. Yekkaluri, J. Balani, A. Thomas, A. G. Singal, R. Sarode, A. Muthukumar, Clinical evaluation of the Abbott Alinity SARS-CoV-2 spike-specific quantitative IgG and IgM assays among infected, recovered, and vaccinated groups. *J. Clin. Microbiol.* **59**, e0038821 (2021).
 31. E. R. Adams, M. Ainsworth, R. Anand, M. I. Andersson, K. Auckland, J. K. Baillie, E. Barnes, S. Beer, J. I. Bell, T. Berry, S. Bibi, M. Carroll, S. K. Chinnakannan, E. Clutterbuck, R. J. Cornall, D. W. Crook, T. de Silva, W. Dejnirattisai, K. E. Dingle, C. Dold, A. Espinosa, D. W. Eyre, H. Farmer, M. F. Mendoza, D. Georgiou, S. J. Hoosdally, A. Hunter, K. Jefferey, D. F. Kelly, P. Kleneman, J. Knight, C. Knowles, A. J. Kwok, U. Leuschner, R. Levin, C. Liu, C. López-Camacho, J. Martinez, P. C. Matthews, H. McGivern, A. J. Mentzer, J. Milton, J. Mongkolsapaya, S. C. Moore, M. S. Oliveira, F. Pereira, E. Perez, T. Peto, R. J. Ploeg, A. Pollard, T. Prince, D. J. Roberts, J. K. Rudkin, V. Sanchez, G. R. Sreaton, M. G. Semple, J. Slon-Campos, D. T. Skelly, E. N. Smith, A. Sobrinodiaz, J. Staves, D. I. Stuart, P. Supasa, T. Surik, H. Thraves, P. Tsang, L. Turtle, A. S. Walker, B. Wang, C. Washington, N. Watkins, J. Whitehouse; National COVID Testing Scientific Advisory Panel, Antibody testing for COVID-19: A report from the National COVID Scientific Advisory Panel. *Wellcome Open Res.* **5**, 139 (2020).
 32. S. E. Ridge, A. L. Vizard, Determination of the optimal cut-off value for a serological assay: An example using the John's Absorbed EIA. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 1256–1261 (1993).
 33. F. Nagaoka, T. Yamazaki, S. Akashi-Takamura, M. Itoh, Detection of urinary antibodies and its application in epidemiological studies for parasitic diseases. *Vaccine* **9**, 778 (2021).
 34. M. Itoh, M. V. Weerasooriya, X.-G. Qiu, N. K. Gunawardena, M. T. Anantaphruti, S. Tesana, P. Rattanaxay, Y. Fujimaki, E. Kimura, Sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection in urine samples. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **65**, 362–365 (2001).
 35. M. M. Alemohammad, T. J. Foley, H. Cohen, Detection of immunoglobulin G antibodies to *Helicobacter pylori* in urine by an enzyme immunoassay method. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 2174–2177 (1993).
- Acknowledgments:** We acknowledge the help of all students, nurses, and clinicians involved in the collection and organization of the samples. We also thank Hospital das Clínicas/UFMG and Hospital Santa Helena for allowing the collection of samples. Last, we thank CT-Vacinas/UFMG for technical support. **Funding:** This work was supported by Secretaria de Educação Superior do Ministério da Educação (SESU/MEC), grant 04/2020, Enfrentamento da COVID-19 (to V.N.); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), grant APQ-408675/2018-7 (to E.A.F.C.); Brazilian Ministry of Science, Technology and Innovation (MCTI)—Rede Virus initiative (to F.G.d.F.); and Brazilian agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and CNPq fellowships/scholarships (to F.L., F.F.R., F.F.B., J.A.O.-d.-S., and T.A.R.R.). **Author contributions:** Conceptualization: F.L. Study design: F.L., J.A.O.-d.-S., P.F.V., C.G.R., F.G.d.F., V.N., and E.A.F.C. Technical support: F.F.B. and F.G.d.F. Execution: F.L., F.F.R., and F.F.B. Data analysis and interpretation: F.L., F.F.R., M.C., and E.A.F.C. Figures: F.L. and F.F.R. Patient recruitment, TCLE application (informed consent form), and sample collection: J.A.O.-d.-S., T.A.R.R., P.F.V., and C.G.R. Funding acquisition and infrastructure: F.G.F., V.N., and E.A.F.C. Writing—Original draft: F.L. and E.A.F.C. Writing—Review and editing: F.L., F.F.R., F.F.B., P.F.V., C.G.R., M.C., F.G.d.F., V.N., and E.A.F.C. Directly accessed and verified the underlying data reported: F.L., F.F.R., F.F.B., and E.A.F.C. **Competing interests:** A patent application at the Brazilian National Institute of Industrial Property was issued under case number BR 10 2021 014066 6. The authors declare that they have no other competing interests. **Data and materials availability:** All data needed to evaluate the conclusions in the paper are present in the paper and/or the Supplementary Materials.
- Submitted 16 December 2021
 Accepted 31 March 2022
 Published 13 May 2022
 10.1126/sciadv.abn7424

11.4. ANEXO 4. Artigo 2 – *Bio-protocol (Preprint)*

Ludolf, F, Ramos, F F, Bagno, F, Coelho, E A and Fonseca, F G

Last updated date: Jun 14, 2022 DOI: 10.21769/p1720

Urine-based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to detect anti-SARS-CoV-2 nucleocapsid protein antibodies

Abstract

An in house urine-based ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) were developed to detect anti-SARS-CoV-2 nucleocapsid protein (N) IgG antibodies in urine samples, providing a noninvasive diagnostic tool to assess the humoral response against COVID-19. The presence of anti-SARS-CoV-2 N protein antibodies was detected with 94% sensitivity and 100% specificity with urines collected from the second to the 60th day post symptoms onset with this protocol.

Background

Many different serological assays are available for COVID-19, which preferentially uses plasma or serum as sample. Drawing blood can be unpleasant and difficult to perform in some circumstances, requiring sterile equipment and trained staff. Body fluids such as urine have been suggested as an alternative for the detection of immunoglobulins against several microbial agents (1-10). In this context, we develop an in-house ELISA to detect anti-SARS-CoV-2 nucleocapsid protein antibodies in urine samples. The protocol was based on a pre-validated serum-based ELISA with some modifications. Urine-based and paired serum-based ELISA achieved a very similar qualitative profile. Some of the advantages of the urine-based ELISA include ease of sample collection, biological sample stability and high levels of accuracy. Since most vaccine platforms are based on immune response against SARS-CoV-2 Spike (S) protein, anti-SARS-CoV-2 N ELISA may differentiate in this case individuals previously infected with SARS-CoV-2 from those vaccinated (11,12). So, this test may contribute to epidemiological studies by helping to determine previous exposure to SARS-CoV-2 in a population or individual level.

Materials and Reagents

1. High binding 96-well polystyrene microplate, (Corning, Merck, Germany, catalog number: CLS2592).
2. SARS-CoV-2 Nucleocapsid Recombinant protein (*in house* production). *¹
3. Coating buffer: 0.2 M sodium carbonate/bicarbonate, pH 9.6 (Merck, Germany, catalog number: 222321 and S6014).
4. Wash buffer: 0.1 M sodium phosphate (Merck, Germany, catalog number: 7558-79-4), 0.15 M sodium chloride (Merck, Germany, catalog number: S9625, pH 7.4 containing 1% Tween 20 (Merck, Germany, catalog number: P2287), pH 7.4.
5. Blocking buffer: 1% (w/v) Bovine Serum Albumin (BSA, Merck, Germany, catalog number: A7030) in wash buffer pH 7.4.
6. Conjugated antibody: peroxidase-conjugated anti-human IgG antibody (Sigma- Aldrich, A0170) diluted (1:10.000) in wash buffer.
7. Substrate: TMB substrate (Scienco, Brazil, Reference: One Step).
8. Stop solution: 0,5M sulfuric acid (Merck, Germany, catalog number: 258105).

*¹ Note: alternative N antigen from Fapon Biotech Inc, China, catalog number: FP0516.

9. 50 mL reagent reservoir sterile polystyrene (Merck, Germany, catalog number: CLS4870).
10. Tips: 10 μ L, 200 μ L and 300 μ L.

Equipment

1. Vortex Mixer (Thermo Fisher Scientific, USA, catalog number: 88882012).
2. Incubator at 37°C (Fanem, Brazil, catalog number: 502/2-C).
3. ELISA Microplate Washer (Wellwash™ Microplate Washer, 5165000).
4. Microplate Spectrophotometer (Multiskan Go, Thermo Fisher Scientific, USA, catalog number: N10588, 450 nm).
5. Microplate Washer (not compulsory, Wellwash Versa, Thermo Fisher Scientific, USA, catalog number: 5165010).
6. Monochannel 1-10 μ L pipette (Thermo Fisher Scientific, USA, catalog number: 4641040N).
7. Monochannel 10-100 μ L pipette (Thermo Fisher Scientific, USA, catalog number: 4641070N).
8. Multichannel 30-300 μ L pipette (Thermo Fisher Scientific, USA, catalog number: 4661070N).

Software

1. Excel (Microsoft).
2. GraphPad Prism (version 8.0, USA).

Procedure

1. Plates

- a. Coating: Distribute 100 μ L of coating solution containing the antigen in each well of the plate (400 ng/well). Incubate at 2-8°C overnight;
- b. Blocking: Remove the coating solution from the wells by aspiration (ELISA microplate washer) or by decanting (manual). Add 250 μ L of blocking solution to each well of the plate. Incubate at room temperature for two hours;
- c. Drying: Remove the blocking solution, tap the plate inverted for a few seconds on absorbent paper until dry.

2. ELISA

- a. Place all reagents at room temperature and wait for 30 minutes until stabilize;
- b. Add 100 μ L of each sample (undiluted urine) to the wells of the plate;
- c. Cover the wells with plate sealer;
- d. Incubate the plate for 60 minutes at 37°C;
- e. Remove the plate sealer;
- f. Discard the contents of the cavities by suction (washing machine) or by decanting (manual);

- g. Add 300ul of Wash Solution to each well (and then remove) and repeat it for 5 times. To ensure plate drying, at the end of the wash, tap the plate inverted for a few seconds on absorbent paper;
- h. Add 100 µL of Conjugated antibody into each well;
- i. Cover the wells with plate sealer;
- j. Incubate the plate 60 minutes at 37°C;
- k. Remove the plate sealer;
- l. Repeat the Wash step (step g);
- m. Add 100 µL of Substrate (TMB) into all wells;
- n. Protect the plate from light;
- o. Incubate the plate at room temperature until the desired color intensity is reached; *²
- p. Add 100 µl of the Stop Solution into all wells;
- q. Measure the absorbance at 450nm.

3. Data analysis

- a. Calculation of ELISA cut-off value.

The optical density (OD) of the negative control samples *³ was determined and used to calculate the Cut-off as determined by the formula (13):

$$cut - off = A_{neg} + 2 (SD_{neg})$$

A_{neg} : Average of negative samples

SD_{neg} : standard deviation of negative samples

Use the cut-off to evaluate the diagnostic performance by estimation of sensitivity, specificity, area under the curve at GraphPad Prism (Analyses>Column analyses>Roc Curve).

- b. Index calculation: calculate the index (I) of sample absorbance (Abs) over the value of cut-off, according to the equation:

$$I = \frac{Abs_{450nm}}{cut - off\ value}$$

The results can be classified as follows:

$I < 0.8$: negative

$0.8 \leq I < 1.1$: borderline (indeterminate)

*² As established by the manufacturer, for Scienco TMB we used 30 minutes.

*³ We used n=30 negative samples.

/ ≥ 1.1 : positive

Use conditional formatting in Excel to classify the results.

In the case of an indeterminate result, the sample must be reanalysed. Samples that repeatedly obtain indeterminate results should be retested using an alternative method. If results remain indeterminate, a new sample should be collected in one week.

Acknowledgments

We acknowledge the help of all students, nurses, and clinicians involved in the collection and organization of the samples. We also thank Hospital das Clínicas/UFMG and Hospital Santa Helena for allowing the collection of samples. Last, we thank CT-Vacinas/UFMG for technical support. The study was supported with the following grants: Secretaria de Educação Superior do Ministério da Educação (SESU/MEC) - Grant 04/2020 - Enfrentamento da COVID-19; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Grant APQ-408675/2018-7; Brazilian Ministry of Science, Technology and Innovation (MCTI) - Rede Virus through its many initiatives; Brazilian agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), CNPq and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) - fellowships/scholarships.

Reference

1. C. Eamudomkarn, P. Sithithaworn, C. Kamamia, A. Yakovleva, J. Sithithaworn, S. Kaewke, Techasen, W. Loilome, P. Yongvanit, C. Wangboon, P. Saichua, M. Itoh, J. M. Bethony, Diagnostic performance of urinary IgG antibody detection: A novel approach for population screening of strongyloidiasis. *PLOS ONE* 13, e0192598 (2018).
2. K. Sahni, A. Nagendra, P. Roy, S. Patrikar, Usefulness of enzyme immunoassay (EIA) for screening of anti HIV antibodies in urinary specimens: A comparative analysis. *Med. J. Armed Forces India* 70, 211–214 (2014).
3. S. Vázquez, S. Cabezas, A. B. Pérez, M. Pupo, D. Ruiz, N. Calzada, L. Bernardo, O. Castro, D. González, T. Serrano, A. Sanchez, M. G. Guzmán, Kinetics of antibodies in sera, saliva, and urine samples from adult patients with primary or secondary dengue 3 virus infections. *Int. J. Infect. Dis.* 11, 256–262 (2017).
4. S. A. Ejazi, P. Bhattacharya, M. A. Bakhtey, A. A. Mumtaz, K. Pandey, V. N. Das, P. Das, M. Rahaman, R. P. Goswami, N. Ali, Noninvasive diagnosis of visceral leishmaniasis: Development and evaluation of two urine-based immunoassays for detection of *Leishmania donovani* infection in India. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 10, e0005035 (2016).
5. M. S. Joshi, S. D. Chitambar, V. A. Arankall, M. S. Chadha, Evaluation of urine as a clinical specimen for diagnosis of hepatitis A. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 840–845 (2002).
6. M. Itoh, N. Ohta, T. Kanazawa, Y. Nakajima, M. Sho, M. Minai, Z. Daren, Y. Chen, H. He, Y. K. He, Z. Zhong, Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay with urine samples: A tool for surveillance of schistosomiasis japonica. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 34, 469–472 (2003).

7. X. G. Qiu, F. Nakamura-Uchiyama, Y. Nawa, M. Itoh, A tool for mass-screening of paragonimiasis: An enzyme-linked immunosorbent assay with urine samples. *Trop. Med. Health.* 44, 19 (2016).
8. Y. Gong, Q. Li, Y. Yuan, Accuracy of testing for anti-*Helicobacter pylori* IgG in urine for *H. pylori* infection diagnosis: A systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* 7, e013248 (2017).
9. S. Asfaram, S. Hosseini Teshnizi, M. Fakhar, E. S. Banimostafavi, M. Soosaraei, Is urine a reliable clinical sample for the diagnosis of human visceral leishmaniasis? A systematic review and meta-analysis. *Parasitol. Int.* 67, 575–583 (2018).
10. S. A. Ejazi, A. Bhattacharyya, S. T. Choudhury, S. Ghosh, A. Sabur, K. Pandey, V. N. R. Das, P. Das, M. Rahaman, R. P. Goswami, N. Ali, Immunoproteomic identification and characterization of *Leishmania* membrane proteins as non-invasive diagnostic candidates for clinical visceral leishmaniasis. *Sci. Rep.* 8, 12110 (2018)
11. Bagno, F.F.; Andrade, L.A.F.; Sérgio, S.A.R.; Parise, P.L.; Toledo-Teixeira, D.A.; Gazzinelli, R.T.; Fernandes, A.P.S.M.; Teixeira, S.M.R.; Granja, F.; Proença-Módena, J.L.; da Fonseca, F.G. Previous Infection with SARS-CoV-2 Correlates with Increased Protective Humoral Responses after a Single Dose of an Inactivated COVID-19 Vaccine. *Viruses* **2022**, *14*, 510. <https://doi.org/10.3390/v14030510>
12. García-Montero, C.; Fraile-Martínez, O.; Bravo, C.; Torres-Carranza, D.; Sanchez-Trujillo, L.; Gómez-Lahoz, A.M.; Guijarro, L.G.; García-Hondurilla, N.; Asúnsolo, A.; Bujan, J.; et al. An Updated Review of SARS-CoV-2 Vaccines and the Importance of Effective Vaccination Programs in Pandemic Times. *Vaccines* **2021**, *9*, 433. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
13. Findlay JW, Smith WC, Lee JW, Nordblom GD, Das I, DeSilva BS, Khan MN, Bowsher RR. Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *J Pharm Biomed Anal.* 2000 Jan;21(6):1249-73. doi: 10.1016/S0731-7085(99)00244-7. PMID: 10708409.

11.5. ANEXO 5. Artigo 3 – *The Science Breaker*



December 22, 2022

Microbiology

The needle-free detection of SARS-CoV-2-specific antibodies from urine

by **Fernanda Fonseca Ramos**¹ | Postdoctoral Research Fellow; **Eduardo Antônio Ferraz Coelho**¹ | Professor; **Fernanda Ludolf**¹ | Postdoctoral Research Fellow

¹: Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

This Break was edited by Isa Ozdemir, Senior Scientific Editor -TheScienceBreaker

ABSTRACT

Recently, we developed a new way to identify SARS-CoV-2 antibodies without blood samples and needles. The assay detects these specific antibodies using urine instead of blood samples. Thus, people unable to perform blood puncture will be able to benefit from the possibility of checking for the presence of anti-SARS-CoV-2 antibody produced after a recent infection without any need for a needle.



Image credits: Pexels.com

While serological tests are not intended to diagnose an acute SARS-CoV-2 (COVID-19) infection, they can indicate the presence of antibodies generated from previous viral exposure or vaccination. Several diagnostic kits to assess the presence of SARS-CoV-2 antibodies are available on the market, all using

blood/serum as a sample. Although considered minimally invasive, blood collection can be unpleasant due to the needle used, difficult to execute in some physical circumstances, and challenging in areas with limited healthcare resources, differently from the urine that humans naturally expel. The presence of

antibodies in the urine has been poorly studied and understood. It is probably why researchers and R&D worldwide have not chosen to investigate urine for COVID-19 until now. However, the few relevant scientific publications for other infectious diseases have shown the plausibility of urine for searching for antibodies, inspiring, and motivating us to translate this idea to COVID-19. We developed the test based on the quantitative and qualitative evaluation of the presence of antibodies for ~95 samples in a single test plate. The study analyzed 209 urine samples, collected between 2 to 60 days post symptoms, from patients with SARS-CoV-2 infection confirmed by PCR (Polymerase Chain Reaction). Thirty negative samples were collected before the COVID-19 pandemic or from people who maintained rigorous quarantine.

The urine-based analysis demonstrated a specificity of 100%, meaning no false-positive results, and a sensitivity of 94%, meaning that of every 100 people who had been infected with the new coronavirus, 94 were identified. We compared paired serum samples

from the same patients using a previously validated serum test demonstrating 100% specificity and 88% sensitivity.

By using this test, it is possible to distinguish the antibodies generated by the spike protein of the COVID-19 mRNA vaccines from other proteins of the virus. Thus, our test can still detect antibodies upon infection even in a vaccinated person who misses the opportunity of being tested for the active COVID-19 by PCR or antigen.

Our study presents a proof-of-concept that eliminates the necessity of needles for antibody assessments for COVID-19, as well as for other diseases in the future. As many more people will not be afraid of testing for antibodies, this could have a beneficial effect on an individual and population level. Also, urine samples collected in any period of the day could be used, not only the first-morning sample. Let's focus on the use of needles for what's most matters, vaccination!

11.6. ANEXO 6. Artigo 4 – Em submissão

Manuscript

[Click here to view linked References](#) ✱

1 **Association of urine-based ELISA and recombinant non-glycosylated SARS-CoV-2 Spike**
 2 **protein as a convenient strategy to assess for the presence of anti-SARS-CoV-2 Spike antibodies**
 3 Fernanda F. Ramos¹, Flavia F. Bagno², Paula F. Vassallo³, Joao A. Oliveira-da-Silva¹, Thiago A. R.
 4 Reis¹, Raquel S. Bandeira¹, Amanda S. Machado¹, Daniela P. Lage^{1,4}, Vivian T. Martins¹, Ana P.S.M.
 5 Fernandes^{2,5}, Myron Christodoulides⁶, Cecilia G. Ravetti⁷, Vandack Nobre^{1,7}, Flavio G. Fonseca^{2,8},
 6 Eduardo A.F. Coelho^{1,4}, Fernanda Ludolf^{1*}

7

8 ¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade
 9 de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 30130-100, Minas Gerais,
 10 Brazil.

11 ² Centro de Tecnologia de Vacinas (CT Vacinas), BH-Tec, UFMG. Belo Horizonte, MG, Brazil.

12 ³ Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Prof. Alfredo Balena, 110,
 13 Santa Efigênia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 30.130-100, Minas Gerais,
 14 Brazil.

15 ⁴ Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo
 16 Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil.

17 ⁵ Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal
 18 de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas Gerais, Brazil

19 ⁶ Neisseria Research Group, Molecular Microbiology, School of Clinical and Experimental Sciences,
 20 University of Southampton Faculty of Medicine, Southampton General Hospital; Southampton,
 21 England, SO16 6YD.

22 ⁷ Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Avenida Prof. Alfredo Balena, 190,
 23 Centro, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 30.130-100, Minas Gerais, Brazil.

24 ⁸ Laboratório de Virologia Molecular e Aplicada, Departamento de Microbiologia, Instituto de
 25 Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Minas
 26 Gerais, Brazil.

27 **#Corresponding author:**

28 Dra. Fernanda Ludolf. Laboratório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:
 29 Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais,
 30 Avenida Prof. Alfredo Balena, 190, 30.130-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Phone
 31 number: +55 31 3409 4983

32 E-mail addresses: feludolf@gmail.com

33

34 **Summary**

35 Serological assays have been widely used to detect anti-SARS-CoV-2 antibodies, which are generated
36 from previous exposure to the virus or after vaccination. The presence of anti-SARS-CoV-2
37 Nucleocapsid (N) antibodies was recently reported in patients' urine using a urine-based ELISA-
38 platform, allowing new possibilities for a more comfortable and easy way to collect clinical samples
39 and assess immune conversion. In the current study, we evaluated and validated an *in house* urine-
40 based ELISA for the detection of anti-SARS-CoV-2 Spike (S) antibodies. Recombinant SARS-CoV-
41 2 partial S protein expressed in a eukaryotic system and rSARS-CoV-2 S protein subunits (S1 and
42 RBD) expressed in a prokaryotic system were tested in an ELISA platform against a panel composed
43 by over 146 urine and paired serum samples from 109 patients with SARS-CoV-2 confirmed qRT-
44 PCR. Anti-SARS-CoV-2 S antibodies were detected in the urine samples and, unexpectedly,
45 exclusively for the urine-based assay, glycosylation of the rSARS-CoV-2 S protein was not a critical
46 requirement to obtain high serology accuracy. In conclusion, the association of the use of urine-based
47 ELISA assay and rSARS-CoV-2 S protein (S1 and RBD) expressed in prokaryotic system could be
48 considered as a convenient strategy for screening for the presence of anti-SARS-CoV-2 S antibodies,
49 overcoming the difficulties arising from the sample collection and production of glycosylated
50 proteins.

51

52 **Keywords:** SARS-CoV-2; immunodiagnostic; COVID-19; urine; antibody; spike (S) protein,
53 glycosylation.

54

55

56

57

58

59

60 Introduction

61 On 11 March 2020 the outbreak of coronavirus disease (COVID-19) caused by SARS-CoV-
 62 2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Corona Virus-2) was characterized as a pandemic (1). *In vitro*
 63 diagnostics (IVDs) of assured, quality, safety and performance were considered a critical component
 64 of an overall strategy to control the pandemic. IVDs for COVID-19 fall into two main categories: the
 65 direct detection of SARS-CoV-2 virus (RNA or protein) and indirect serological detection of anti-
 66 SARS-CoV-2 antibodies produced by the host's immune system (2,3,4,5).

67 While serological tests should not be used for diagnosing an acute SARS-CoV-2 infection,
 68 they may indicate the presence of antibodies generated from a previous viral exposure or to
 69 vaccination. The presence of anti-SARS-CoV-2 antibodies has still not been recommended as a
 70 criterion to assess protection (6). Today, serological results depend on the diversity of vaccines
 71 licensed in each country and the type of used antigen in the immunological tests, i.e. SARS-CoV-2
 72 Nucleocapsid (N) and/or Spike (S) proteins, which may indicate antibodies from previous infection
 73 and/or vaccination (6,7). As an antibody response to infection takes days to weeks to be detected
 74 reliably, serological assays have been more relevant for patients presenting for medical care with late-
 75 complications of illness and confirming persistent symptoms caused by long-COVID (8,9).

76 Although considered minimally invasive and with a low rate of complication, venipuncture
 77 blood collection can be (i) unpleasant, especially for those who suffer with aichmophobia (fear of
 78 sharp objects), (ii) difficult to perform in some physical circumstances, and (iii) challenging in areas
 79 with limited and inaccessible healthcare resources (10,11). Urine-based tests to detect antibodies have
 80 been suggested as a non-invasive, simple and safe alternative to diagnose several infectious diseases,
 81 including COVID-19 (12,13,14,15,16,17,18). Recently, a urine based-ELISA assay able to detect
 82 anti-SARS-CoV-2 N antibodies was developed and validated, with calculated sensitivity of 94% and
 83 specificity of 100% after testing a collection of 209 samples from COVID-19 patients. This
 84 performance was comparable to a serum-based ELISA with the paired patient sera (12). Compared
 85 to sera, urine collection for the purposes of detecting specific antibodies is simpler and the samples
 86 easier to store and, therefore, could be convenient for clinical and epidemiological studies (17).

87 The development of a urine-based SARS-CoV-2 S protein ELISA may be also viable and
 88 important to cover other applications of serological tests such as the detection of vaccine-induced
 89 antibodies (12). The Spike protein is a large (~140 kDa) transmembrane glycoprotein containing two
 90 subunits, S1 and S2. The S protein is located on the surface of the virus and has been reported to be
 91 highly immunogenic. The high cost and limited production of full-length S protein pose considerable
 92 technical challenges. S1 contains mainly a Receptor Binding Domain (RBD), which mediates viral
 93 interaction with the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptor on the host cell. Both the S1
 94 subunit and its RBD domain are the main antigens used for serological tests with regards to the S

protein. It has also been reported that S1 exhibits less background and cross-reactivity than using full-length S protein, which may be due to the lower similarity of the S1 subunit among the human coronaviruses compared to S2 (19,20,21,22).

Selecting suitable SARS-CoV-2 recombinant proteins is essential for developing a reliable serological test. SARS-CoV-2 N protein can be efficiently expressed through a prokaryotic system and maintain good immunoreactivity. However, the transmembrane surface glycoprotein S protein has been expressed preferentially in eukaryotic systems, which often generate post-translational modifications on the antigen (23,24). In terms of antigen-scale production, prokaryotic systems have advantages over eukaryotic systems, such as faster, easier and higher productivity rates and significantly reduced costs. These advantages make such systems useful especially in developing countries and in large-scale epidemiological investigations (23,25).

In the current study, we tested the hypothesis that SARS-CoV-2 S proteins expressed in both eukaryotic and prokaryotic systems could be used to detect the presence of anti-SARS-CoV-2 S antibodies in urine samples of individuals who had tested positive for SARS-CoV-2 by qRT-PCR assay. The association of the use of urine-based ELISA and Spike proteins (S1 and RBD) expressed in a prokaryotic system could be a convenient strategy for screening the population for the presence of anti-Spike protein antibodies, overcoming the difficulties arising from the sample collection and the production of glycosylated proteins.

Material and Methods

Research subjects and biological samples

This study was approved by the Human Research Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais (UFMG; Belo Horizonte, Brazil) under protocol number CAAE 30437020.9.0000.5149. Patients presenting with respiratory symptoms and seeking hospital assistance were assessed by the attending physician and included in this study after confirmation of SARS-CoV-2 infection with a positive qRT-PCR. Hospitalized patients (n=107) were enrolled at the Hospital das Clínicas of UFMG and Hospital Santa Helena (Betim, Brazil). Non-hospitalized individuals (n=2) who experienced mild COVID-19 symptoms and tested positive for SARS-CoV-2 by qRT-PCR were also included in this study and were enrolled via an active search in the general population (Belo Horizonte, Brazil).

Urine and paired serum samples from hospitalized patients were collected on the first day of inclusion and whenever possible, on days 1, 3, 7 and 14 post-recruitment, thus varying the corresponding day Post Symptom Onset (PSO) for each patient. Urine and paired serum samples from non-hospitalized individuals, who tested positive for SARS-CoV-2 infection by qRT-PCR were collected after around 20 days PSO. Samples collected before 2019 were considered truly negative and called “pre-COVID-

130 19 negative". Samples from individuals who had maintained a rigorous quarantine and did not show
 131 any symptoms were considered theoretically negative and called "post-COVID-19 negative". Both
 132 sample sets were used as negative controls. The total number of urine samples used herein was 144
 133 hospitalized and 2 non-hospitalized, and 19 pre- and 12 post-COVID-19 negative, respectively. The
 134 total number of serum samples was of 144 hospitalized and 2 non-hospitalized, and 40 pre-COVID
 135 negative plus 6 post-COVID negative.

136 Urine and serum samples were collected as described by Ludolf *et al.*, (2022) (12). Urine samples
 137 containing 0.1% (w/v) sodium azide were stored at 4°C and serum samples were stored at -20°C until
 138 use.

139 **Production of recombinant SARS-CoV-2 Spike proteins**

140 The S1 subunit and RBD domain regions of the SARS-CoV-2/human/BRA/SP02/2020
 141 (MT126808.1) gene that encodes SARS-CoV-2 Spike (S) protein (QIG55994.1) were cloned into a
 142 prokaryotic expression vector (Genescript®, USA). The pET-24a(+) vectors, containing the inserts
 143 corresponding to the S1 or RBD sequences, were transformed into *Escherichia coli* BL21 strain cells
 144 (DE3), and recombinant protein expression induced with Isopropyl β-D-1-Thiogalactopyranoside
 145 (IPTG; 0.5 mM) for 4 h. Both proteins were purified on a HisTrap HP affinity column connected to
 146 an AKTA system (GE Healthcare, USA), following the manufacturer instructions. A 12.5% (w/v)
 147 SDS-PAGE was done to evaluate the purity of the recombinant protein (Supplementary Figure 1B).
 148 A partial rSARS-CoV-2 S protein antigen (FPZ0540), which was expressed in mammalian Chinese
 149 Hamster Ovary (CHO) cells, was acquired from Fapon Biotech Inc., China. The amino acid sequences
 150 of the recombinant proteins expressed in the prokaryotic system, termed NonGly-S1 and NonGly-
 151 RBD and expressed in the eukaryotic system, termed Gly-S, were compared by alignment to the
 152 whole SARS-CoV-2 Spike protein amino acid sequence (Supplementary Figure 1A).

153 **ELISA**

154 ELISAs were done according to Ludolf *et al* (2022) (12), with few modifications. ELISA 96-well
 155 high binding plates (Costar) were coated with 400 ng/well of rSARS-CoV-2 Spike proteins, NonGly-
 156 S1, NonGly-RBD or Gly-S, diluted in carbonate buffer, pH 9.6 for 18 h at 4°C. The wells were
 157 blocked with a solution of Phosphate Buffered Saline (PBS) containing 0.05% (v/v) Tween 20 (PBS-
 158 T) and 1% (w/v) bovine serum albumin (BSA) for 2 h at 25°C. Then, 100 µL/well of urine (undiluted)
 159 or serum (1/100 dilution in PBS-T) samples were added to the wells and incubated for 1 h or 30 min,
 160 respectively, at 37°C, when they were again washed. With the urine samples, peroxidase-conjugated
 161 anti-human IgG antibody (Invitrogen A18811), 1/10,000 dilution in PBS-T, was added and the plates
 162 incubated for 1 h at 37°C. With the serum samples, the peroxidase-conjugated anti-human IgG
 163 antibody (Fapon) was diluted 1/10,000 and the plates incubated for 30 min at 37°C. Next, the wells
 164 were washed and reactions were developed by addition of TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) for

20 min in the dark. Reactions were stopped by adding 0.5 M H₂SO₄ and the optical density (OD) values were read on a microplate spectrophotometer (Multiskan Go), at λ 450 nm. The *cut-off* values were determined as the mean plus two times the standard deviation of negative samples for each assay. The index (I) value for each sample was calculated using the following equation: $I = (OD_{\lambda 450nm}) / (\text{cut-off})$. The index value was classified as positive above 1.1, indeterminate between 0.8 and 1.1 and negative below 0.8.

Statistical analysis

Data analyses were done using the GraphPad PrismTM program (version 8.0 for Windows). Value distributions (mean $\pm$ SD, as indicated) were obtained for continuous variables, while categorical ones were evaluated as proportions. Receiver-Operator Characteristic (ROC) curves were constructed with the OD values of the positive (SARS-CoV-2 infection) versus negative (pre-COVID-19 and post-COVID negative) samples. The diagnostic performance was evaluated by estimation of sensitivity (Se), specificity (Sp), Area Under the Curve (AUC) and Youden index (J). Confidence intervals (CI) were defined at the 95% confidence level (95%CI). A paired *t*-test was used to compare the distinct groups and *P* < 0.05 values were considered significant. Positive and Negative Predictive Values (PPV and NPV, respectively) were calculated based on the index value, excluding the indeterminate value samples, and using the equation $NPV = \text{true negative} / (\text{false negative} + \text{true negative})$, and $PPV = \text{true positive} / (\text{false positive} + \text{true positive})$.

Results

We customized an *in-house* urine-based ELISA protocol using rSARS-CoV-2 Spike proteins to evaluate the presence of anti-SARS-CoV-2 antibodies in urine samples collected at different days Post Symptom Onset (PSO) from previously confirmed qRT-PCR positive patients. We used the well-established serum-based ELISA (26) to compare accuracy and to validate our data. We evaluated the immunodiagnostic efficacy for COVID-19 of three rSARS-CoV-2 Spike proteins, one expressed in a eukaryotic system, Gly-S, and two expressed in a prokaryotic system, NonGly-S1 and NonGly-RBD. For the analyses, urine and paired-serum samples from qRT-PCR-positive patients were used, as well as unpaired negative samples from pre-COVID-19 and post-COVID-19 individuals.

Evaluation of anti-rSARS-CoV-2 Gly-S antibodies in urine and paired serum samples

ELISA testing showed that 31/44 urine samples, collected from 19 qRT-PCR positive patients on different days PSO, reacted with the rSARS-CoV-2 Gly-S protein with a positive index value of >1.1, whereas 6 samples were classified as “indeterminate” (index values from 0.8 to 1.1) and 7 had a negative index value (<0.8). Only one indeterminate and one positive index values were observed from the 25 negative controls urine samples (Fig. 1A). In parallel, results showed that 30/44 serum samples, collected from 19 qRT-PCR positive patients on different days PSO, reacted with the

200 rSARS-CoV-2 Gly-S protein with a positive index value of >1.1 , whereas 1 sample was classified as
 201 “indeterminate” (index values from 0.8 to 1.1) and 13 samples had a negative index value (<0.8).
 202 Only 2 indeterminate and 2 positive index values were observed from the 31 negative controls serum
 203 samples (Fig. 1A).

204 The individual index (I) value obtained by the OD (optical density)/cut-off ratio were used for
 205 standardization and comparison of the results. Sensitivity and specificity values of 75% and 96%,
 206 respectively, were calculated for urine samples tested in ELISA, as well as 68.18% and 93.55%,
 207 respectively, for serum samples. Comparative diagnostic performance of urine- and serum-based
 208 ELISA for COVID-19, under optimal experimental protocols for each biological specimen, is
 209 presented in Table 1. ROC curves were constructed and showed that the ELISAs had marginally
 210 superior accuracy when urine was tested (AUC 0.9450) compared to serum (AUC 0.8237), but this
 211 was not statistically significant (Fig. 1B and Table 1). PPV and NPV values were calculated based
 212 on the index value, which excluded the indeterminate value samples, and results showed a NPV of
 213 0.767 and PPV of 0.969 for urine and NPV of 0.675 and PPV of 0.939 for serum (Table 2).

214 **Anti- rSARS-CoV-2 Gly-S stratified comparative ELISA using urine and paired serum samples**

215 The comparison of reactive profiles using urine and serum samples against rSARS-CoV-2 Gly-S
 216 protein was demonstrated in a stratified manner, according to PSO days of ≤ 7 days, 8 to 20 days and
 217 ≥ 21 days (Fig. 2). All positive samples are paired and collected on the same day. Up to 7 days PSO,
 218 1/6 urine samples had a positive index value (>1.1), while for serum, 0/6 samples had a positive index
 219 value. In the PSO period of 8 to 20 days, 31/38 urine samples and 30/38 serum samples had a positive
 220 index value. After 21 days PSO, both of the 2 urine and serum samples had a positive index value
 221 (Fig. 2).

222 **Evaluation of anti-rSARS-CoV-2 NonGly-S1 antibodies in urine and paired serum samples**

223 ELISA testing showed that 117/145 urine samples, collected from 109 qRT-PCR positive patients on
 224 different days PSO, reacted with the rSARS-CoV-2 NonGly-S1 protein, showing a positive index
 225 value of >1.1 , whereas 11 samples were classified as “indeterminate” (index values from 0.8 to 1.1)
 226 and 17 had a negative index value (<0.8). Only one indeterminate and one positive index value sample
 227 were observed within the group of 31 negative control urine samples (Fig. 3A). In parallel, results
 228 showed that 83/145 serum samples, collected from 109 qRT-PCR positive patients on different days
 229 PSO, reacted with the rSARS-CoV-2 NonGly-S1 protein, showing a positive index value of >1.1 ,
 230 whereas 19 samples were classified as “indeterminate” (index values from 0.8 to 1.1) and 43 had a
 231 negative index value (<0.8). From the 46 negative control serum samples, 9 had indeterminate and 1
 232 had a positive index value (Fig. 3A).

233 The individual index (I) value obtained by the OD (optical density)/cut-off ratio were used for
 234 standardization and comparison of the results. Sensitivity and specificity values of 81.38% and

96.77%, respectively, were calculated for urine samples tested in ELISA, and 60.69% and 95.65%, respectively, for serum samples. Comparative diagnostic performance of urine- and serum-based ELISA for COVID-19, under optimal experimental protocols for each biological specimen, is presented in Table 1. ROC curves were constructed and showed that the ELISA assays showed marginally superior accuracy when urine was tested (AUC 0.9422) compared to serum (AUC 0.8247), but this was not statistically significant (Fig. 3B and table 1). PPV and NPV values were calculated based on the index value, which excluded the indeterminate value samples, and results showed a NPV of 0.630 and a PPV of 0.992 for urine and a NPV of 0.456 and a PPV of 0.988 for serum (Table 2).

Anti-rSARS-CoV-2 NonGly-S1 stratified comparative ELISA using urine and paired serum samples

Comparison of reactive profiles of urine and serum samples against rSARS-CoV-2 NonGly-S1 protein is demonstrated in a stratified manner according to days PSO of ≤ 7 days, 8 to 20 days and ≥ 21 days (Fig. 4). All positive samples are paired and collected on the same day. Up to 7 days PSO, 10/15 urine samples and 4/15 serum samples had a positive index value (>1.1). In the PSO period of 8 to 20 days, 86/102 urine samples and 62/102 serum samples had a positive index value. After 21 days PSO, 22/26 urine and 19/26 serum samples had a positive index value (Fig 4).

Evaluation of rSARS-CoV-2 NonGly-RBD antibodies in urine and paired serum samples

ELISA testing showed that 130/145 urine samples, collected from 109 qRT-PCR positive patients on different days PSO, reacted with the rSARS-CoV-2 Gly-S protein, showing a positive index value of >1.1 , whereas 9 samples were classified as “indeterminate” (index values from 0.8 to 1.1) and 6 had a negative index value (<0.8). From the 31 negative controls urine samples, 3 had an indeterminate value and there was only one sample with a positive index value (Fig. 5A). In parallel, results showed that 47/145 serum samples, collected from 109 qRT-PCR positive patients on different days PSO, reacted with the rSARS-CoV-2 NonGly-RBD protein, showing a positive index value of >1.1 , whereas 36 samples were classified as “indeterminate” (index values from 0.8 to 1.1) and 62 had a negative index value (<0.8). From the 46 negative controls serum, 10 samples had an indeterminate index and none had a positive index value (Fig. 5A).

The individual index (I) value obtained by the OD (optical density) / cut-off ratio were used for standardization and comparison of the results. Sensitivity and specificity values of 89.66% and 96.77%, respectively, were calculated for urine samples tested in ELISA, as well as 39.31% and 97.83%, respectively, for serum samples. Comparative diagnostic performance of urine- and serum-based ELISA for COVID-19, under optimal experimental protocols for each biological specimen, is presented in Table 1. ROC curves were constructed and showed that the ELISA assays showed marginally superior accuracy when urine was tested (AUC 0.9803) compared to serum (AUC

0.7601), but this was not statistically significant (Fig. 5B and Table 1). PPV and NPV values were calculated based on the index value, which excluded the indeterminate value samples, and results showed a NPV of 0.818 and a PPV of 0.992 for urine and a NPV of 0.367 and a PPV of 1.000 for serum (Table 2).

Anti-rSARS-CoV-2 NonGly-RBD stratified ELISA comparative urine and paired serum samples

Comparison of reactive profiles of urine and serum samples against rSARS-CoV-2 NonGly-RBD protein is demonstrated in a stratified manner according to days PSO of ≤ 7 days, 8 to 20 days and ≥ 21 days (Fig. 6). All positive samples are paired and collected on the same day. Up to 7 days PSO, 12/15 urine samples and 0/15 blood samples had a positive index value (>1.1). In the PSO period of 8 to 20 days, 93/102 urine samples and 47/102 serum samples had a positive index. After 21 days PSO, 23/26 urine and 10/26 serum samples had a positive index value (Fig. 6).

Correlation between the rSARS-CoV-2 NonGly-RBD and rSARS-CoV-2 NonGly-S1 versus rSARS-CoV-2 Gly-S using urine and paired serum samples

Samples from COVID-19 patients ($n=44$) and healthy donors ($n=31$) were used to compare the house produced proteins rSARS-CoV-2 NonGly-RBD and rSARS-CoV-2 NonGly-S1 with the commercial rSARS-CoV-2 Gly-S. Higher correlations were observed when we compared urine-based ELISA indexes ($r=0.7567$ and $r=0.7779$ for rSARS-CoV-2 NonGly-RBD and rSARS-CoV-2 NonGly-S1, respectively) against serum-based ELISA indexes ($r=0.3562$ and $r=0.3981$) (Fig. 7).

Discussion

The presence of anti-SAR-CoV-2 N antibodies was recently reported in urine samples by using an in-house urine-based ELISA platform, by that moment, additional studies are required confirm the presence of anti-SARS-COV-2 S antibodies in patients' urine samples (12). Herein, we confirmed the ability of rSARS-CoV-2 S proteins in discriminating serologically positive COVID-19 patients using an *in-house* urine-based ELISA platform, although with lower sensitivity than when using the rSAR-CoV-2 N protein. Similar sensitivity (75.00% and 68.18%) and specificity (96.00% and 93.55%) values were shown for the urine and paired-serum, respectively, when eukaryotic-expressed rSARS-CoV-2 protein Gly-S, was used. As expected, significantly lower sensitivity (60.69% and 39.31%) and similar specificity (95.65% and 97.83%) values were found when serum samples were used with prokaryotic-expressed rSARS-CoV-2 proteins NonGly-S1 and NonGly-RBD, respectively. However, unexpectedly, we found significant higher sensitivity (81.38% and 89.66%) and specificity (96.77% and 96.77%) when using the prokaryote-expressed SARS-CoV-2 proteins NonGly-S1 and NonGly-RBD, respectively, in the urine-based ELISA platform. These findings suggest that the association of the use of urine-based ELISA with prokaryote-expressed rSARS-CoV-2 proteins

(NonGly-S1 and NonGly-RBD) could be a convenient strategy for screening large numbers of people for the presence of anti-SARS-CoV-2 S antibodies, overcoming the difficulties and cost arising from the sample collection and the production of protein.

To our knowledge, our study is the first to show the presence of anti-SARS-CoV-2 S antibodies in urine samples, collected on days between 2 and 38 PSO, from COVID-19 qRT-PCR positive patients, using recombinant proteins expressed in either eukaryotic or prokaryotic system. Overall, IgG SARS-CoV-2 antibodies appear to peak at 14–30 days PSO and then to slowly decline for 2–3 months (27,28). Commercial serum-based antibody tests show low accuracy in the early stages of infection, since the patient immune response is still developing (29,30,5,11). This rise in IgG production during the first days PSO was demonstrated recently with an *in-house* SARS-CoV-2 N protein urine-based ELISA (12). Our findings are consistent for the SARS-CoV-2 S protein urine-based ELISA, where most of the false negatives were found in the collection range before the 7th day PSO. Immune conversion of IgG antibodies in urine and serum samples, with an increase in IgG levels along the PSO days, is represented in Supplementary Figure 2 by two of the patients. Although we have worked on the optimization of our ELISA tests, in this study we were not able to achieve sensitivity performance as high as some tests reported in the literature or commercially available (2), most probably because we have included samples with early PSO days collections, i.e. before immune conversion. As speculated before, relatively late IgG response to the S protein compared to the IgG response to the N protein in patients with SARS-CoV-2 might explain the differences in sensitivity achieved (23). This late IgG response might explain also the negative index values obtained for three of the patients with collections on days 26, 27 and 28 PSO, for both samples, urine and serum, and both proteins, rSARS-CoV-2 NoGly-S1 and NonGly-RBD.

The specificity of an immunodiagnostic test for COVID-19 may be estimated by testing samples collected before the emergence of SARS-CoV-2 (2) and before mass vaccination in the case of SARS-CoV-2 S protein. Urine collection has been neglected as a biological specimen, since the use of urine-based immune tests are not usually available. Our study included 19 urine samples collected before the outbreak in 2019 and 12 urine samples collected during 2021 from individuals who maintained a rigorous quarantine regimen and who did not show any symptoms throughout 2020/2021. We suggest that the SARS-CoV-2 S protein was specific for COVID-19 in our urine-based ELISA, since we observed only one false positive for all three proteins from 25, 31 and 31 negative individuals using the rSARS-CoV-2 Gly-S, NoGly-S1 and NonGly-RBD proteins, respectively. However, a limitation of our study is that the urine-based ELISA was not tested with samples obtained from patients with other diseases, including infection with other coronaviruses and, therefore, we cannot rule out the possibility of cross-reactivity. Patients included in this study were not vaccinated at the moment of the sample collection, and in this sense, we can infer that the results

of our urine-based ELISA came from antibodies generated from an exposure to the virus. Future studies could seek to identify vaccine-induced anti-SARS-CoV-2 S antibodies in urine, particularly because most approved vaccines use SARS-CoV-2 S protein to elicit protective immunity. Anti-SARS-CoV-2 S antibodies elicited after COVID-19 and/or immunization with an inactivated vaccine were identified by serum-based ELISA, using the same rSARS-CoV-2 Gly-S protein as used here (26), indicating the potential of identifying vaccine-generated antibodies by our urine-based ELISA. As our understanding of immunity and correlates of protection increases, and the range of immunoassays multiplies, different assays will probably be used to answer specific questions (31). The presence of anti-SARS-CoV-2 antibodies in urine to both S and N proteins (12) opens the door to a more complete platform, where each antigen (separately or together) can address specific questions.

Antigen selection, source, and purity, are crucial parameters for immunoassay development as they determine accuracy, fields of application and mass production. Prokaryotic or eukaryotic expression systems are used to produce recombinant proteins. Prokaryotic systems have great advantages in their production, but the lack of post-translational modification can be a limitation (32). SARS-CoV-2 Spike protein is extensively glycosylated with host-derived glycans at 22 N-linked glycosylation sites and at least two O-glycan sites. The virus acquires glycosylation by appropriating the glycosylation machinery in the host cell reticulum-Golgi intermediate compartments when offspring virions are formed (33). To our knowledge, there is no available serological test or published study on detecting anti-SARS-CoV-2 S antibodies using prokaryotic-expressed rSARS-CoV-2 protein, which is probably due to the influence of post-translational modification for diagnostic performance. Thus, rSARS-CoV-2 Spike protein as a transmembrane surface glycoprotein has been expressed using a eukaryotic expression system, which often retains glycan posttranslational modifications of the antigen, unlike bacterial recombinant proteins- or peptide- based ELISAs (23,34). Our data showed similar qualitative ELISA diagnostic performance for urine (75.00% se) and paired-serum (68.18% se) when the rSARS-CoV-2 Gly-S protein expressed in eukaryotic system was used. Additionally, when we compared the non-glycosylated proteins with the rSARS-CoV-2 Gly-S, higher correlations were observed in urine-based ELISA.

It is noteworthy that the comparative use of paired serum samples as reference was fundamental for this study, as serum-based ELISA is a well-established platform. However, we observed significantly lower sensitivity in serum-based ELISA assays for prokaryote-expressed SARS-CoV-2 S protein (60.69% NonGly-S1 and 39.31% NonGly-RBD, respectively), compared to the eukaryote-expressed SARS-CoV-2 Gly-S protein (82.37%). Thus, confirming that prokaryote-expressed SARS-CoV-2 S protein may be not suitable for detecting anti- SARS-CoV-2 antibodies in serum.

375 Interestingly, we found a higher accuracy for prokaryote-expressed rSARS-CoV-2 proteins
 376 over eukaryote-expressed rSARS-CoV-2 proteins when using a urine-based ELISA. Although we
 377 have proven the applicability of the use of Non-glycosylated SARS-CoV-2 S proteins in ELISA
 378 assays using urine samples, we could not find any explanation in the literature for why this recognition
 379 of non-glycosylated proteins occurs when using urine instead of serum. Thus, our data suggest that
 380 non-glycosylated SARS-CoV-2 S proteins could be used to assay seroconversion, overcoming many
 381 of the problems associated with eukaryotic expression of protein. Until now, protein S glycosylation
 382 appeared to be essential for serological testing, and since the beginning of the pandemic there have
 383 been significant studies dedicated to developing SARS-CoV-2 S protein constructs that allow for
 384 greater recombinant production and protein stability. Different expression systems impact on
 385 glycosylation of the SARS-CoV-2 Spike glycoproteins by the type of attached glycan (35), the
 386 production yields and even variation between batch-to-batch (32,36). Recombinant proteins,
 387 particularly S1, are one of the key reagents used to produce immunoassays for detecting IgG, IgM or
 388 IgA antibodies to SARS-CoV-2. However, expressing S1 protein in the correct conformation is
 389 difficult, and in some cases, the antibodies that recognize the membrane S protein are unable to bind
 390 recombinant S protein (37). In addition, high cost and insufficient capacity to produce enough high-
 391 quality recombinant S1 protein may limit accessibility to the immunoassay in poor or remote regions
 392 around the world (38).

393 The findings from our study could be applied to other diseases that are diagnosed serologically
 394 using pathogen glycosylated antigens. This is especially true for neglected tropical diseases; for
 395 example, disrupting the carbohydrate molecules of the parasitic roundworm *Strongyloides stercoralis*
 396 caused a significant reduction in immunoassay detection. This is consistent with the hypothesis that
 397 specific immune reactivity is reduced when glycosylated epitopes are removed from parasite antigens,
 398 as previously demonstrated in immunoassays with sera from patients infected with *Hemonchus*
 399 *contortus*, *Taenia solium*, *Leishmania spp.* and *S. stercoralis* (39).

400 In summary, our preliminary study suggests that a urine-based ELISA containing prokaryotic-
 401 expressed Spike proteins (S1 and RBD) could provide a convenient strategy for screening large
 402 numbers of people for the presence of Spike protein antibodies, and overcome the difficulties and
 403 costs arising from serum sample collection and the production of recombinant protein with eukaryotic
 404 systems.

406 **Acknowledgements**

407 The authors gratefully acknowledge the help of all students, nurses and clinicians involved in the
 408 collection and organization of the samples. They are also thankful to the Hospital das Clínicas of

UFMG and to the Hospital Santa Helena (Betim, Minas Gerais, Brazil) for allowing this study to be done. We also acknowledge the technical support of CT-Vacinas/RedeVirus.

411

412 **Author Contributions**

413 Conceptualization: FL; Study design: FL, JAOS, PFV, CGR, FGF, VN, EAFC; Technical support:
414 FFB, FGF, APSMF; Execution: FL, FFR, FFB, RSB; Data analysis and interpretation: FL, FFR, FFB,
415 EAFC; Figures: FL, FFR, FFB; Patient recruitment, informed consent form application and sample
416 collection and organization: JAOS, TARR, PFV, CGR, RSB, ASM, DPL, VTM; Funding acquisition
417 and infrastructure: FGF, APSMF, VN, EAFC; Writing—original draft: FL, FFB, MC, EAFC;
418 Writing—review & editing: FL, FFR, FFB, MC, FGF, EAFC; Directly accessed and verified the
419 underlying data reported: FL, FFR, FFB, EAFC

420

421 **Financial support**

422 The study was supported with the following grants: Secretaria de Educação Superior do Ministério
423 da Educação (SESU/MEC) - Grant 04/2020 - Enfrentamento da COVID-19 (VN); Conselho Nacional
424 de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Grant APQ-408675/2018-7 (EC); Brazilian
425 Ministry of Science, Technology and Innovation (MCTI) - Rede Virus thought its many initiatives
426 (FF, APSMF); Brazilian agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
427 (CAPES), CNPq and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) -
428 fellowships/scholarships (FL, FR, FB, JO, TR, RSB, ASM, DPL, VTM).

429

430 **Interest conflicts**

431 A patent application at the Brazilian National Institute of Industrial Property was issued under case
432 number BR 10 2021 014066 6. The authors declare that they have no other competing interests.

433

434 **References**

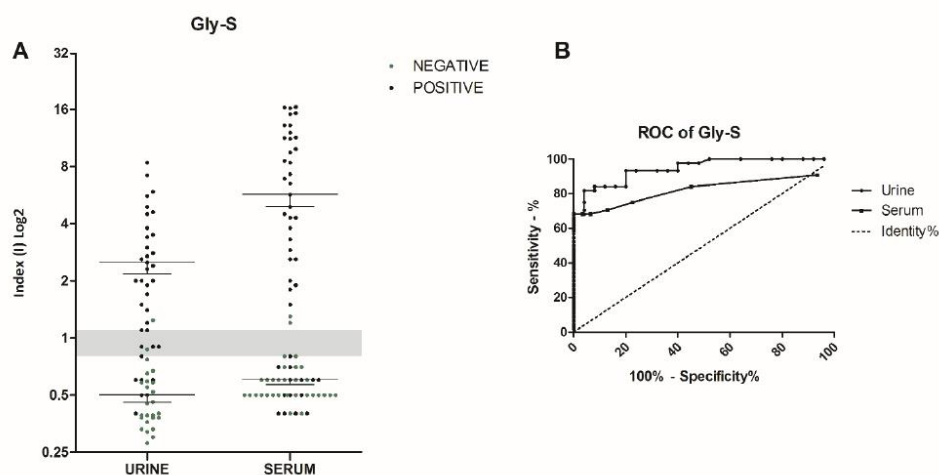
- 435 1. World Health Organization, Coronavirus (COVID-19) dashboard (World Health
436 Organization, 2021); <https://COVID19.who.int/>.
- 437 2. Food and Drug Administration, EUA authorized serology test performance (Food and Drug
438 Administration, 2021); [www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-](https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/eua-authorized-serology-test-performance)
439 [emergency-use-authorizations-medical-devices/eua-authorized-serology-test-performance](https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/eua-authorized-serology-test-performance).
- 440 3. World Health Organization, Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection
441 (World Health Organization, 2021); [www.who.int/publications/i/item/antigen-detection-in-](https://www.who.int/publications/i/item/antigen-detection-in-the-diagnosis-of-sars-cov-2-infection-using-rapid-immunoassays)
442 [the-diagnosis-of-sars-cov-2-infection-using-rapid-immunoassays](https://www.who.int/publications/i/item/antigen-detection-in-the-diagnosis-of-sars-cov-2-infection-using-rapid-immunoassays).
- 443 4. F. Amanat, D. Stadlbauer, S. Strohmeier, T. H. O. Nguyen, V. Chromikova, M. McMahon,
444 K. Jiang, G. A. Arunkumar, D. Jurczyszak, J. Polanco, M. Bermudez-Gonzalez, G. Kleiner,
445 T. Aydililo, L. Miorin, D. S. Fierer, L. A. Lugo, E. M. Kojic, J. Stoeve, S. T. H. Liu, C.
446 Cunningham-Rundles, P. L. Felgner, T. Moran, A. Garcia-Sastre, D. Caplivski, A. C. Cheng,

- 447 K. Kedzierska, O. Vapalahti, J. M. Hepojoki, V. Simon, F. Krammer, A serological assay to
448 detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nat. Med.* 26, 1033–1036 (2020).
- 449 5. Weissleder R, Lee H, Ko J, Pittet MJ. COVID-19 diagnostics in context. *Sci Transl Med.*
450 2020;12(546):eabc1931. doi:10.1126/scitranslmed.abc1931
- 451 6. Food and Drug Administration. 2021. [https://www.fda.gov/medical-devices/safety-](https://www.fda.gov/medical-devices/safety-communications/antibody-testing-not-currently-recommended-assess-immunity-after-covid-19-vaccination-fda-safety)
452 [communications/antibody-testing-not-currently-recommended-assess-immunity-after-covid-](https://www.fda.gov/medical-devices/safety-communications/antibody-testing-not-currently-recommended-assess-immunity-after-covid-19-vaccination-fda-safety)
453 [19-vaccination-fda-safety](https://www.fda.gov/medical-devices/safety-communications/antibody-testing-not-currently-recommended-assess-immunity-after-covid-19-vaccination-fda-safety). Antibody Testing Is Not Currently Recommended to Assess
454 Immunity After COVID-19 Vaccination: FDA Safety Communication. Access on June 2021.
- 455 7. Narasimhan M, Mahimainathan L, Araj E, et al. Clinical Evaluation of the Abbott Alinity
456 SARS-CoV-2 Spike-Specific Quantitative IgG and IgM Assays among Infected, Recovered,
457 and Vaccinated Groups. *J Clin Microbiol.* 2021;59(7):e0038821. doi:10.1128/JCM.00388-21
- 458 8. Matta J, Wiernik E, Robineau O, et al. Association of Self-reported COVID-19 Infection and
459 SARS-CoV-2 Serology Test Results With Persistent Physical Symptoms Among French
460 Adults During the COVID-19 Pandemic [published correction appears in *JAMA Intern Med.*
461 2022 May 1;182(5):1] [published correction appears in *JAMA Intern Med.* 2022 May
462 1;182(5):579]. *JAMA Intern Med.* 2022;182(1):19-25.
463 doi:10.1001/jamainternmed.2021.6454
- 464 9. Robineau O, Wiernik E, Lemogne C, et al. Persistent symptoms after the first wave of
465 COVID-19 in relation to SARS-CoV-2 serology and experience of acute symptoms: A nested
466 survey in a population-based cohort. *Lancet Reg Health Eur.* 2022;17:100363.
467 doi:10.1016/j.lanepe.2022.100363.
- 468 10. World Health Organization, Guidelines on drawing blood: Best practices in phlebotomy
469 (World Health Organization, 2010).
- 470 11. Centers for Disease Control and Prevention, Interim guidelines for COVID-19 antibody
471 testing: Current status of antibody testing in the United States: Antigenic targets (Centers for
472 Disease Control and Prevention, 2021); [www.cdc.gov/coronavirus/2019-](http://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antibody-tests-guidelines.html#anchor_1590280385631)
473 [ncov/lab/resources/antibody-tests-guidelines.html#anchor_1590280385631](http://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antibody-tests-guidelines.html#anchor_1590280385631).
- 474 12. Ludolf F, Ramos FF, Bagno FF, et al. Detecting anti-SARS-CoV-2 antibodies in urine
475 samples: A noninvasive and sensitive way to assay COVID-19 immune conversion. *Sci Adv.*
476 2022;8(19):eabn7424. doi:10.1126/sciadv.abn7424.
- 477 13. Nagaoka F, Yamazaki T, Akashi-Takamura S, Itoh M. Detection of Urinary Antibodies and
478 Its Application in Epidemiological Studies for Parasitic Diseases. *Vaccines (Basel).*
479 2021;9(7):778. Published 2021 Jul 12. doi:10.3390/vaccines9070778.
- 480 14. Alemohammad MM, Foley TJ, Cohen H. Detection of immunoglobulin G antibodies to
481 *Helicobacter pylori* in urine by an enzyme immunoassay method. *J Clin Microbiol.*
482 1993;31(8):2174-2177. doi:10.1128/jcm.31.8.2174-2177.1993.
- 483 15. Joshi MS, Chitambar SD, Arankalle VA, Chadha MS. Evaluation of urine as a clinical
484 specimen for diagnosis of hepatitis a. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9(4):840-845.
485 doi:10.1128/cdli.9.4.840-845.2002.
- 486 16. Vázquez S, Cabezas S, Pérez AB, et al. Kinetics of antibodies in sera, saliva, and urine
487 samples from adult patients with primary or secondary dengue 3 virus infections. *Int J Infect*
488 *Dis.* 2007;11(3):256-262. doi:10.1016/j.ijid.2006.05.005.
- 489 17. Eamudomkarn C, Sithithaworn P, Kamamia C, et al. Diagnostic performance of urinary IgG
490 antibody detection: A novel approach for population screening of strongyloidiasis. *PLoS One.*
491 2018;13(7):e0192598. Published 2018 Jul 9. doi:10.1371/journal.pone.0192598.
- 492 18. Sahni AK, Nagendra A, Roy P, Patrikar S. Usefulness of enzyme immunoassay (EIA) for
493 screening of anti HIV antibodies in urinary specimens: A comparative analysis. *Med J Armed*
494 *Forces India.* 2014;70(3):211-214. doi:10.1016/j.mjafi.2013.10.011.
- 495 19. Li Y, Lai DY, Lei Q, et al. Systematic evaluation of IgG responses to SARS-CoV-2 spike
496 protein-derived peptides for monitoring COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol.*
497 2021;18(3):621-631. doi:10.1038/s41423-020-00612-5

- 498 20. Krähling V, Halwe S, Rohde C, et al. Development and characterization of an indirect ELISA
499 to detect SARS-CoV-2 spike protein-specific antibodies. *J Immunol Methods*.
500 2021;490:112958. doi:10.1016/j.jim.2021.112958.
- 501 21. Okba NMA, Müller MA, Li W, et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-
502 Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients. *Emerg Infect Dis*.
503 2020;26(7):1478-1488. doi:10.3201/eid2607.200841.
- 504 22. Tian Y, Lian C, Chen Y, et al. Sensitivity and specificity of SARS-CoV-2 S1 subunit in
505 COVID-19 serology assays. *Cell Discov*. 2020;6:75. Published 2020 Oct 27.
506 doi:10.1038/s41421-020-00224-3.
- 507 23. Li D, Li J. Immunologic Testing for SARS-CoV-2 Infection from the Antigen Perspective. *J*
508 *Clin Microbiol*. 2021;59(5):e02160-20. Published 2021 Apr 20. doi:10.1128/JCM.02160-20
- 509 24. Zhang P, Gao Q, Wang T, et al. Development and evaluation of a serological test for diagnosis
510 of COVID-19 with selected recombinant spike proteins. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.
511 2021;40(5):921-928. doi:10.1007/s10096-020-04102-4.
- 512 25. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and
513 challenges. *Front Microbiol*. 2014;5:172. Published 2014 Apr 17.
514 doi:10.3389/fmicb.2014.00172.
- 515 26. Bagno FF, Andrade LAF, Sérgio SAR, et al. Previous Infection with SARS-CoV-2 Correlates
516 with Increased Protective Humoral Responses after a Single Dose of an Inactivated COVID-
517 19 Vaccine. *Viruses*. 2022;14(3):510. Published 2022 Mar 2. doi:10.3390/v14030510.
- 518 27. Prévost J, Gasser R, Beaudoin-Bussi  res G, et al. Cross-Sectional Evaluation of Humoral
519 Responses against SARS-CoV-2 Spike. *Cell Rep Med*. 2020;1(7):100126.
520 doi:10.1016/j.xcrm.2020.100126.
- 521 28. West R, Kobokovich A, Connell N, Gronvall GK. COVID-19 Antibody Tests: A Valuable
522 Public Health Tool with Limited Relevance to Individuals. *Trends Microbiol*.
523 2021;29(3):214-223. doi:10.1016/j.tim.2020.11.002.
- 524 29. Long QX, Liu BZ, Deng HJ, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with
525 COVID-19. *Nat Med*. 2020;26(6):845-848. doi:10.1038/s41591-020-0897-1.
- 526 30. Huang AT, Garcia-Carreras B, Hitchings MDT, et al. A systematic review of antibody
527 mediated immunity to coronaviruses: kinetics, correlates of protection, and association with
528 severity. *Nat Commun*. 2020;11(1):4704. Published 2020 Sep 17. doi:10.1038/s41467-020-
529 18450-4.
- 530 31. Houlihan CF, Beale R. The complexities of SARS-CoV-2 serology. *Lancet Infect Dis*.
531 2020;20(12):1350-1351. doi:10.1016/S1473-3099(20)30699-X
- 532 32. Klausberger M, Duerkop M, Haslacher H, et al. A comprehensive antigen production and
533 characterisation study for easy-to-implement, specific and quantitative SARS-CoV-2
534 serotests. *EBioMedicine*. 2021;67:103348. doi:10.1016/j.ebiom.2021.103348.
- 535 33. Watanabe Y, Allen JD, Wrapp D, McLellan JS, Crispin M. Site-specific glycan analysis of
536 the SARS-CoV-2 spike. *Science*. 2020;369(6501):330-333. doi:10.1126/science.abb9983
- 537 34. Zhang P, Gao Q, Wang T, et al. Development and evaluation of a serological test for diagnosis
538 of COVID-19 with selected recombinant spike proteins. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.
539 2021;40(5):921-928. doi:10.1007/s10096-020-04102-4
- 540 35. Wang Y, Wu Z, Hu W, Hao P, Yang S. Impact of Expressing Cells on Glycosylation and
541 Glycan of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *ACS Omega*. 2021;6(24):15988-15999.
542 Published 2021 Jun 11. doi:10.1021/acsomega.1c01785
- 543 36. Reis CA, Tauber R, Blanchard V. Glycosylation is a key in SARS-CoV-2 infection. *J Mol*
544 *Med (Berl)*. 2021;99(8):1023-1031. doi:10.1007/s00109-021-02092-0.
- 545 37. Wan J, Xing S, Ding L, et al. Human-IgG-Neutralizing Monoclonal Antibodies Block the
546 SARS-CoV-2 Infection. *Cell Rep*. 2020;32(3):107918. doi:10.1016/j.celrep.2020.107918
- 547 38. Yang Y, Yang M, Yuan J, et al. Laboratory Diagnosis and Monitoring the Viral Shedding of
548 SARS-CoV-2 Infection. *Innovation (Camb)*. 2020;1(3):100061.
549 doi:10.1016/j.xinn.2020.100061.

- 550 39. Inês Ede J, Silva ML, Souza JN, Teixeira MC, Soares NM. The role of glycosylated epitopes
551 in the serodiagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*.
552 2013;76(1):31-35. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.01.016
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566

567 **FIGURE AND TABLE LEGENDS**
 568



569 **Figure 1. Comparative diagnostic performance of using rSARS-CoV-2 Gly-S protein with**
 570 **patient urine and serum samples.**

572 **A** ELISA assays were done using positive samples (n=44 urine and n=44 serum) from COVID-19
 573 patients with positive qRT-PCR and negative samples (n=25 urine and n=31 serum). The mean of
 574 each group is shown and the gray band indicates indeterminate values for each sample, while index
 575 values below the range (<0.8) are negative and values above (>1.1) are considered positive.

576 **B** Receiver Operating Characteristic (ROC) curves were constructed using the individual index (I)
 577 value for each sample, in order to obtain the sensitivity, specificity and area under the curve.

578
 579

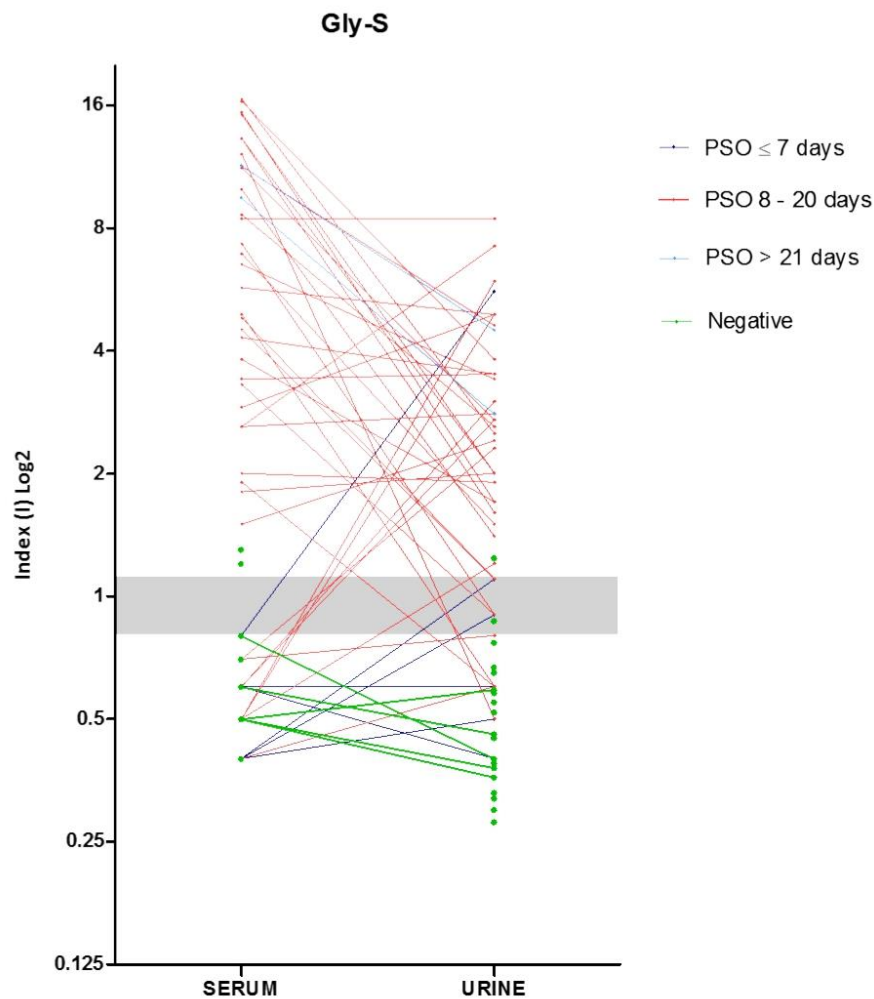


Figure 2. Evaluation of comparative urine and serum index values (I) for each patient according to the days Post-Symptoms Onset (PSO) by using rSARS-CoV-2 Gly-S protein.

The index values obtained from urine and serum samples for each patient are represented by circles and when paired they are interconnected by lines, each color being specific to the collection period after the onset of symptoms. Individual data were divided according to the PSO days of the collection date, i.e. at ≤ 7 days, 8 to 20 days and ≥ 21 days.

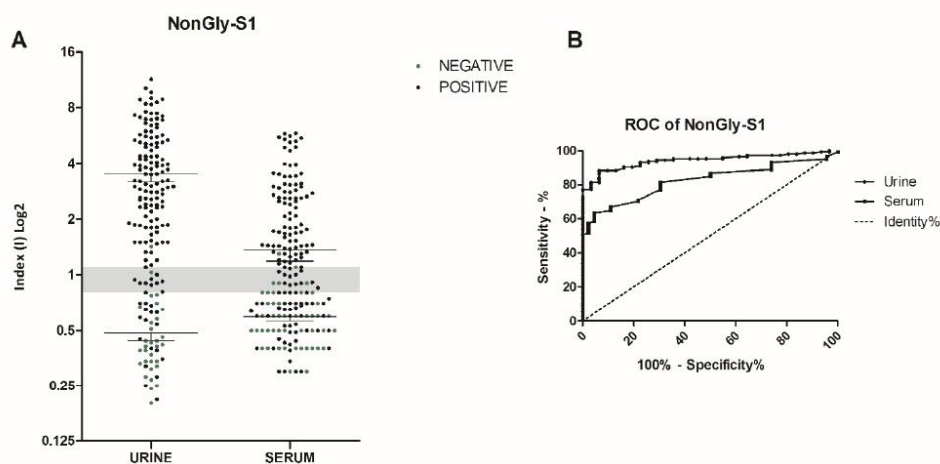


Figure 3. Comparative diagnostic performance of using rSARS-CoV-2 NonGly-S1 protein with patient urine and serum samples.

A ELISA assays were done using positive samples (n=145 urine and n=145 serum) from COVID-19 patients with positive qRT-PCR and negative samples (n=31 urine and n=46 serum). The mean of each group is shown and the gray band indicates indeterminate values for each sample, while index values below the range (<0.8) are negative and values above (>1.1) are considered positive.

B Receiver Operating Characteristic (ROC) curves were constructed using the individual index (I) value for each sample, in order to obtain the sensitivity, specificity and area under the curve

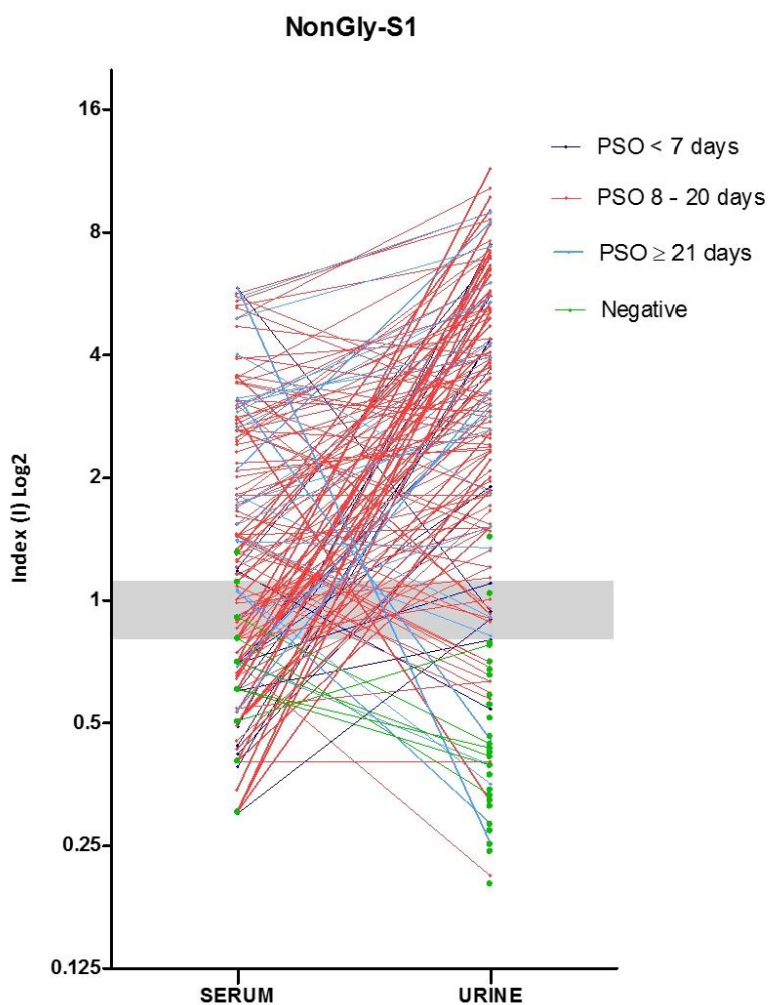


Figure 4.

Evaluation of comparative urine and serum index values (I) for each patient according to the days post-symptoms onset (PSO) by using rSARS-CoV-2 NonGly-S1 protein.

The index values obtained from urine and serum samples for each patient are represented by circles and when paired they are interconnected by lines, each color being specific to the collection period after the onset of symptoms. Individual data were divided according to the PSO days of the collection date, i.e. at ≤ 7 days, 8 to 20 days and ≥ 21 days.

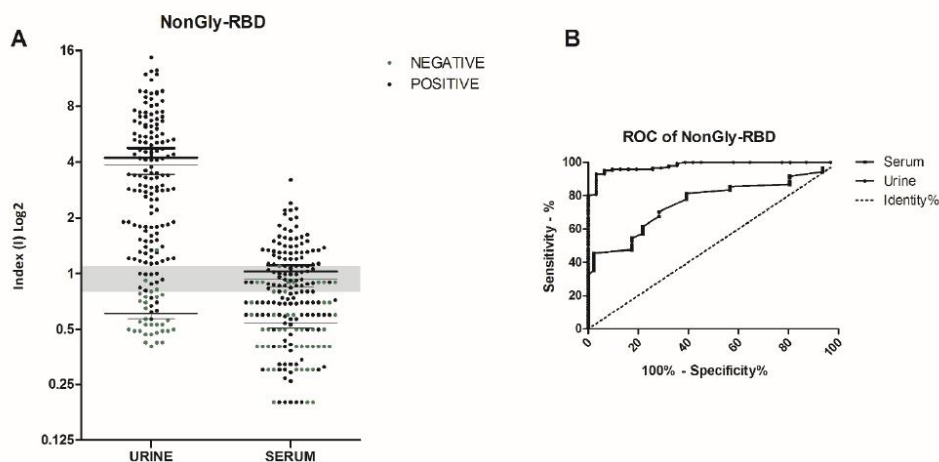
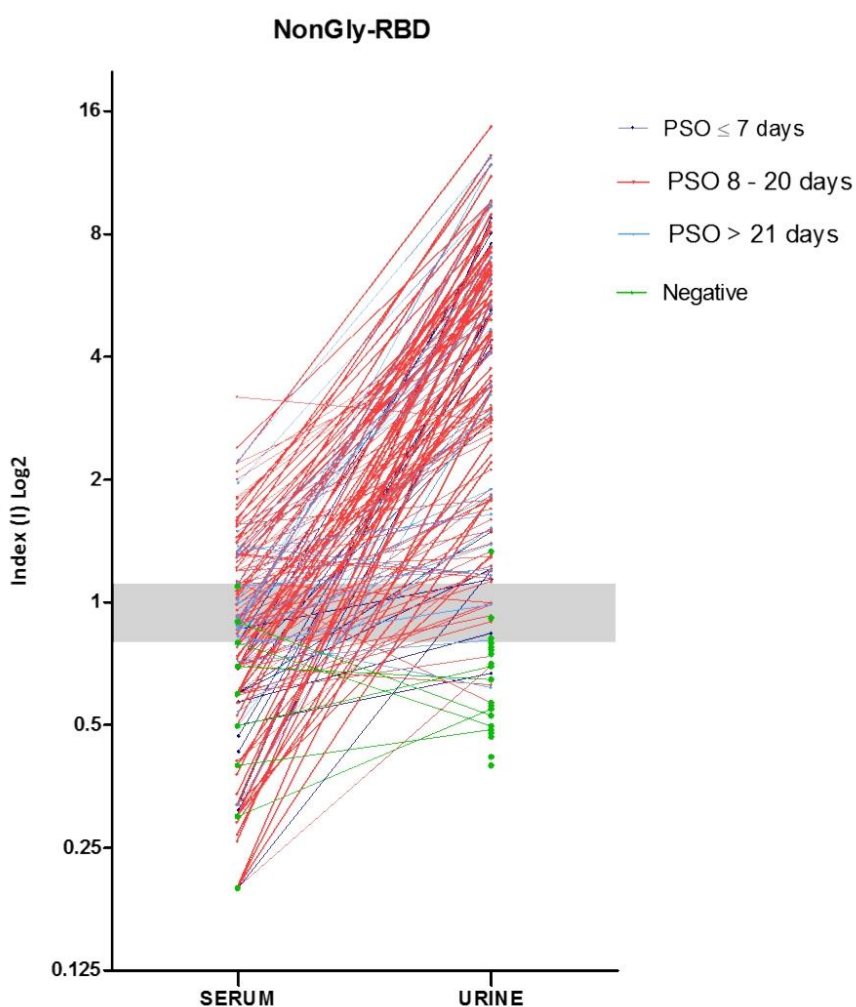


Figure 5. Comparative diagnostic performance of using rSARS-CoV-2 NonGly-RBD protein with patient urine and serum samples.

A ELISA assays were done using positive samples (n=145 urine and n=145 serum) from COVID-19 patients with positive qRT-PCR and negative samples (n=31 urine and n=46 serum). The mean of each group is shown and the gray band indicates indeterminate values for each sample, while index values below the range (<0.8) are negative and values above (>1.1) are considered positive.

B Receiver Operating Characteristic (ROC) curves were constructed using the individual index (I) value for each sample, in order to obtain the sensitivity, specificity and area under the curve.



Figure

6. Evaluation of comparative urine and serum index values (I) of each patient according to the days post-symptoms onset (PSO) by using rSARS-CoV-2 NonGly-RBD protein.

The index values obtained from urine and serum samples for each patient are represented by circles and when paired they are interconnected by lines, each color being specific to the collection period after the onset of symptoms. Individual data were divided according to the PSO days of the collection date, i.e. at ≤ 7 days, 8 to 20 days and ≥ 21 days.

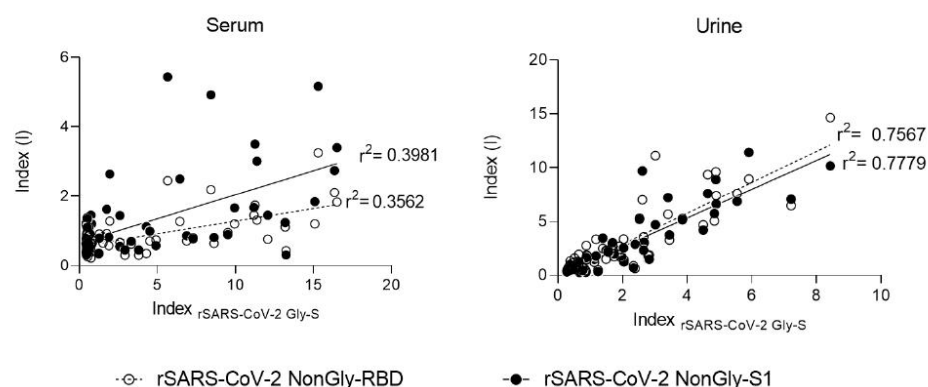


Figure 7: Correlations between the rSARS-CoV-2 NonGly-RBD and NonGly-S1 versus Gly-S proteins using serum and urine samples. Samples (n=75) were collected from COVID-19 patients (n=44) and healthy donors (n=31) and used to compare the in house produced - non-glycosylated proteins rSARS-CoV-2 NonGly-RBD (white) and rSARS-CoV-2 NonGly-S1 (black) with the commercial glycosylated protein.

Tables

Table 1. Comparative table of the results obtained from the diagnostic test for COVID-19 based on the search for specific IgG antibodies in urine and serum.

rSARS-CoV-2 Antigen	Sample	n	AUC	p-value	Cut-off	Se	95%CI	Sp	95%CI	J
Gly-S	URINE	+ 44 - 25	0,9450	< 0.0001	> 1.000	75,00	59.66% to 86.81%	96,00	79.65% to 99.90%	0,71
	SERUM	+ 44 - 31	0,8237	< 0.0001	> 1.000	68,18	52.42% to 81.39%	93,55	78.58% to 99.21%	0,62
NonGly-S1	URINE	+ 145 - 30	0,9422	< 0.0001	> 1.065	81,38	74.08% to 87.36%	96,77	83.30% to 99.92%	0,78
	SERUM	+ 145 - 46	0,8247	< 0.0001	> 1.020	60,69	52.24% to 68.69%	95,65	85.16% to 99.47%	0,56
NonGly-RBD	URINE	+ 145 - 30	0,9803	< 0.0001	> 1.065	89,66	83.51% to 94.09%	96,77	83.30% to 99.92%	0,86
	SERUM	+ 145 - 46	0,7601	< 0.0001	> 1.010	39,31	31.31% to 47.76%	97,83	88.47% to 99.94%	0,37

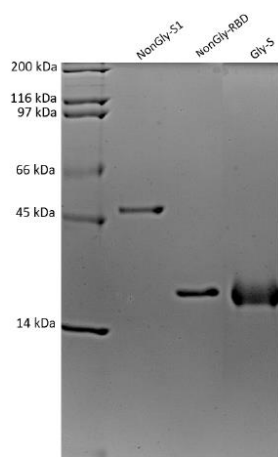
Samples from symptomatic patients for Covid-19 and with PCR + for SARS-COV-2, as well as from healthy individuals pre-exposed to the virus were used. The individual index (I) value obtained by the $Abs / cut-off$ ratio were used in the construction of ROC curves. The diagnostic performance of the antigen in relation to the type of sample used was based on the evaluation of sensitivity (95% CI), specificity (95% CI), area on the curve (AUC) and Youden index (J). Legend: $J = (Se+Sp) - 1$; n = samples number; + = positive sample; - = negative sample.

Table 2. Predictive positive and predictive negative values of rSARS-CoV-2 proteins for urine and serum samples.

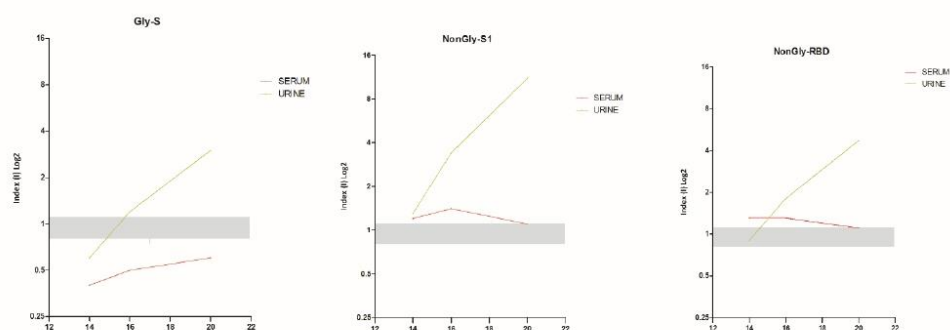
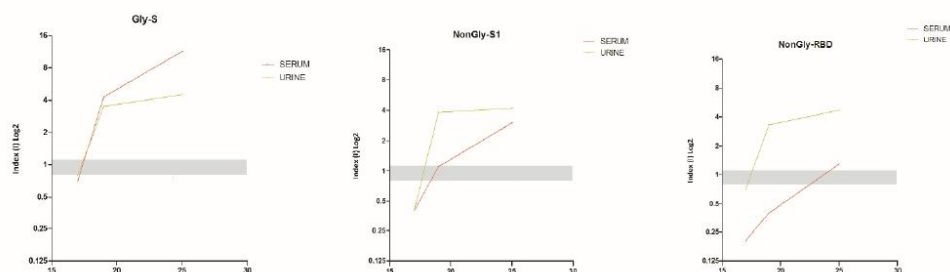
rSARS-CoV-2 Antigen	Sample	PPV	NPV	Indeterminate
Gly-S	URINE	0.969	0.767	7
	SERUM	0.938	0.675	3
NonGly-S1	URINE	0.992	0.630	12
	SERUM	0.988	0.456	28
NonGly-RBD	URINE	0.992	0.818	11
	SERUM	1.000	0.367	46

PPV and NPV were calculated based on the index value, excluding the indeterminate value samples and using the equation: $NPV = \text{true negative} / \text{false negative} + \text{true negative}$, and $PPV = \text{true positive} / \text{false positive} + \text{true positive}$.

652 A
 653 MEVFLVLLPLVSSQCVNLTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTWFHAIHVSGTNGTKRFD
 654 NPVLFPNDGVYFASTKSNIIIRGWIFGTTLDSTQSLIVNNATNVVIVCEFCNDPFLGVYHKNKSWMESEFRVY
 655 SSANNCTFEYVSQPFLLMDLEGKQGNFKNLREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALEPLVDLPIGINITRFQT
 656 LLALHRSYLTPGDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLKSFTVEKGIYQTSNFRV
 657 QPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRRKISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSF
 658 VIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNYLYRLFRKSNLKPFFERDISTEIIYQAGSTPC
 659 NGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNGLTGTGVLTESNKKFL
 660 PFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLLEILDITPCSFGGVSIVTPGTNTSNQVAVLYQDVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGS
 661 NVFQTRAGCLIGAEHVNNSECDIPIGAGICASYQTQTNsprarsvasqsiIAYTMSLGAENSVAYSNNISIAIPTNFTI
 662 SVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECNNLLQYGSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGF
 663 NFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTADAGFIKQYGDCLGDIAARDLICAKKFNGLTVLPLPLTDEMQYTSALLAG
 664 TITSGWTFGAGAAALQIPFAMQMAYRFNGIGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDSLSSSTASALGKLQDVVNQNAQALN
 665 TLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRV
 666 DFCGKGYHLMSFPQSAPHGVVFLHVTYVPAQEKNFHTAPAIChdGKAHFpREGVFVSNGTHWFTQRNFYEPQIITTDNT
 667 FVSGNCDVVIGIVNNTVYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDL
 668 QELGKYEQYIKWPWYIWLGFIAGLIAIVMTIMLCMTSCCSCCKGCCCGSCCKFDEDDSEPVKGVKLHYT
 669
 670 B



671
 672
 673 **Supplementary Figure 1:** Recombinant SARS-CoV-2 Spike proteins: NonGly-S1, NonGly-RBD
 674 and Gly-S. Amino acid sequence of the SARS-CoV-2 Spike protein: NonGly-S1 (250-667aa) in red
 675 > NonGly-RBD (319-591aa) underlined > Gly-S (330-554aa) in bold. SDS-PAGE of the recombinant
 676 proteins.
 677
 678



Supplementary Figure 2. Dynamics of IgG antibody conversion in patient urine and serum samples. Figures show the IgG levels specific to the recombinant SARS-CoV-2 Spike proteins (Gly-S, NonGly-S1, NonGly-RBD) for two patients, with longitudinal collection on different days post-symptom onset. The plotted index values (I) were related to the absorbance ratio on the cut-off.

11.7. ANEXO 7. Produções científicas no período de doutoramento

ARTIGOS:

- 1) GALVANI, NATHALIA C.; MACHADO, AMANDA S.; LAGE, DANIELA P.; MARTINS, VÍVIAN T.; DE OLIVEIRA, DAYSIANE; FREITAS, CAMILA S.; VALE, DANNIELE L.; FERNANDES, BRUNA B.; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; REIS, THIAGO A.R.; SANTOS, THAÍS T.O.; **RAMOS, FERNANDA F.**; BANDEIRA, RAQUEL S.; LUDOLF, FERNANDA; TAVARES, GRASIELE S.V.; GUIMARÃES, NATHALIA S.; TUPINAMBÁS, UNAÍ ; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; HUMBERT, MARIA V.; GONÇALVES, DENISE U.; CHRISTODOULIDES, MYRON; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A.; COELHO, EDUARDO A.F. Sensitive and specific serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis using a new chimeric protein based on specific B-cell epitopes of Leishmania antigenic proteins. MICROBIAL PATHOGENESIS, v. 162, p. 105341, 2022.
- 2) MENDONÇA, DÉBORA V.C.; TAVARES, GRASIELE S.V.; PEREIRA, ISABELA A.G.; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; **RAMOS, FERNANDA F.**; LAGE, DANIELA P.; MACHADO, AMANDA S.; CARVALHO, LÍVIA M.; REIS, THIAGO A.R.; CARVALHO, ANA MARIA R.S.; OTTONI, FLAVIANO M.; LUDOLF, FERNANDA; FREITAS, CAMILA S.; MARTINS, VÍVIAN T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; DUARTE, MARIANA C.; HUMBERT, MARIA V.; ROATT, BRUNO M.; MENEZES-SOUZA, DANIEL; ALVES, RICARDO J.; COELHO, EDUARDO A.F. Flau-A, a naphthoquinone derivative, is a promising therapeutic candidate against visceral leishmaniasis: A preliminary study. EXPERIMENTAL PARASITOLOGY, v. 233, p. 108205, 2022.
- 3) MACHADO, AMANDA S.; LAGE, DANIELA P.; VALE, DANNIELE L.; FREITAS, CAMILA S.; LINHARES, FLÁVIA P.; CARDOSO, JAMILLE M.O.; PEREIRA, ISABELA A.G.; **RAMOS, FERNANDA F.**; TAVARES, GRASIELE S.V.; LUDOLF, FERNANDA; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; BANDEIRA, RAQUEL S.; SIMÕES, ARATTI C.; DUARTE, MARIANA C.; OLIVEIRA, JAMIL S.; CHRISTODOULIDES, MYRON; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; ROATT, BRUNO M.; MARTINS, VÍVIAN T.; COELHO, EDUARDO A.F. A recombinant Leishmania amastigote-specific protein, rLiHyG, with adjuvants, protects against infection with Leishmania infantum. ACTA TROPICA, v. 230, p. 106412, 2022.

- 4) LAGE, DANIELA P.; MACHADO, AMANDA S.; VALE, DANNIELE L.; FREITAS, CAMILA S.; LINHARES, FLÁVIA P.; CARDOSO, JAMILLE M.O.; PEREIRA, ISABELA A.G.; **RAMOS, FERNANDA F.**; TAVARES, GRASIELE S.V.; LUDOLF, FERNANDA; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; BANDEIRA, RAQUEL S.; SILVA, ALESSANDRA M.; SIMÕES, LUCIANA C.; REIS, THIAGO A.R.; OLIVEIRA, JAMIL S.; CHRISTODOULIDES, MYRON ; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; ROATT, BRUNO M.; MARTINS, VÍVIAN T.; COELHO, EDUARDO A.F. Recombinant guanosine-5--triphosphate (GTP)-binding protein associated with Poloxamer 407-based polymeric micelles protects against *Leishmania infantum* infection. CYTOKINE, v. 153, p. 155865, 2022.

- 5) VALE, DANNIELE L.; MACHADO, AMANDA S.; **RAMOS, FERNANDA F.**; LAGE, DANIELA P.; FREITAS, CAMILA S.; DE OLIVEIRA, DAYSIANE ; GALVANI, NATHALIA C.; LUIZ, GABRIEL P.; FAGUNDES, MIRIAN I.; FERNANDES, BRUNA B.; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; LUDOLF, FERNANDA; TAVARES, GRASIELE S.V.; GUIMARÃES, NATHALIA S.; CHAVES, ANA T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; TUPINAMBÁS, UNAÍ ; ROCHA, MANOEL O.C.; GONÇALVES, DENISE U.; MARTINS, VÍVIAN T.; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A.; COELHO, EDUARDO A.F. Evaluation from a B-cell epitope-based chimeric protein for the serodiagnosis of tegumentary and visceral leishmaniasis. MICROBIAL PATHOGENESIS, v. 167, p. 105562, 2022.

- 6) LAGE, DANIELA P.; VALE, DANNIELE L.; LINHARES, FLÁVIA P.; FREITAS, CAMILA S.; MACHADO, AMANDA S.; CARDOSO, JAMILLE M. O.; DE OLIVEIRA, DAYSIANE ; GALVANI, NATHÁLIA C.; DE OLIVEIRA, MARCELO P.; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; **RAMOS, FERNANDA F.**; TAVARES, GRASIELE S. V.; LUDOLF, FERNANDA ; BANDEIRA, RAQUEL S.; PEREIRA, ISABELA A. G.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; ROATT, BRUNO M.; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A.; CHRISTODOULIDES, MYRON ; COELHO, EDUARDO A. F.; MARTINS, VÍVIAN T. A Recombinant Chimeric Protein-Based Vaccine Containing T-Cell Epitopes from Amastigote Proteins and Combined with Distinct Adjuvants, Induces Immunogenicity and Protection against *Leishmania infantum* Infection. Vaccines, v. 10, p. 1146, 2022.

- 7) MACHADO, AMANDA S.; LAGE, DANIELA P.; VALE,; DANNIELE L.; FREITAS, CAMILA S.; LINHARES, FLÁVIA P.; CARDOSO, JAMILLE M. O.; OLIVEIRA'DA'SILVA, JOÃO A.; PEREIRA, ISABELA A. G.; **RAMOS, FERNANDA**

F.; TAVARES, GRASIELE S. V.; LUDOLF, FERNANDA; BANDEIRA, RAQUEL S.; MAIA, LUIZ G. N.; MENEZES'SOUZA, DANIEL; DUARTE, MARIANA C.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; ROATT, BRUNO M.; CHRISTODOULIDES, MYRON; MARTINS, VÍVIAN T.; COELHO, EDUARDO ANTONIO FERRAZ. Leishmania LiHyC protein is immunogenic and induces protection against visceral leishmaniasis. PARASITE IMMUNOLOGY, v. 44, p. e12921, 2022.

8) REIS, THIAGO A.R.; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; TAVARES, GRASIELE S.V.; MENDONÇA, DÉBORA V.C.; FREITAS, CAMILA S.; COSTA, RAFAELLA R.; LAGE, DANIELA P.; MARTINS, VÍVIAN T.; MACHADO, AMANDA S.; **RAMOS, FERNANDA F.**; SILVA, ALESSANDRA M.; LUDOLF, FERNANDA; ANTINARELLI, LUCIANA M.R.; BRITO, RORY C.F.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; HUMBERT, MARIA V.; ROATT, BRUNO M.; COIMBRA, ELAINE S.; COELHO, EDUARDO A.F. Ivermectin presents effective and selective antileishmanial activity in vitro and in vivo against Leishmania infantum and is therapeutic against visceral leishmaniasis. EXPERIMENTAL PARASITOLOGY, v. 221, p. 108059, 2021.

9) SANTOS, THAÍS T.O.; MACHADO, AMANDA S.; **RAMOS, FERNANDA F.**; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; LAGE, DANIELA P.; TAVARES, GRASIELE S.V.; MENDONÇA, DÉBORA V.C.; CARDOSO, MARIANA S.; SIQUEIRA, WILLIANE F.; MARTINS, VÍVIAN T.; LUDOLF, FERNANDA; REIS, THIAGO A.R.; CARVALHO, LÍVIA M.; FREITAS, CAMILA S.; BANDEIRA, RAQUEL S.; SILVA, ALESSANDRA M.; OLIVEIRA, JAMIL S.; MOREIRA, RICARDO L.F.; FUJIWARA, RICARDO T.; ROATT, BRUNO M.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; HUMBERT, MARIA V.; TEIXEIRA, ANTÔNIO L.; COELHO, EDUARDO A.F. Leishmania eukaryotic elongation Factor-1 beta protein is immunogenic and induces parasitological protection in mice against Leishmania infantum infection. MICROBIAL PATHOGENESIS, v. 151, p. 104745, 2021.

10) FREITAS, CAMILA S.; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; LAGE, DANIELA P.; COSTA, RAFAELLA R.; MENDONÇA, DÉBORA V. C.; MARTINS, VÍVIAN T.; REIS, THIAGO A. R.; ANTINARELLI, LUCIANA M. R.; MACHADO, AMANDA S.; TAVARES, GRASIELE S. V.; **RAMOS, FERNANDA F.**; COELHO, VINICIO T. S.; BRITO, RORY C. F.; LUDOLF, FERNANDA; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; ROATT, BRUNO M.; RAMOS, GABRIELA S.; MUNKERT, JENNIFER; OTTONI, FLAVIANO M.; CAMPANA, PRISCILLA R. V.; HUMBERT, MARIA V.; COIMBRA,

ELAINE S.; BRAGA, FERNÃO C.; PÁDUA, RODRIGO M.; COELHO, EDUARDO A. F. Digitoxigenin presents an effective and selective antileishmanial action against *Leishmania infantum* and is a potential therapeutic agent for visceral leishmaniasis. *PARASITOLOGY RESEARCH*, v. 120, p. 321-335, 2021.

11) FREITAS, CAMILA S.; LAGE, DANIELA P.; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; COSTA, RAFAELLA R.; MENDONÇA, DÉBORA V.C.; MARTINS, VÍVIAN T.; REIS, THIAGO A.R.; ANTINARELLI, LUCIANA M.R.; MACHADO, AMANDA S.; TAVARES, GRASIELE S.V.; **RAMOS, FERNANDA F.**; BRITO, RORY C.F.; LUDOLF, FERNANDA ; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; ROATT, BRUNO M.; RAMOS, GABRIELA S.; MUNKERT, JENNIFER ; OTTONI, FLAVIANO M.; CAMPANA, PRISCILLA R.V.; DUARTE, MARIANA C.; GONÇALVES, DENISE U.; COIMBRA, ELAINE S.; BRAGA, FERNÃO C.; PÁDUA, RODRIGO M.; COELHO, EDUARDO A.F. In vitro and in vivo antileishmanial activity of β -acetyl-digitoxin, a cardenolide of *Digitalis lanata* potentially useful to treat visceral leishmaniasis. *Parasite*, v. 28, p. 38, 2021.

12) VALE, DANNIELE L.; LAGE, DANIELA P.; MACHADO, AMANDA S.; FREITAS, CAMILA S.; DE OLIVEIRA, DAYSIANE ; GALVANI, NATHÁLIA C.; FERNANDES, BRUNA B.; LUIZ, GABRIEL P.; OLIVEIRA, JAMIL S.; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; RAMOS, FERNANDA F.; SANTOS, THAÍS T.O.; SIQUEIRA, WILLIANE F.; ALVES, LIVIA A.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; DE MAGALHÃES-SOARES, DANIELLE F.; SILVEIRA, JULIA A.G.; BUENO, LÍLIAN L.; FUJIWARA, RICARDO T.; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A.; MARTINS, VÍVIAN T.; COELHO, EDUARDO A.F. Serodiagnosis of canine leishmaniasis using a novel recombinant chimeric protein constructed with distinct B-cell epitopes from antigenic *Leishmania infantum* proteins. *VETERINARY PARASITOLOGY*, v. 296, p. 109513, 2021.

13) SANTOS, THAÍS T.O.; **RAMOS, FERNANDA F.**; GONÇALVES, ISABELA A.P.; TAVARES, GRASIELE S.V.; LUDOLF, FERNANDA; BANDEIRA, RAQUEL S.; SILVA, ALESSANDRA M.; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; REIS, THIAGO A.R.; MACHADO, AMANDA S.; LAGE, DANIELA P.; FREITAS, CAMILA S.; VALE, DANNIELE L.; MARTINS, VÍVIAN T.; ALVES, LIVIA A.; GUIMARÃES, NATHALIA S.; CHAVES, ANA THEREZA ; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; COTA, GLÁUCIA F.; SILVEIRA, JULIA A.G.; TUPINAMBÁS, UNAÍ ; GONÇALVES, DENISE U.;

CHRISTODOULIDES, MYRON ; COELHO, EDUARDO A.F. Potential of recombinant LiHyQ, a novel *Leishmania infantum* protein, for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and as a diagnostic and prognostic marker for human leishmaniasis and human immunodeficiency virus co-infection: A preliminary study. *ACTA TROPICA*, v. 224, p. 106126, 2021.

14) **RAMOS, FERNANDA F.**; TAVARES, GRASIELE S. V.; LUDOLF, FERNANDA; MACHADO, AMANDA S.; SANTOS, THAÍS T. O.; GONÇALVES, ISABELA A. P.; DIAS, ANA C. S.; ALVES, PATRÍCIA T.; FRAGA, VANESSA G.; BANDEIRA, RAQUEL S.; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; REIS, THIAGO A. R.; LAGE, DANIELA P.; MARTINS, VÍVIAN T.; FREITAS, CAMILA S.; CHAVES, ANA T.; GUIMARÃES, NATHALIA S.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; TUPINAMBÁS, UNAÍ ; ROCHA, MANOEL O. C.; COTA, GLÁUCIA F.; FUJIWARA, RICARDO T.; BUENO, LÍLIAN L.; GOULART, LUIZ RICARDO; COELHO, EDUARDO A. F. Diagnostic application of sensitive and specific phage-exposed epitopes for visceral leishmaniasis and human immunodeficiency virus coinfection. *PARASITOLOGY*, v. 148, p. 1706-1714, 2021.

15) GALVANI, NATHALIA C.; MACHADO, AMANDA S.; LAGE, DANIELA P.; FREITAS, CAMILA S.; VALE, DANNIELE L.; DE OLIVEIRA, DAYSIANE ; LUDOLF, FERNANDA ; **RAMOS, FERNANDA F.**; FERNANDES, BRUNA B.; LUIZ, GABRIEL P.; MENDONÇA, DÉBORA V. C.; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; REIS, THIAGO A. R.; TAVARES, GRASIELE S. V.; CHAVES, ANA T.; GUIMARÃES, NATHALIA S.; TUPINAMBÁS, UNAÍ ; COTA, GLÁUCIA F.; HUMBERT, MARIA V.; MARTINS, VÍVIAN T.; CHRISTODOULIDES, MYRON ; COELHO, EDUARDO A. F.; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A. ChimLeish, a new recombinant chimeric protein evaluated as a diagnostic and prognostic marker for visceral leishmaniasis and human immunodeficiency virus coinfection. *PARASITOLOGY RESEARCH*, v. 120, p. 4037-4047, 2021.

16) TAVARES, G. S. V.; MENDONCA, D. V. C.; PEREIRA, I. A. G.; OLIVEIRA-DA-SILVA, J. A.; **RAMOS, F. F.**; LAGE, D. P.; MACHADO, A. S.; CARVALHO, L. M.; REIS, T. A.; MELO, L. H. P.; CARVALHO, A. M. R. S.; OTTONI, F. M.; RIBEIRO, F. L.; FREITAS, C. S.; BANDEIRA, R. S.; SILVA, A. M.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; DUARTE, M. C.; MENEZES-SOUZA, D.; ALVES, R. J.; ROATT, B. M.; COELHO, E. A. F. A clioquinol-containing Pluronic F127 polymeric micelle system is effective in

the treatment of visceral leishmaniasis in a murine model. *Parasite*, v. 27, p. 29, 2020.

17) OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; MACHADO, AMANDA S.; TAVARES, GRASIELE S.V.; **RAMOS, FERNANDA F.**; LAGE, DANIELA P.; LUDOLF, FERNANDA; STEINER, BETHINA T.; REIS, THIAGO A.R.; SANTOS, THAÍS T.O.; COSTA, LOURENA E.; BANDEIRA, RAQUEL S.; MARTINS, VÍVIAN T.; GALVANI, NATHÁLIA C.; CHAVES, ANA T.; OLIVEIRA, JAMIL S.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; TUPINAMBÁS, UNAÍ ; DE MAGALHÃES-SOARES, DANIELLE F.; SILVEIRA, JULIA A.G.; LYON, SANDRA ; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A.; COELHO, EDUARDO A.F. Biotechnological applications from a *Leishmania* amastigote-specific hypothetical protein in the canine and human visceral leishmaniasis. *MICROBIAL PATHOGENESIS*, v. 147, p. 104283, 2020.

18) LAGE, DANIELA P.; RIBEIRO, PATRÍCIA A.F.; DIAS, DANIEL S.; MENDONÇA, DÉBORA V.C.; **RAMOS, FERNANDA F.**; CARVALHO, LÍVIA M.; STEINER, BETHINA T.; TAVARES, GRASIELE S.V.; MARTINS, VÍVIAN T.; MACHADO, AMANDA S.; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; SANTOS, THAÍS T.O.; FREITAS, CAMILA S.; OLIVEIRA, JAMIL S.; ROATT, BRUNO M.; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A.; HUMBERT, MARIA V.; CHRISTODOULIDES, MYRON; COELHO, EDUARDO A.F. Liposomal Formulation of ChimeraT, a Multiple T-Cell Epitope-Containing Recombinant Protein, Is a Candidate Vaccine for Human Visceral Leishmaniasis. *Vaccines*, v. 8, p. 289, 2020.

19) MACHADO, AMANDA S.; **RAMOS, FERNANDA F.**; SANTOS, THAÍS T.O.; COSTA, LOURENA E.; LUDOLF, FERNANDA; LAGE, DANIELA P.; BANDEIRA, RAQUEL S.; TAVARES, GRASIELE S.V.; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; STEINER, BETHINA T.; CHAVES, ANA T.; OLIVEIRA, JAMIL S.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; DE MAGALHÃES-SOARES, DANIELLE F.; SILVEIRA, JULIA A.G.; DUARTE, MARIANA C.; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A.; LYON, SANDRA; GONÇALVES, DENISE U.; CALIGIORNE, RACHEL B.; COELHO, EDUARDO A.F. A new *Leishmania* hypothetical protein can be used for accurate serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis and as a potential prognostic marker for human disease. *EXPERIMENTAL PARASITOLOGY*, v. 216, p. 107941, 2020.

- 20) RIBEIRO, PATRÍCIA A. F.; DIAS, DANIEL S.; LAGE, DANIELA P.; MENDONÇA, DÉBORA V. C.; VALE, DANNIELE L.; **RAMOS, FERNANDA F.**; CARVALHO, LÍVIA M.; CARVALHO, ANA MARIA R. S.; STEINER, BETHINA T.; ROQUE, MARJORIE C.; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; OLIVEIRA, JAMIL S.; TAVARES, GRASIELE S. V.; MARTINS, VÍVIAN T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; ROATT, BRUNO M.; MOREIRA, RICARDO L. F.; MENEZES-SOUZA, DANIEL; DUARTE, MARIANA C.; OLIVEIRA, MÔNICA C.; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A.; TEIXEIRA, ANTÔNIO L.; COELHO, EDUARDO A. F. Evaluation of the protective efficacy of a Leishmania protein associated with distinct adjuvants against visceral leishmaniasis and in vitro immunogenicity in human cells. *PARASITOLOGY RESEARCH*, v. 119, p. 2609-2622, 2020.
- 21) MACHADO, AMANDA S.; **RAMOS, FERNANDA F.**; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; SANTOS, THAÍS T. O.; TAVARES, GRASIELE S. V.; COSTA, LOURENA E.; LAGE, DANIELA P.; TEIXEIRA-FERREIRA, ANDRÉ ; PERALES, JONAS ; FERNANDES, ANA PAULA ; MOREIRA, RICARDO L. F.; DUARTE, MARIANA C.; TUPINAMBÁS, UNAÍ ; CALIGIORNE, RACHEL B.; COTA, GLÁUCIA F.; COELHO, EDUARDO A. F.; LUDOLF, FERNANDA. An immunoproteomics approach to identify Leishmania infantum proteins to be applied for the diagnosis of visceral leishmaniasis and human immunodeficiency virus co-infection. *PARASITOLOGY (CAMBRIDGE. ONLINE)*, v. 147, p. 932-939, 2020.
- 22) LAGE, DANIELA P.; RIBEIRO, PATRÍCIA A. F.; DIAS, DANIEL S.; MENDONÇA, DÉBORA V. C.; **RAMOS, FERNANDA F.**; CARVALHO, LÍVIA M.; DE OLIVEIRA, DAYSIANE; STEINER, BETHINA T.; MARTINS, VÍVIAN T.; PERIN, LUÍSA; MACHADO, AMANDA S.; SANTOS, THAÍS T. O.; TAVARES, GRASIELE S. V.; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; OLIVEIRA, JAMIL S.; ROATT, BRUNO M.; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A.; TEIXEIRA, ANTÔNIO L.; HUMBERT, MARIA V.; COELHO, EDUARDO A. F.; CHRISTODOULIDES, MYRON . A candidate vaccine for human visceral leishmaniasis based on a specific T cell epitope-containing chimeric protein protects mice against Leishmania infantum infection. *npj Vaccines*, v. 5, p. 75, 2020.
- 23) OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; MACHADO, AMANDA S.; **RAMOS, FERNANDA F.**; TAVARES, GRASIELE S.V.; LAGE, DANIELA P.; MENDONÇA, DÉBORA V.C.; PEREIRA, ISABELA A.G.; SANTOS, THAÍS T.O.; MARTINS, VÍVIAN

T.; CARVALHO, LÍVIA M.; FREITAS, CAMILA S.; LUDOLF, FERNANDA; REIS, THIAGO A.R.; BANDEIRA, RAQUEL S.; SILVA, ALESSANDRA M.; COSTA, LOURENA E.; OLIVEIRA, JAMIL S.; DUARTE, MARIANA C.; ROATT, BRUNO M.; TEIXEIRA, ANTÔNIO L.; COELHO, EDUARDO A.F. A Leishmania amastigote-specific hypothetical protein evaluated as recombinant protein plus Th1 adjuvant or DNA plasmid-based vaccine to protect against visceral leishmaniasis. CELLULAR IMMUNOLOGY, v. 356, p. 104194, 2020.

24) OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; LAGE, DANIELA P.; **RAMOS, FERNANDA F.**; MACHADO, AMANDA S.; TAVARES, GRASIELE S.V.; MENDONÇA, DÉBORA V.C.; PEREIRA, ISABELA A.G.; MARTINS, VÍVIAN T.; CARVALHO, LÍVIA M.; LUDOLF, FERNANDA; SANTOS, THAÍS T.O.; REIS, THIAGO A.R.; FREITAS, CAMILA S.; BANDEIRA, RAQUEL S.; SILVA, ALESSANDRA M.; COSTA, LOURENA E.; OLIVEIRA, JAMIL S.; DUARTE, MARIANA C.; ROATT, BRUNO M.; TEIXEIRA, ANTÔNIO L.; COELHO, EDUARDO A.F. Corrigendum to -Leishmania infantum pyridoxal kinase evaluated in a recombinant protein and DNA vaccine to protects against visceral leishmaniasis-. Molecular Immunology 124 (2020) 161-171. MOLECULAR IMMUNOLOGY, v. 128, p. 55, 2020.

25) PEREIRA, ISABELA A. G.; MENDONÇA, DÉBORA V. C.; TAVARES, GRASIELE S. V.; LAGE, DANIELA P.; **RAMOS, FERNANDA F.**; OLIVEIRA'DA'SILVA, JOÃO A.; ANTINARELLI, LUCIANA M. R.; MACHADO, AMANDA S.; CARVALHO, LÍVIA M.; CARVALHO, ANA MARIA R. S.; SALUSTIANO, IORRANA V.; REIS, THIAGO A. R.; BANDEIRA, RAQUEL S.; SILVA, ALESSANDRA M.; MARTINS, VÍVIAN T.; CHÁVEZ'FUMAGALLI, MIGUEL A.; HUMBERT, MARIA V.; ROATT, BRUNO M.; DUARTE, MARIANA C.; MENEZES'SOUZA, DANIEL; COIMBRA, ELAINE S.; LEITE, JOÃO PAULO V.; COELHO, EDUARDO A. F.; GONÇALVES, DENISE U. Parasitological and immunological evaluation of a novel chemotherapeutic agent against visceral leishmaniasis. PARASITE IMMUNOLOGY, v. 42, p. e12784, 2020.

26) RIBEIRO, PATRÍCIA A.F.; DIAS, DANIEL S.; LAGE, DANIELA P.; MARTINS, VÍVIAN T.; COSTA, LOURENA E.; SANTOS, THAÍS T.O.; **RAMOS, FERNANDA F.**; TAVARES, GRASIELE S.V.; MENDONÇA, DÉBORA V.C.; LUDOLF, FERNANDA; GOMES, DAWIDSON A.; RODRIGUES, MICHELE A.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; SILVA, EDUARDO S.; GALDINO, ALEXSANDRO S.; DUARTE,

MARIANA C.; ROATT, BRUNO M.; MENEZES-SOUZA, DANIEL ; TEIXEIRA, ANTONIO L.; COELHO, EDUARDO A.F. Immunogenicity and protective efficacy of a new *Leishmania* hypothetical protein applied as a DNA vaccine or in a recombinant form against *Leishmania infantum* infection. *MOLECULAR IMMUNOLOGY*, v. 106, p. 108-118, 2019.

27) COSTA, L. E.; ALVES, P. T.; CARNEIRO, A. P.; DIAS, A. C. S.; FUJIWARA, P. T.; ARAUJO, G. R.; TAVARES, G. S. V.; **RAMOS, F. F.**; DUARTE, M. C.; MENEZES-SOUZA, D.; BRIZA, P.; BRIZA, F. F.; COELHO, E. A. F.; GOULART, L. R. *Leishmania infantum* β -Tubulin Identified by Reverse Engineering Technology through Phage Display Applied as Theranostic Marker for Human Visceral Leishmaniasis. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES*, v. 20, p. 1812, 2019.

28) HUMBERT, M. V.; COSTA, L. E.; KATIS, I.; **RAMOS, F. F.**; MACHADO, A. S.; SONES, C.; COELHO, E. A. F.; CHRISTODOULIDES, M. A rapid diagnostic test for human Visceral Leishmaniasis using novel antigens in a Laser Direct-Write Lateral Flow Device. *Emerging Microbes & Infections*, v. 8, p. 1178-1185, 2019.

29) LAGE, DANIELA P.; MACHADO, AMANDA S.; **RAMOS, FERNANDA F.**; SILVEIRA, PATRÍCIA C.; DIAS, DANIEL S.; RIBEIRO, PATRÍCIA A.F.; TAVARES, GRASIELE S.V.; COSTA, LOURENA E.; SANTOS, THAÍS T.O.; STEINER, BETHINA T.; FAGUNDES, MÍRIAN I.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; LYON, SANDRA ; MOREIRA, RICARDO L.F.; DUARTE, MARIANA C.; MENEZES-SOUZA, DANIEL ; CALIGIORNE, RACHEL B.; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A.; TEIXEIRA, ANTÔNIO L.; COELHO, EDUARDO A.F. A biomarker for tegumentary and visceral leishmaniasis based on a recombinant *Leishmania* hypothetical protein. *IMMUNOBIOLOGY*, v. 224, p. 477-484, 2019.

30) RODRIGUES, M. R.; SANTOS, L.; MIYAZAKI, C. K.; MARTINS, V. T.; RIBEIRO, F. L.; KURSANCEW, A. C. S.; **RAMOS, F. F.**; DIAS, D. S.; OLIVEIRA, J. S.; VIEIRA, P. M. A.; ROATT, B. M.; MACHADO-DE-AVILA, R. A.; GONCALVES, D. U.; MENEZES-SOUZA, D.; COELHO, E. A. F.; DUARTE, M. C. Immunodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis using recombinant *Leishmania infantum* Prohibitin protein and a synthetic peptide containing its conformational B-cell epitope. *JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS*, p. 112641, 2019.

- 31) SANTOS, THAÍS T.O.; CARDOSO, MARIANA S.; MACHADO, AMANDA S.; SIQUEIRA, WILLIANE F.; **RAMOS, FERNANDA F.**; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; TAVARES, GRASIELE S.V.; LAGE, DANIELA P.; COSTA, LOURENA E.; DE FREITAS, CAMILA S.; MARTINS, VÍVIAN T.; BANDEIRA, RAQUEL S.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; LYON, SANDRA ; MOREIRA, RICARDO L.F.; DE MAGALHÃES-SOARES, DANIELLE F.; SILVEIRA, JULIA A.G.; TUPINAMBÁS, UNAÍ ; CALIGIORNE, RACHEL B.; CHAVES, ANA THEREZA ; ROCHA, MANOEL O.C.; FUJIWARA, RICARDO T.; Coelho, Eduardo A.F. Recombinant *Leishmania* eukaryotic elongation factor-1 beta protein: A potential diagnostic antigen to detect tegumentary and visceral leishmaniasis in dogs and humans. *MICROBIAL PATHOGENESIS*, v. 137, p. 103783, 2019.
- 32) VALE, DANNIELE L.; DIAS, DANIEL S.; MACHADO, AMANDA S.; RIBEIRO, PATRÍCIA A.F.; LAGE, DANIELA P.; COSTA, LOURENA E.; STEINER, BETHINA T.; TAVARES, GRASIELE S.V.; **RAMOS, FERNANDA F.**; MARTÍNEZ-RODRIGO, ABEL ; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; CALIGIORNE, RACHEL B.; DE MAGALHÃES-SOARES, DANIELLE F.; SILVEIRA, JULIA A.G.; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A.; TEIXEIRA, ANTÔNIO L.; COELHO, EDUARDO A.F. Diagnostic evaluation of the amastin protein from *Leishmania infantum* in canine and human visceral leishmaniasis and immunogenicity in human cells derived from patients and healthy controls. *DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASE*, v. 95, p. 134-143, 2019.
- 33) MACHADO, AMANDA S.; **RAMOS, FERNANDA F.**; OLIVEIRA-DA-SILVA, JOÃO A.; SANTOS, THAÍS T.O.; LUDOLF, FERNANDA; TAVARES, GRASIELE S.V.; COSTA, LOURENA E.; LAGE, DANIELA P.; STEINER, BETHINA T.; CHAVES, ANA T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; DE MAGALHÃES-SOARES, DANIELLE F.; SILVEIRA, JULIA A.G.; NAPOLES, KARINA M.N.; TUPINAMBÁS, UNAÍ ; DUARTE, MARIANA C.; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A.; BUENO, LÍLIAN L.; FUJIWARA, RICARDO T.; MOREIRA, RICARDO L.F.; ROCHA, MANOEL O.C.; CALIGIORNE, RACHEL B.; COELHO, EDUARDO A.F. A *Leishmania infantum* hypothetical protein evaluated as a recombinant protein and specific B-cell epitope for the serodiagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. *ACTA TROPICA*, v. 203, p. 105318, 2019.

- 34) LAGE, DANIELA P.; LUDOLF, FERNANDA; SILVEIRA, PATRÍCIA C.; MACHADO, AMANDA S.; **RAMOS, FERNANDA F.**; DIAS, DANIEL S.; RIBEIRO, PATRÍCIA A. F.; COSTA, LOURENA E.; VALE, DANNIELE L.; TAVARES, GRASIELE S. V.; MARTINS, VÍVIAN T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; CALIGIORNE, RACHEL B.; CHAVES, ANA T.; GONÇALVES, DENISE U.; ROCHA, MANOEL O. C.; DUARTE, MARIANA C.; COELHO, EDUARDO A. F. Screening diagnostic candidates from *Leishmania infantum* proteins for human visceral leishmaniasis using an immunoproteomics approach. *PARASITOLOGY*, v. 146, p. 1467-1476, 2019.
- 35) OLIVEIRA, M. P.; MARTINS, V. T.; SANTOS, T. T. O.; LAGE, D. P.; **RAMOS, F. F.**; SALLES, B. C. S.; COSTA, L. E.; DIAS, D. S.; RIBEIRO, P. A. F.; SCHNEIDER, M. S.; MACHADO-DE-AVILA, R. A.; TEIXEIRA JUNIOR, A. L.; COELHO, E. A. F.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A. Small Myristoylated Protein-3, Identified as a Potential Virulence Factor in *Leishmania amazonensis*, Proves to be a Protective Antigen against Visceral Leishmaniasis. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES*, v. 19, p. 129-147, 2018.
- 36) DIAS, DANIEL S.; RIBEIRO, PATRÍCIA A.F.; SALLES, BEATRIZ C.S.; SANTOS, THAÍS T.O.; **RAMOS, FERNANDA F.**; LAGE, DANIELA P.; COSTA, LOURENA E.; PORTELA, AQUILA S.B.; CARVALHO, GERUSA B.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; CALIGIORNE, RACHEL B.; OLIVEIRA, JAMIL S.; MAGALHÃES-SOARES, DANIELLE F.; SILVA, EDUARDO S.; GALDINO, ALEXSANDRO S.; MENEZES-SOUZA, DANIEL ; DUARTE, MARIANA C.; GONÇALVES, DENISE U.; COELHO, EDUARDO A.F. Serological diagnosis and prognostic of tegumentary and visceral leishmaniasis using a conserved *Leishmania* hypothetical protein. *PARASITOLOGY INTERNATIONAL*, v. 67, p. 344-350, 2018.
- 37) DIAS, DANIEL S.; RIBEIRO, PATRÍCIA A.F.; MARTINS, VÍVIAN T.; LAGE, DANIELA P.; **RAMOS, FERNANDA F.**; DIAS, ANNA L.T.; RODRIGUES, MARCELLA R.; PORTELA, ÁQUILA S.B.; COSTA, LOURENA E.; CALIGIORNE, RACHEL B.; STEINER, BETHINA T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; SALLES, BEATRIZ C.S.; SANTOS, THAÍS T.O.; SILVEIRA, JULIA A.G.; MAGALHÃES-SOARES, DANIELLE F.; ROATT, BRUNO M.; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A.; DUARTE, MARIANA C.; MENEZES-SOUZA, DANIEL ; SILVA, EDUARDO S.; GALDINO, ALEXSANDRO S.; COELHO, EDUARDO A.F. Recombinant prohibitin

protein of *Leishmania infantum* acts as a vaccine candidate and diagnostic marker against visceral leishmaniasis. *CELLULAR IMMUNOLOGY*, v. 323, p. 59-69, 2018.

38) DIAS, DANIEL S.; RIBEIRO, PATRÍCIA A.F.; MARTINS, VÍVIAN T.; LAGE, DANIELA P.; COSTA, LOURENA E.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; **RAMOS, FERNANDA F.**; SANTOS, THÁÍS T.O.; LUDOLF, FERNANDA; OLIVEIRA, JAMIL S.; MENDES, TIAGO A.O.; SILVA, EDUARDO S.; GALDINO, ALEXSANDRO S.; DUARTE, MARIANA C.; ROATT, BRUNO M.; MENEZES-SOUZA, DANIEL ; TEIXEIRA, ANTONIO L.; COELHO, EDUARDO A.F. Vaccination with a CD4 + and CD8 + T cell epitopes-based recombinant chimeric protein derived from *Leishmania infantum* proteins confers protective immunity against visceral leishmaniasis. *Translational Research*, v. 5244, p. 30084-30087, 2018.

39) CARVALHO, G. B.; COSTA, L. E.; LAGE, D. P.; **RAMOS, F. F.**; SANTOS, T. T. O.; RIBEIRO, P. A. F.; DIAS, D. S.; SALLES, B. C. S.; LIMA, M. P.; CARVALHO, L. M.; DIAS, A. C. S.; ALVES, P. T.; FRANKLIN, M. L.; SILVA, R. A.; DUARTE, M. C.; MENEZES-SOUZA, D.; ROATT, B. M.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; GOULART, L. R.; TEIXEIRA, A. L.; COELHO, E. A. F. High-through identification of T cell-specific phage-exposed mimotopes using PBMCs from tegumentary leishmaniasis patients and their use as vaccine candidates against *Leishmania amazonensis* infection. *PARASITOLOGY*, v. 111, p. 1-11, 2018.

40) SALLES, B. C. S.; DIAS, D. S.; STEINER, B. T.; LAGE, D. P.; **RAMOS, F. F.**; RIBEIRO, P. A. F.; SANTOS, T. T. O.; LIMA, M. P.; COSTA, L. E.; CHAVES, A. T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; FUJIWARA, R. T.; BUENO, L. L.; CALIGIORNE, R. B.; MAGALHAES-SOARES, D. F.; SILVEIRA, J. A. G.; MACHADO-DE-AVILA, R. A.; GONCALVES, D. U.; COELHO, E. A. F. Potential application of small myristoylated protein-3 evaluated as recombinant antigen and a synthetic peptide containing its linear B-cell epitope for the serodiagnosis of canine visceral and human tegumentary leishmaniasis. *IMMUNOBIOLOGY*, p. 1-8, 2018.

41) LIMA, M. P.; COSTA, L. E.; LAGE, D. P.; DIAS, D. S.; RIBEIRO, P. A. F.; MACHADO, A. S.; **RAMOS, F. F.**; SALLES, B. C. S.; FAGUNDES, M. I.; CARVALHO, G. B.; FRANKLIN, M. L.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; MACHADO-DE-AVILA, R. A.; MENEZES-SOUZA, D.; DUARTE, M. C.; TEIXEIRA, A. L.; GONCALVES, D. U.; COELHO, E. A. F. Diagnostic application of recombinant

Leishmania proteins and evaluation of their in vitro immunogenicity after stimulation of immune cells collected from tegumentary leishmaniasis patients and healthy individuals. CELLULAR IMMUNOLOGY, v. 334, p. 61-69, 2018.

42) RIBEIRO, PATRÍCIA A.F.; DIAS, DANIEL S.; LAGE, DANIELA P.; COSTA, LOURENA E.; SALLES, BEATRIZ C.S.; STEINER, BETHINA T.; **RAMOS, FERNANDA F.**; LIMA, MARIANA P.; SANTOS, THAÍS T.O.; CHAVES, ANA T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, MIGUEL A.; FUJIWARA, RICARDO T.; BUENO, LÍLIAN L.; CALIGIORNE, RACHEL B.; DE MAGALHÃES-SOARES, DANIELLE F.; SILVEIRA, JULIA A.G.; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO A.; GONÇALVES, DENISE U.; Coelho, Eduardo A.F. A conserved Leishmania hypothetical protein evaluated for the serodiagnosis of canine and human visceral and tegumentary leishmaniasis, as well as a serological marker for the posttreatment patient follow-up. DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASE, v. 92, p. 196-203, 2018.

PATENTES:

1) COELHO, E. A. F.; OLIVEIRA-SANTOS, T. T.; PEREIRA, I. A. G.; TAVARES, G. S. V.; **RAMOS, F. F.**; RIBEIRO, F. L.; OLIVEIRA-DA-SILVA, J. A.; REIS, T. A. (PATENTE NACIONAL) Kit, método para diagnóstico da leishmaniose visceral e coinfeção com vírus da imunodeficiência humana, e usos. 2021, Brasil.

Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020210260424, título: "(PATENTE NACIONAL) Kit, método para diagnóstico da leishmaniose visceral e coinfeção com vírus da imunodeficiência humana, e usos", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 22/12/2021

2) COELHO, E. A. F.; MACHADO-DE-AVILA, R. A.; MARTINS, V. T.; VALE, D. L.; OLIVEIRA, D.; STEINER, B. T.; LAGE, D. P.; MACHADO, A. S.; **RAMOS, F. F.**; LUIZ, G. P. (PATENTE NACIONAL) Proteína quimérica recombinante, kit, método e usos para diagnóstico da leishmaniose visceral. 2021, Brasil.

Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020210185562, título: "(PATENTE NACIONAL) Proteína quimérica recombinante, kit, método e usos para diagnóstico da leishmaniose visceral", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 17/09/2021

3) COELHO, E. A. F.; **RAMOS, F. F.**; RIBEIRO, F. L.; SANTOS, T. T. O.; MACHADO, A. S.; TAVARES, G. S. V.; PEREIRA, I. A. G.; GOULART, L. R.; VAZ, E.

R.; SOUZA, T. A. (PATENTE NACIONAL) Peptídeos recombinantes, kit e método para diagnóstico da leishmaniose visceral e coinfeção com vírus da imunodeficiência humana. 2021, Brasil.

Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020210152095, título:

"(PATENTE NACIONAL) Peptídeos recombinantes, kit e método para diagnóstico da leishmaniose visceral e coinfeção com vírus da imunodeficiência humana",

Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 02/08/2021

4) COELHO, E. A. F.; MACHADO, A. S.; **RAMOS, F. F.**; RIBEIRO, F. L.; SANTOS, T. T. O.; TAVARES, G. S. V.; LAGE, D. P.; MARTINS, V. T.; OLIVEIRA-DA-SILVA, J. A.; CALIGIORNE, R. B. (PATENTE NACIONAL) Kit, método para o sorodiagnóstico de leishmaniose visceral e uso. 2020, Brasil.

Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020200258788, título:

"(PATENTE NACIONAL) Kit, método para o sorodiagnóstico de leishmaniose visceral e uso", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 17/12/2020

5) COELHO, E. A. F.; OLIVEIRA-SANTOS, T. T.; MACHADO, A. S.; OLIVEIRA-DA-SILVA, J. A.; LAGE, D. P.; TAVARES, G. S. V.; **RAMOS, F. F.** (PATENTE NACIONAL) Composições farmacêuticas e/ou imunogênicas contra leishmaniose visceral e uso. 2020, Brasil.

Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020200211668, título:

"(PATENTE NACIONAL) Composições farmacêuticas e/ou imunogênicas contra leishmaniose visceral e uso", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 15/10/2020

6) COELHO, E. A. F.; OLIVEIRA-DA-SILVA, J. A.; TAVARES, G. S. V.; LAGE, D. P.; **RAMOS, F. F.**; MACHADO, A. S.; MARTINS, V. T. (PATENTE NACIONAL) Método para diagnóstico de leishmaniose visceral e uso. 2020, Brasil.

Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020200084607, título:

"(PATENTE NACIONAL) Método para diagnóstico de leishmaniose visceral e uso", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 28/04/2020

7) COELHO, E. A. F.; OLIVEIRA-DA-SILVA, J. A.; LAGE, D. P.; TAVARES, G. S. V.; **RAMOS, F. F.**; MACHADO, A. S.; MENDONCA, D. V. C.; (PATENTE NACIONAL) Composição vacinal contra leishmaniose visceral e uso. 2020, Brasil.

Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020200081110, título: "(PATENTE NACIONAL) Composição vacinal contra leishmaniose visceral e uso", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 23/04/2020

8) COELHO, E. A. F.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; RIBEIRO, P. A. F.; DIAS, D. S.; COSTA, L. E.; SALLES, B. C. S.; **RAMOS, F. F.**; COELHO, V. T. S. (PATENTE NACIONAL) Proteína recombinante, método e kit para diagnóstico das leishmanioses visceral e tegumentar no homem e cão. 2018, Brasil.

Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020180160095, título: "(PATENTE NACIONAL) Proteína recombinante, método e kit para diagnóstico das leishmanioses visceral e tegumentar no homem e cão", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 06/08/2018