

**Universidade Federal de Ouro Preto**

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia  
PPGBIOTEC

---

Tese

---

**DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2:  
UMA REVISÃO SISTEMÁTICA E  
O DESENVOLVIMENTO DE UM  
BIOSSENSOR COM  
NANOBASTÕES DE OURO**

*Bruna de Paula Dias*

Ouro Preto  
2022



**UFOP**

**BRUNA DE PAULA DIAS**

**DIAGNÓSTICO DE SARS-CoV-2: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA E O  
DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR COM NANOBASTÕES  
DE OURO**

Trabalho de Tese de Doutorado submetido ao programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia aplicada à saúde humana e animal.

Orientador: Prof. Dr. Breno de Mello Silva

Ouro Preto, MG.

2022

## SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

D541d Dias, Bruna De Paula.

Diagnóstico de SARS-CoV-2 [manuscrito]: uma revisão sistemática e o desenvolvimento de um biossensor com nanobastões de ouro. / Bruna De Paula Dias. - 2022.

92 f.: il.: color., tab.. + Apêndice.

Orientador: Prof. Dr. Breno de Mello Silva.

Tese (Doutorado). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde Humana e Animal.

1. SARS-CoV-2. 2. Diagnóstico. 3. Nanobastões de ouro. I. Silva, Breno de Mello. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 606:628

Bibliotecário(a) Responsável: Luciana De Oliveira - SIAPE: 1.937.800



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
REITORIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS  
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**Bruna de Paula Dias**

Diagnóstico de SARS-CoV-2: uma revisão sistemática e o desenvolvimento de um biossensor com nanobastões de ouro

Tese apresentada ao Programa de Biotecnologia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia

Aprovada em 30 de setembro de 2022.

**Membros da banca**

Dr. Breno de Mello Silva - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto  
Dra. Isabela Neves de Almeida - Universidade Federal de Ouro Preto  
Dra. Rute Cunha Figueiredo - Universidade Federal de Ouro Preto  
Dr. Rodrigo Araújo Lima Rodrigues - Universidade Federal de Minas Gerais  
Dra. Alessandra Cristina Gomes Ruiz - AMPLIGENIX INDUSTRIA E COMERCIO DE PRODUTOS BIOTECNOLOGICOS LTDA

Breno de Mello Silva, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 09/11/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Breno de Mello Silva, COORDENADOR(A) DE CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**, em 09/11/2022, às 18:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufop.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0425054** e o código CRC **A6809857**.

## AGRADECIMENTOS

Começo meus agradecimentos agradecendo a Deus. Apoiar-me Nele foi essencial para que eu pudesse me manter firme nessa trajetória árdua.

Agradeço à minha família pelo amor e por me darem todo o suporte que eu precisei.

As minhas grandes amigas e companheiras de laboratório, Ariane Ferraz, Erica Ribeiro, Letícia Trindade, Natália Mendes e Samille Henriques, por todos os momentos de conversas científicas e não científicas, pelas risadas, pelos cafés e vinhos, enfim, por tudo! Em especial a Erica, minha eterna dupla da nanotecnologia, que sempre foi meu apoio científico e pessoal. Obrigada por ser essa pessoa maravilhosa na minha vida! E também em especial a Ariane, minha dupla de “resolver problemas do laboratório” e de “reclamações nas reuniões”. Obrigada por tudo o que você me ensinou, pelas tarefas divididas comigo e pela ajuda nos experimentos.

A Thaís pelas conversas e por ter me ajudado com o doutorado.

A Camila Barbosa pela amizade, parceria, companhia no laboratório, pelas trilhas e por todos os momentos bons.

Ao Orlando, pela amizade e por ter me ensinando tanto sobre tantas coisas em tão pouco tempo.

Aos meus amigos e aos colegas no LBTM pelos aprendizados. Em especial aqueles que foram mais presentes, compartilhando bons momentos: Adriana, Gabriel e Luana.

A Maria e a Júlia, alunas de iniciação científica coorientadas por mim, por contribuírem com meu desenvolvimento profissional. Agradeço pelas conversas, pelos momentos compartilhados de alegria e de frustração com os resultados dos experimentos e pela troca de experiências.

Ao professor Breno, pelos cafés, conversas, por ter me dado essa oportunidade, confiar no meu trabalho e por ter me permitido aprender.

As professoras do LBTM, Cintia e Silvana, por serem sempre atenciosas, por compartilharem seus conhecimentos, pelas boas conversas e boa convivência.

Ao professor Rodrigo Rodrigues, por ter me supervisionado no estágio em docência, nesse período eu pude aprender muito com os conhecimentos passados e pude aperfeiçoar na docência. Agradeço também ao Rodrigo pela parceria, por estar sempre sanando minhas dúvidas, me ajudando e contribuindo para meu crescimento.

Ao professor Leandro que me proporcionou uma oportunidade única de participar de um curso de empreendedorismo, o qual foi essencial para meu crescimento profissional e pessoal.

Aos nossos colaboradores, pois graças a essas parcerias esse trabalho foi possível: Sergio Caldas (FUNDEP), Mauro Teixeira (UFMG) e Luíz Orlando Ladeira (UFMG).

Ao prof. Flávio Guimarães da Fonseca que sempre foi muito atencioso e solícito e tem nos ajudado em todos os projetos.

Ao Diego e Tiago da INNOMA pela parceria e trocas de conhecimento.

Ao secretário Josino, que me ajudou diversas vezes com as questões burocráticas da pós-graduação, sempre com boa vontade, educação e eficiência.

Ao Laboratório Multiusuário da Escola de Farmácia e as técnicas Patrícia e Renata, pelo auxílio nos equipamentos.

A UFOP, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e ao NUPEB.

A CAPES pela bolsa e auxílio financeiro nos projetos.

A FAPEMIG e CNPq pelo suporte financeiro.

*“Prego que se destaca é martelado”*

– Provérbio chinês

## RESUMO

Determinadas infecções virais causam morbidade e mortalidade em todo o mundo e alguns surtos atraíram a atenção nos últimos tempos. No contexto da atual pandemia, a realização do diagnóstico rápido e preciso da COVID-19 é uma estratégia eficaz para o controle da doença, permitindo a triagem e garantindo a intervenção terapêutica oportuna. Frente a isso, diversos testes rápidos e a construção de biossensores foram desenvolvidos nos últimos tempos na busca de uma ferramenta de diagnóstico para serem usadas no ponto de atendimento. Nesse contexto, o presente trabalho analisou relatórios científicos sobre testes rápidos para o diagnóstico de COVID-19 para avaliar seus parâmetros de confiabilidade e propôs desenvolver um biossensor com nanobastões de ouro para detecção de SARS-CoV-2. Para isso, termos ou palavras-chave referentes a testes de diagnóstico rápido e testes de ponto atendimento para SARS-CoV-2 e COVID-19 foram pesquisados em dados publicados de novembro de 2020 a novembro de 2021 nos bancos de dados PubMed e Google Scholar. Para o biossensor, a superfície dos nanobastões foi modificada com polietilenoimina e com anticorpos anti-SARS-CoV-2 (0,25 µg/mL) e testados em seguida contra diferentes concentrações do vírus. Nos relatórios científicos, foram observadas diferenças na sensibilidade entre os testes diretos que usaram amostras distintas, e uma boa acurácia em amostras com valores altos de Ct (RT-PCR). Também se observou falta de sensibilidade nos testes para detecção de anticorpos nos primeiros dias após a infecção, com valores crescentes na análise pós-infecção. Reação cruzada com outros patógenos foi relatada. A maioria dos testes analisados em nosso estudo ainda precisam ser aprimorados para testar a reatividade cruzada contra outros patógenos, principalmente contra outros coronavírus. No que se refere ao biossensor, os nanobastões foram sintetizados pelo método de crescimento com sementes usando hidroquinona como agente redutor e mostrou-se reprodutível e estável por um ano quando armazenado em geladeira. O biossensor proposto foi capaz de diferenciar o vírus alvo do controle apenas em concentrações mais altas do vírus ( $10^6$  UFP/ml). O uso de Triton X-100 não se mostrou eficaz para melhorar a sensibilidade do biossensor, porém em amostras aquecidas os resultados se mostraram melhores quando comparados a amostras não aquecidas. Novos ensaios deverão ser realizados para o aprimoramento do desenvolvimento de um produto que explore adequadamente as propriedades únicas dos nanobastões de ouro.



## **ABSTRACT**

Certain viral infections cause morbidity and mortality worldwide, and some outbreaks have attracted attention in recent times. In the context of the current pandemic, carrying out a rapid and accurate diagnosis of COVID-19 is an effective strategy for controlling the disease, allowing for screening and ensuring timely therapeutic intervention. Given this, several rapid tests and the construction of biosensors have been recently developed in the search for a diagnostic tool to be used at the point of care. In this context, the present work analyzed scientific reports on rapid tests for the diagnosis of COVID-19 to assess their reliability parameters and also proposed to develop a biosensor with gold nanorods for the detection of SARS-CoV-2. For this, terms or keywords referring to rapid diagnostic tests and point of care for SARS-CoV-2 and COVID-19 were searched in data published from November 2020 to November 2021 in PubMed and Google Scholar databases. For the biosensor, the surface of the nanorods was modified with polyethyleneimine and anti-SARS-CoV-2 antibodies (0.25 µg/mL) and then tested at different concentrations of the virus. In the scientific reports, differences in sensitivity were observed between the direct tests that used different samples, and good accuracy for the most part. Sensitivity below 80% was found in pediatric samples and samples with high Ct values (RT-PCR). A lack of sensitivity was also observed in the tests for detecting antibodies in the first days after infection, with increasing values in the post-infection analysis. Cross-reaction with other pathogens has been reported. Overall, the tests found in our survey still need to be improved to test for cross-reactivity against other pathogens, especially against other coronaviruses. Regarding the biosensor, the nanorods were synthesized by the seed growth method using hydroquinone as a reducing agent and it was shown to be reproducible and stable for one year when stored in a refrigerator. The proposed biosensor was able to differentiate the target virus from the control only at higher virus dilutions ( $10^6$  PFU/ml). The use of Triton X-100 was not effective to improve the sensitivity of the biosensor, but in heated samples, the results were better when compared to unheated samples. As for the proposed biosensor, further tests should be carried out to improve the development of a product that adequately explores the unique properties of gold nanorods.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura física e genômica do SARS-CoV-2.....	16
<b>Figura 2.</b> Comparação entre os métodos laboratoriais diretos e indiretos.....	17
<b>Figura 3.</b> Esquema de oscilação de uma nanopartícula de ouro após irradiação de luz.	21
<b>Figura 4.</b> Representação das etapas do protocolo de síntese de nanobastões de ouro...	23
<b>Figura 5.</b> Esboço da metodologia. Fluxograma das duas principais etapas do estudo..	29
<b>Figura 6.</b> Métodos de ensaios utilizados para detecção direta do SARS-CoV-2 .....	37
<b>Figura 7.</b> Sensibilidade e especificidade dos testes diretos .....	40
<b>Figura 8.</b> Métodos de ensaios utilizados para detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 .....	41
<b>Figura 9.</b> Sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos POC e RDT para detecção de anticorpos contra SARS-CoV-2.....	42
<b>Figura 10.</b> Comparação da sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes sorológicos POC e RDT entre o primeiro e o segundo ano da pandemia de COVID-19. ....	45
<b>Figura 11.</b> Espectroscopia de UV-VIS-NIR com absorbância normalizada das sínteses de nanobastões de ouro com subprodutos. ....	47
<b>Figura 12.</b> Espectroscopia de UV-VIS-NIR com absorbância normalizada de duas sínteses de nanobastões de ouro após padronização.....	49
<b>Figura 13.</b> Espectro de absorção para as amostras de nanobastões de ouro em diferentes condições de armazenamento. ....	51
<b>Figura 14.</b> Deslocamentos da banda longitudinal dos nanobastões de ouro gerados após diferentes condições de armazenamento. ....	51
<b>Figura 15.</b> Representação esquemática da estratégia de funcionamento do biossensor proposto. ....	52
<b>Figura 16.</b> Espectroscopia de UV-VIS-NIR do NB usado para construção do biossensor de SARS-CoV-2. ....	53
<b>Figura 17.</b> NB funcionalizado com concentrações diferentes de PEI .....	54
<b>Figura 18.</b> Nanobastões de ouro funcionalizados com diferentes concentrações de anticorpos anti-SARS-CoV-2.....	55
<b>Figura 19.</b> Medições de espectroscopia de UV-VIS-NIR do biossensor testado com diferentes concentrações de vírus. ....	58

<b>Figura 20.</b> Cálculo derivado do sinal LSPR do biossensor testado com diferentes concentrações de vírus.....	59
<b>Figura 21.</b> Medições de espectroscopia de UV-VIS-NIR do biossensor testado com amostras tratadas ou não com Triton X-100.....	61
<b>Figura 22.</b> Cálculo derivado do sinal LSPR do biossensor testado com amostras tratadas ou não com Triton X-100.....	62
<b>Figura 23.</b> Medições de espectroscopia de UV-VIS-NIR do biossensor testado com amostras tratadas ou não por aquecimento.....	64
<b>Figura 24.</b> Cálculo derivado do sinal LSPR do biossensor testado com amostras tratadas ou não por aquecimento..	65

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Deslocamentos da banda longitudinal do NB funcionalizado com diferentes concentrações de PEI.....	53
<b>Tabela 2.</b> Média dos deslocamentos da banda longitudinal da funcionalização do NB-PEI com diferentes concentrações de anticorpo .....	56
<b>Tabela 3.</b> Potencial zeta .....	57
<b>Tabela 4.</b> Deslocamentos da banda longitudinal do biossensor em diferentes quantidades de amostras .....	57
<b>Tabela 5.</b> Média dos deslocamentos da banda longitudinal gerados nas amostras tratadas ou não com Triton X-100.....	60
<b>Tabela 6.</b> Média dos deslocamentos da banda longitudinal das amostras de SARS-CoV-2 tratadas ou não por aquecimento .....	63

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	7
<b>ABSTRACT</b> .....	8
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	9
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	11
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1. SARS-CoV-2 - Generalidades .....	15
1.2. Diagnóstico.....	Erro! Indicador não definido.7
1.3. Nanotecnologia .....	Erro! Indicador não definido.9
1.3.1. Nanopartículas de ouro .....	Erro! Indicador não definido.9
1.3.2. Nanobastões de ouro .....	21
1.3.3. Síntese de nanobastões de ouro.....	22
1.3.4. Funcionalização de nobastões de ouro .....	23
1.4. Biossensoriamento .....	24
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	26
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	27
3.1. Objetivo geral: .....	27
3.2. Objetivos específicos: .....	27
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	28
4.1. Revisão sistemática .....	28
4.1.1. Busca literária .....	28
4.1.2. Critério de seleção .....	28
4.1.3. Extração de dados e avaliação de qualidade.....	28
4.1.4. Análise estatística.....	29
4.2. Desenvolvimento do biossensor .....	30
4.2.1. Vírus SARS-CoV-2.....	30
4.2.2. Anticorpos anti-SARS-CoV-2.....	30
4.2.3. Vírus Mayaro .....	31
4.2.3.1. Produção do estoque viral.....	31
4.2.3.2. Titulação do estoque viral.....	32
4.2.4. Síntese de nanobastões de ouro .....	32
4.2.4.1. Método com ácido ascórbico.....	32
4.2.4.2. Método com hidroquinona.....	33
4.2.5. Funcionalização com PEI.....	33
4.2.6. Bioconjugação com imunoglobulinas .....	33

<b>4.2.7. Ensaio com vírus.....</b>	<b>34</b>
<b>4.2.8. Tratamento das amostras .....</b>	<b>34</b>
<b>4.2.9. Caracterização dos nanobastões de ouro .....</b>	<b>34</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>5.1. Análises de testes POC e RDT .....</b>	<b>36</b>
<b>5.1.1. Testes de detecção direta.....</b>	<b>36</b>
<b>5.1.2. Testes de imunoglobulinas .....</b>	<b>40</b>
<b>5.2. Biossensor de nanobastões de ouro .....</b>	<b>47</b>
<b>5.2.1. Síntese de nanobastões de ouro .....</b>	<b>47</b>
<b>5.2.2. Armazenamento.....</b>	<b>49</b>
<b>5.2.3. Construção do biossensor .....</b>	<b>52</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>68</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>69</b>
<b>APÊDICE I.....</b>	<b>81</b>
<b>APÊDICE II.....</b>	<b>91</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios e dependem da célula hospedeira para se propagar e estabelecer a replicação do material genético (GELDERBLUM, 1996). Os vírus são abundantes, ubíquos e infectam uma ampla gama de formas de vida, inclusive outros vírus (HERRERO-URIBE, 2011; CASSEDY et al., 2021; PAEZ-ESPINO et al., 2021). A maior parte dos vírus são específicos para uma espécie, contudo, alguns vírus podem infectar organismos que pertencem a espécies diferentes, como influenza A e C. Outros vírus, como os coronavírus, sofrem mutação e saltam de uma espécie para outra (FILCHAKOVA et al., 2022).

A estrutura dos vírus é basicamente formada por dois componentes, que são um capsídeo e um genoma de ácido nucléico que é composto por DNA ou RNA de fita dupla, ou simples. Alguns vírus ainda possuem uma camada adicional de proteção conhecida como envelope, que normalmente é constituído por um revestimento de lipídios ou glicoproteínas. Apesar da maior parte dos vírus serem estruturalmente semelhantes, geneticamente são bastante diversos (FENNER et al., 1987; CASSEDY et al., 2021). Diante da necessidade da maquinaria celular do hospedeiro para se propagar, a maioria dos vírus não causa a morte do organismo hospedeiro. No entanto, determinadas infecções virais causam morbidade e mortalidade em todo o mundo (SAYLAN et al., 2019) e alguns surtos atraíram a atenção nos últimos tempos, como: o surgimento do vírus Zika nas Américas em 2016 (WHO, 2016), a pandemia ocasionada pelo SARS-CoV-2 em 2019 (WHO, 2020a) e o surto de Monkeypox em 2022 (WHO, 2022).

A detecção rápida e eficaz de vírus exerce um papel de grande relevância na prevenção de doenças, diagnóstico e monitoramento ambiental (PARIHAR et al., 2020). Reação em cadeia da polimerase e suas variações, ensaio imunoenzimático, testes imunocromatográficos e diferentes tecnologias de biossensores são usadas para detecção viral (PEELING et al., 2010; HERRADA et al., 2018; PARIHAR et al., 2020). Nos últimos anos, têm surgido novas ferramentas para o diagnóstico viral em vista da necessidade de um diagnóstico rápido, simples, seletivo e econômico.

No contexto da atual pandemia, os testes de diagnóstico rápido (do inglês *Rapid Diagnostic Tests* - RDTs) se mostraram uma alternativa para o diagnóstico rápido e barato da COVID-19 (WHO, 2021). A importância dos testes em massa desencadeou o desenvolvimento de vários RDTs e a construção de biossensores na busca de uma

ferramenta de diagnóstico mais seletiva, estável e econômica para serem usados no ponto de atendimento (do inglês *Point-Of-Care* - POC) de modo a ajudar a aumentar os testes e reduzir a propagação da infecção por meio do auto isolamento precoce (da SILVA et al., 2020; PECK, 2020; XU et al., 2020). Nesse sentido, o presente trabalho traz uma análise da literatura acerca da precisão dos testes POCs e RDTs usados nos dois primeiros anos de pandemia para diagnóstico de COVID-19 e o desenvolvimento de biossensor usando nanomateriais de ouro para detecção de SARS-CoV-2.

### 1.1. SARS-CoV-2 - Generalidades

Em dezembro de 2019, foi detectado um novo coronavírus (SARS-CoV-2) em Wuhan, Província de Hubei, China, que ficou conhecido por causar a COVID-19 (do inglês – COroNaVIrus Disease 2019) (HUANG, C. et al., 2020; TALEGHANI e TAGHIPOUR, 2021). Este vírus espalhou-se pelo mundo rapidamente e em março de 2020 a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a COVID-19 como uma pandemia (WHO, 2020a). O número de casos aumentou exponencialmente, com mais de 570 milhões de casos notificados até início de agosto de 2022 e mais 6 milhões de óbitos relatados (WHO, 2020b).

O SARS-CoV-2 pertence à família *Coronaviridae*, subfamília *Orthocoronavirinae* gênero *Betacoronavirus* e subgênero *Sarbecovirus*. O SARS-CoV-2 está estreitamente relacionado com dois outros vírus causadores de patologias respiratórias graves, que são o SARS-CoV, causador de um surto de síndrome respiratória aguda grave em 2002 na China, e o MERS-CoV, causador da síndrome respiratória do Oriente Médio em 2012, estando estes agrupados no mesmo gênero (GORBALENYA et al., 2020).

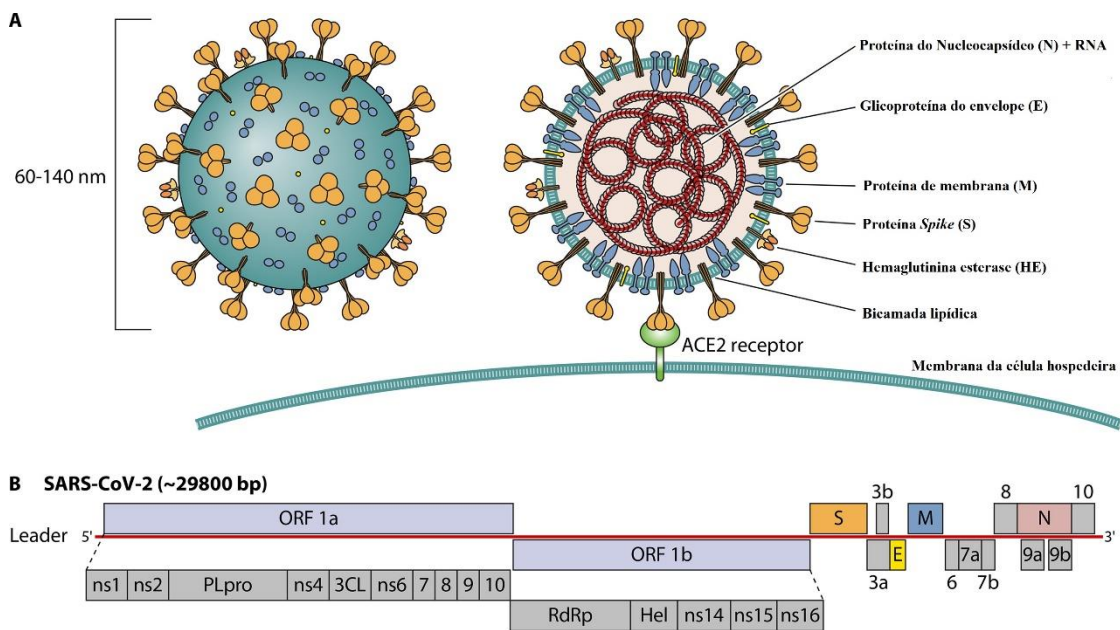
Os coronavírus são comuns em muitas espécies diferentes de animais, no entanto, apenas sete são conhecidos por infectar seres humanos (HUANG, Y., et al., 2020; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021a). Entre estes, quatro coronavírus (229E, NL63, OC43 e HKU1) causam apenas sintomas leves similar a um resfriado comum e os outros três (SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2) são capazes de causar sintomas graves e, eventualmente, óbitos (HUANG, Y., et al., 2020).

Assim como os outros coronavírus, o SARS-Cov-2 é um vírus formado por um nucleocapsídeo (N) helicoidal que está envolto por um envelope constituído por uma bicamada lipídica, na qual estão associadas as proteínas estruturais: *spike* (S), membrana (M) e envelope (E) (Figura 1) (WANG et al., 2020).



O genoma é composto de RNA de fita simples de sentido positivo (+ssRNA) de aproximadamente 29,9 kb. O genoma possui duas regiões não traduzidas (UTRs do inglês *untranslated region*) e uma única fase aberta de leitura (ORF, do inglês *open reading frame*) e codifica quatro proteínas estruturais principais: *spike* (S), membrana (M), envelope (E) e nucleocapsídeo (N), que atuam na formação da partícula viral; e duas poliproteínas precursoras (pp1a e pp1ab) que são processadas em 16 proteínas não estruturais (nsP1-16) e exercem papel crucial na replicação e transcrição do RNA viral (BORGES et al., 2020; KUMAR, 2020).

**Figura 1.** Estrutura física e genômica do SARS-CoV-2. (A) Diagrama do SARS-CoV-2. (B) Organização do genoma e proteínas com funções conhecidas ou desconhecidas. Adaptado de SAFIABADI TALI et al., 2021.



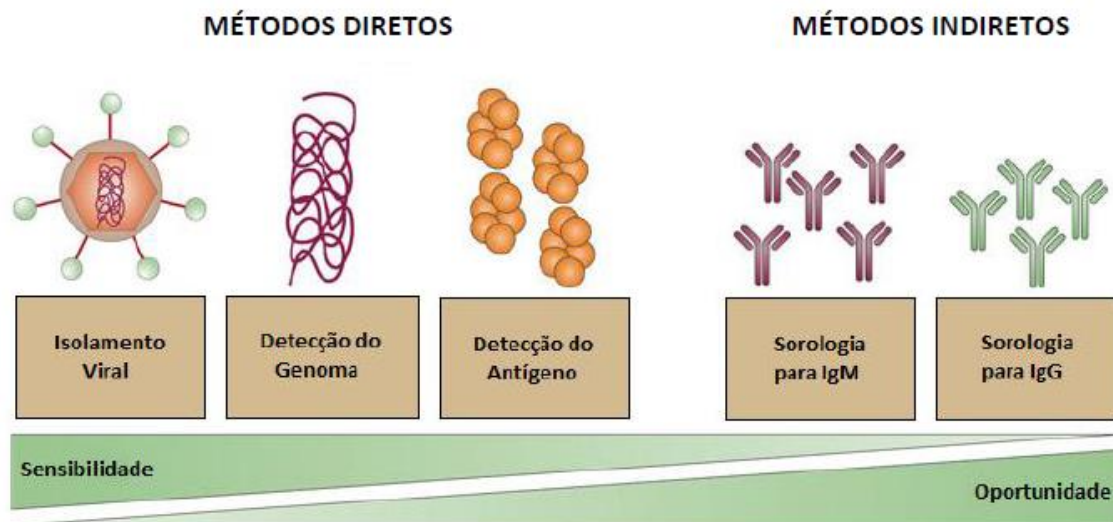
A transmissão do SARS-CoV-2 ocorre por contato com as secreções de indivíduos infectados, como secreções respiratórias, gotículas ou saliva, que são liberadas ao tossir, espirrar ou falar e também pode ocorrer, em menor escala, através do contato com objetos e superfícies contaminadas (CDC 2021; LEWIS, 2021). A gravidade da infecção por SARS-CoV-2 pode manifestar de formas distintas nos indivíduos, abrangendo casos assintomáticos e manifestações clínicas leves, até quadros moderados, graves e críticos, como doença respiratória aguda, pneumonia com diferentes graus de gravidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021b).

Diante da alta transmissão do SARS-CoV-2 e seus acometimentos na saúde dos indivíduos infestados, o diagnóstico rápido e preciso da COVID-19 é crucial para a triagem da doença e o gerenciamento da preparação da saúde pública (JIN et al., 2019).

## 1.2. Diagnóstico

Os métodos diagnósticos podem ser divididos em diretos e indiretos. Os métodos diretos são caracterizados pelo isolamento do vírus, detecção do genoma viral e de antígenos. Tais métodos são utilizados para identificação precoce e definitiva, e podem ser usados para identificar sorotipos e genótipos. Os métodos indiretos são baseados na detecção de anticorpos específicos, como a identificação de imunoglobulinas M e/ou G (PEELING et al., 2010). As qualificações de diferentes testes de diagnóstico são resumidas na Figura 2.

**Figura 2.** Comparação entre os métodos laboratoriais diretos e indiretos. A “Oportunidade” se refere ao fato de que geralmente testes de anticorpos são a opção de diagnóstico mais prática disponível. Adaptada de PEELING et al., 2010.



A identificação do vírus através do seu isolamento é uma técnica altamente sensível, no entanto, nem sempre a quantidade de vírus viáveis é o suficiente nas amostras clínicas, dificultando sua utilização (VERSIANI, 2018). Além disso, é um processo demorado, custoso, requer estrutura laboratorial elaborada e, dependendo do vírus, como é o caso do SARS-CoV-2, exige nível de biossegurança 3, que normalmente não está disponível nas instituições de saúde (ARTIKA et al., 2020; CASE et al., 2020).

A detecção do genoma viral permite a identificação e a diferenciação de outras doenças. O genoma viral pode ser detectado por diferentes técnicas moleculares, sendo a PCR quantitativa precedida por transcrição reversa (RT-qPCR) a mais sensível para detecção de RNA de SARS-CoV-2 (MARDIAN et al., 2021). Apesar disso, técnicas moleculares são úteis apenas na fase aguda da doença, são necessários equipamentos de laboratório específicos e pessoal treinado para execução destas técnicas, não podendo ser disponibilizados em laboratórios clínicos de pronto atendimento ou em áreas rurais (PEELING et al., 2010; CASSEDY et al., 2021). Outras técnicas moleculares que vem sendo desenvolvidas oferecem a diminuição do tempo em relação à RT-qPCR, demandam de uma infraestrutura mínima e ainda garantem uma boa sensibilidade, como é o caso da amplificação isotérmica mediada por loop de transcrição reversa (RT-LAMP), amplificação da polimerase recombinase (RPA) e o ensaio de repetições palindrômicas curtas (CRISPR). No entanto, essas ferramentas ainda apresentam limitações, como a estabilidade do conjunto de iniciadores LAMP e desafios éticos na questão de utilização do CRISPR no local de atendimento domiciliar (DROBYSH et al., 2022).

Técnicas de imunohistoquímica ou imunofluorescência fazem a detecção de antígenos virais, mas são ensaios complexos e de alto custo que impedem a sua utilização em laboratórios de análises clínicas com infraestrutura limitada (VERSIANI, 2018). Os testes de ELISA (do inglês: *enzyme-linked immunosorbent assays*) também podem ser utilizados para detecção de antígenos e, apesar de sua simplicidade, os testes imunocromatográficos são os que ganham destaque por sua praticidade e rapidez. Os testes imunocromatográficos são popularmente conhecidos como testes rápidos de fluxo lateral ou apenas testes rápidos (RDT) por gerarem resultados em até 30 minutos. Estes, são portáteis, fáceis de usar, utilizam pequenos volumes de amostras, possuem custo de fabricação relativamente baixo e são facilmente produzidos em larga escala. Essas características permitem que os testes imunocromatográficos sejam utilizados em laboratórios clínicos de pronto atendimento e transportados para regiões geograficamente remotas e de difícil acesso. Apesar disso, esse tipo de teste possui limitações quanto ao desempenho de sensibilidade e reprodutibilidade (O'FARRELL, 2009; BORGES et al., 2021; WHO, 2021; DIAS et al., 2022).

Em relação aos métodos indiretos, estes se baseiam na detecção de anticorpos específicos, e não devem ser usados para diagnosticar uma infecção atual, uma vez que a produção de anticorpos pelo corpo humano ocorre semanas após a infecção. Os testes

de anticorpos ajudam a identificar indivíduos que podem ter sido infectados por vírus ou se recuperaram da doença. Geralmente, os testes sorológicos indiretos são de fácil execução e possuem um bom custo/benefício, entretanto, não possui a especificidade dos métodos diretos e a confirmação requer duas ou mais amostras (PEELING et al., 2010). Além disso, em alguns casos pode ocorrer reação cruzada, como, por exemplo, a reação cruzada entre o vírus da Dengue e SARS-CoV-2 (VILLARREAL et al., 2021; MASYENI et al., 2021).

### **1.3. Nanotecnologia**

Nanotecnologia pode ser definida como uma tecnologia capaz de criar, manipular e explorar materiais em escala nanométrica, onde 1 nanômetro corresponde a  $10^{-9}$  metros (IIEP, 2015). Os materiais em escala nanométrica possuem grande área superficial em relação ao volume, o que lhes confere propriedades e comportamentos distintos de uma massa com a mesma composição na escala macrométrica (FERREIRA e RANGEL, 2009).

A nanotecnologia explora fronteiras e interseções de muitas disciplinas, incluindo biologia, química, física, medicina e engenharia (SAHOO et al., 2007; BAYDA et al., 2019, DIAS et al., 2020), mas é na área da saúde que ela vem se destacando com o uso de tecnologias para prevenção, diagnóstico, monitoramento e tratamento de doenças (SIM e WONG, 2021). No diagnóstico, a utilização de materiais nanométricos se mostra vantajosa devido à redução significativa do tempo de análise, melhora na sensibilidade e são mais econômicos (KANG et al., 2021; SHAND et al., 2022). Diferentes nanopartículas podem ser utilizadas no diagnóstico, entre elas: nanopartículas de ouro (WANG et al., 2022), nanopartículas magnéticas (FARZIN et al., 2020), *quantum dots* (STANISAVLJEVIC et al., 2015), nanotubos de carbono (HAN et al., 2004), entre outras.

#### **1.3.1. Nanopartículas de ouro**

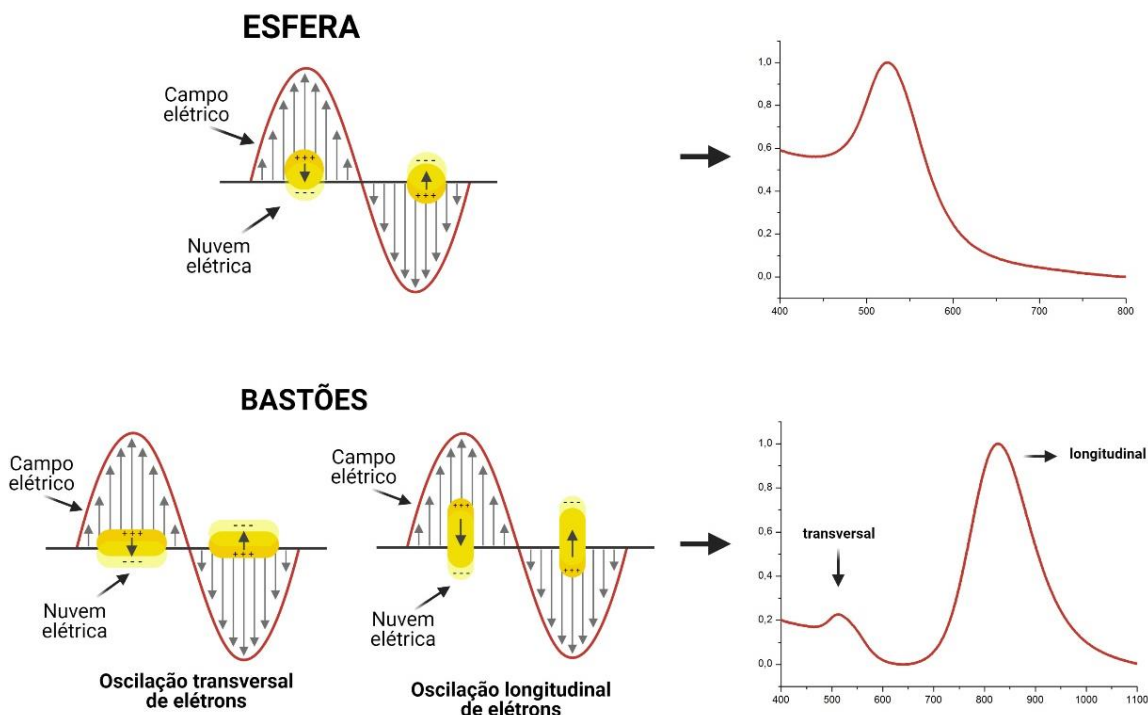
Dentre as nanopartículas metálicas, as nanopartículas de ouro (AuNPs) estão entre as mais estudadas e utilizadas em decorrência das suas propriedades ópticas e eletrônicas, estabilidade, simplicidade de síntese em diversificados formatos (esferas, bastões, conchas, estrelas), baixa toxicidade e a facilidade em realizar modificações na

camada superficial (DANIEL; ASTRUC, 2004; DYKMAN; KHLEBTSOV, 2011; JAZAYERI et al., 2016; MASLOVA; HSING, 2019; SANI et al., 2021).

As AuNPs se distinguem de outras nanopartículas por suas propriedades ópticas únicas resultantes do fenômeno de Ressonância de Plasmon de Superfície Localizado (do inglês, “*localized surface plasmon resonance*”, LSPR) (JEONG et al., 2009). A LSPR acontece quando o campo eletromagnético da luz interage com os elétrons da banda de condução das nanopartículas de metal levando à formação de oscilações coerentes em ressonância com a frequência da luz. Como resultado dessa oscilação, ocorre uma separação de cargas entre o elétron livre e o núcleo metálico iônico, restaurando as forças de Coulomb entre os elétrons livres e, agindo como uma força restauradora, empurra os elétrons livres para se moverem na direção oposta, o que resulta na oscilação coletiva dos elétrons, ou seja, a excitação do LSPR (NEHL; HAFNER, 2008; CAO et al., 2014).

A excitação do LSPR causa fortes bandas de absorção e dispersão na região visível do infravermelho próximo do espectro eletromagnético. O comprimento de onda em que o pico LSPR é observado é dependente da composição, tamanho, forma das nanopartículas e é sensível à mudança do índice de refração no ambiente dielétrico local (HUANG; NERETINA; EL-SAYED, 2009). Para AuNPs em formato esférico é observado apenas uma banda de absorção, já a forma de bastões, por apresentarem uma estrutura anisotrópica, são observadas duas bandas de absorção, que são referentes às oscilações dos elétrons ao longo do eixo longitudinal e do eixo transversal (Figura 3).

**Figura 3. Esquema de oscilação de uma nanopartícula de ouro após irradiação de luz.** (A) Movimento ondulatório é proveniente da interação entre os elétrons livres da superfície e o campo elétrico gerado pela partícula metálica. (B) banda de absorção. Fonte: autor



A banda longitudinal de ressonância em nanobastões é dependente e sensível à relação de aspecto (do inglês *Aspect Ratio*, AR, relação entre comprimento e largura) da partícula. Portanto, alterações em torno dos AuNRs, como a ligação de moléculas, altera o meio circundante e afeta a densidade de carga dos elétrons na superfície, causando deslocamento da banda longitudinal, do visível para a região do infravermelho próximo (NIR) com AR crescente (HUANG; NERETINA; EL-SAYED, 2009; NI et al., 2008). Diante disso, mudanças do comprimento de onda de pico ou a absorbância de pico no espectro de absorção das AuNPs podem ser empregadas como indicador da resposta do sensor LSPR.

### 1.3.2. Nanobastões de ouro (NB)

Das distintas formas que as AuNPs podem ser produzidas, os NB têm atraído atenção devido às suas propriedades óticas e a sua facilidade de síntese por meio de uma diversidade de métodos que possibilitam ajustar sua razão de aspecto, o que consequentemente irá variar a resposta óptica em uma ampla faixa espectral, do visível à região do NIR. Para aplicações de imageamento e melhoramento de fluorescência, os NB maiores são preferíveis. Já os NB menores, aprimoram a conversão fototérmica

devido à maior eficiência de absorção (HUANG; NERETINA; EL-SAYED, 2009; PARK *et al.*, 2014). Assim, ajustes no tamanho dos NB garantem melhor controle sobre suas propriedades (CHANG; MURPHY, 2018).

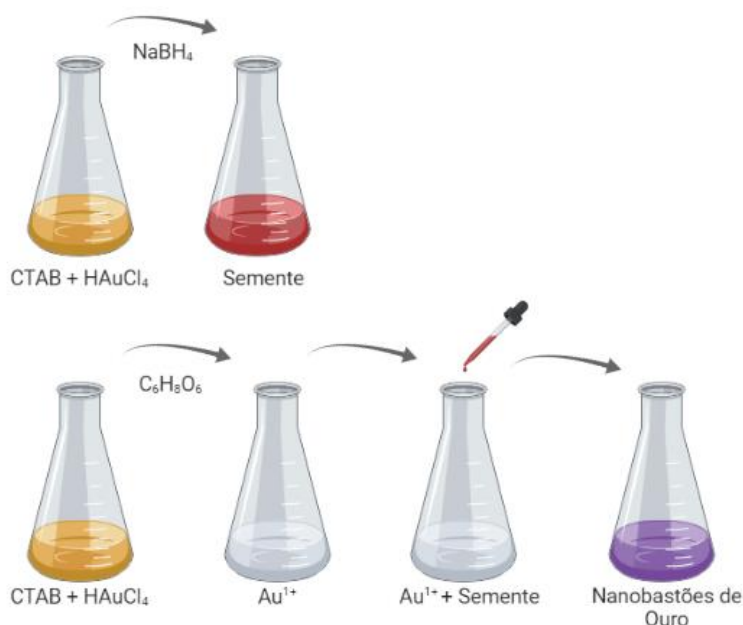
### 1.3.3. Síntese de nanobastões de ouro

Os NB podem ser sintetizados por meio do crescimento mediado por sementes, crescimento sem semente, pelo método de crescimento induzido por irradiação ultravioleta (NIIDOME *et al.*, 2003), por síntese fotoquímica (KIM; SONG; YANG, 2002), pelo método de bio-redução (CANIZAL *et al.*, 2001) e por síntese assistida por micro-ondas (ZHU; HU, 2003). No entanto, o método mais comum é o crescimento mediado por semente, por apresentar alto rendimento, ser mais simples e direto para produzir a forma, o tamanho e monodispersividade desejada de NB (ZHOU *et al.*, 2017).

Neste método, pequenas esferas de ouro (aproximadamente 4nm), denominadas sementes, são sintetizadas pela redução do ácido tetracloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) por um agente redutor forte (boridreto de sódio -  $\text{NaBH}_4$ ), e servem como pontos de nucleação para o crescimento dos bastões de ouro. Essas sementes são adicionadas a uma solução de crescimento que contém sal de ouro ( $\text{AuCl}_4^-$ ), um agente redutor fraco, geralmente é usado o ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ) e um agente direcionador de estrutura, o CTAB (Brometo de cetiltrimetilamônio), que facilita a formação do bastão através de uma ligação preferencial nas faces laterais da nanopartícula (HUANG; NERETINA; EL-SAYED, 2009). O nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) pode ser adicionado na reação de crescimento por permitir alterar a AR de acordo com a concentração utilizada (ALI; SNYDER; EL-SAYED, 2012).

Após aproximadamente 20 minutos de reação, é observada a mudança de cor da solução, do transparente para roxo, caracterizando a formação dos NBs (ZHOU *et al.*, 2017) (Figura 4).

**Figura 4.** Representação das etapas do protocolo de síntese de nanobastões de ouro. A primeira etapa representa a preparação da solução semente, na qual pequenas sementes de ouro reduzem sais de ouro por CTAB na presença de  $\text{NaBH}_4$ . Na segunda etapa ocorre a preparação da solução de crescimento, em que na solução de sais de ouro são adicionados o CTAB, a  $\text{AgNO}_3$  e as sementes produzidas na primeira etapa. O produto final é a formação de nanobastões de ouro (roxo/violeta). Fonte: autor. Criado no Biorender.com



#### 1.3.4. Funcionalização de nanobastões de ouro

O CTAB além de atuar como agente direcionador de estrutura também atua como um estabilizador para proteger os NB contra agregação. No entanto, essa bicamada de CTAB na superfície dos NB precisa ser substituída ou coberta por moléculas compatíveis conhecidas para se poder direcionar a aplicação dos NB (HWANG e TAO, 2010; LOCATELLI et al., 2015).

As estratégias de ligação de biomoléculas aos NB consistem principalmente em: (a) adsorção eletrostática de biomoléculas diretamente à camada de CTAB; (b) revestimento da camada de CTAB com uma ou mais camadas de polímeros carregados, seguido de fisissorção, ou ligação covalente da biomolécula de interesse; (c) adição de ligantes bifuncionais, no qual o CTAB é primeiramente substituído pelo ligante escolhido seguido da conjugação das biomoléculas; (d) troca de ligantes, no qual o CTAB é substituído por pequenas moléculas contendo grupos tiol (HUANG; NERETINA; ELSAYED, 2009).

Neste trabalho, a bicamada de CTAB foi substituída pela Polietilenoimina (PEI) linear, um polímero que dispõe de grupos amino livres, com o intuito de atuar como um



agente intermediário. Nessa estratégia, uma das extremidades do resíduo amina ( $-NH_2$ ) da PEI se liga ao ouro e a outra extremidade se liga covalentemente ao grupo carboxila ( $-COOH$ ) da porção C-terminal de anticorpos (ZAPP et al., 2014).

Os anticorpos monoclonais são amplamente utilizados como agentes direcionadores para detecção, uma vez que podem ser orientados para explorar sua capacidade natural de reconhecer um único antígeno específico (ZHOU et al., 2017). Assim, a funcionalização de anticorpos específicos em NB pode ser utilizada para o desenvolvimento de imunoenaios ópticos (HWANG; TAO, 2010).

### **1.3.5. Biosensoriamento**

Um biossensor consiste em um dispositivo analítico que integra elementos biológicos, como microrganismos, enzimas, anticorpos, ácidos nucleicos, entre outros, que produz sinais com base na interação com o elemento testado e um transdutor que converte esses sinais em um parâmetro elétrico mensurável (NAKAMURA; KARUBE, 2003). Em razão do uso de elementos biológicos específicos, esses sistemas de medição possuem propriedades únicas para identificar e medir analitos alvo (MOKHTARZADEH et al., 2017). Diversos biossensores já foram desenvolvidos, no entanto, muitos ainda são baseados em marcadores de fluorescência, quimiluminescência e radioativo, e estes ainda possuem um alto custo e necessitam de treinamento especializado. Assim, a aplicação de biossensores livres de marcadores se mostram mais interessantes por serem de fácil manipulação, estáveis e passíveis de miniaturização (SANG et al., 2015).

A nanotecnologia vem apresentando avanços com o desenvolvimento de sensores em nanoescala que são capazes de fornecer a detecção em tempo real e de quantificar as substâncias-alvo. Diante ao reduzido tamanho e aumento da razão entre área e volume dos nanomateriais, a interação da superfície dos sensores com o analito torna-se altamente eficiente e melhora significativamente a aplicabilidade do biossensor (MOKHTARZADEH et al., 2017).

Os nanobiossensores podem apresentar diversas variações em relação aos seus constituintes bem como o seu modo de detecção e leitura do sinal. Os baseados em LSPR têm evoluído significativamente ao longo dos anos e estes exploram as propriedades únicas das nanopartículas de metais nobres. Muitos desses nanobiossensores baseados em LSPR já foram estudados e desenvolvidos para a

detecção de vários vírus, como, por exemplo, a detecção do vírus da Dengue através da ligação de DNAzyme às AuNPs (CARTER et al., 2013), SARS-CoV-2 com a ligação de anticorpos específicos às AuNPs (KARAKUŞ et al., 2021) e a detecção de anticorpos antivírus da Zika com o uso de nanobastões de ouro (VERSIANI et al., 2020).

Como comentado no tópico anterior, nanopartículas de ouro apresentam fortes bandas de ressonância de plasmon de superfície que são dependentes do tamanho, da forma e da composição (ANKER et al., 2008). O uso dessas nanopartículas em sensores é baseado nas alterações do comprimento de onda da banda LSPR diante mudanças nas propriedades dielétricas do meio circundante, resultante da ligação de moléculas biológicas. Esta ligação pode ser monitorada em tempo real com alta sensibilidade usando espectrometria de transmissão simples e barata.

Vários sensores LSPR vêm sendo desenvolvidos baseados nas variadas formas que as nanopartículas metálicas nobres podem ser sintetizadas, em especial os nanobastões de ouro, que devido às propriedades intrínsecas de sua forma anisotrópica, se mostraram mais sensíveis em comparação com o uso de nanoesferas de ouro (CAO; SUN; GRATAN, 2014). Assim, moléculas de DNA, RNA, anticorpos e antígenos conjugados à superfície de nanobastões de ouro podem ser utilizados para detecção rápida, sensível, específica e direta do vírus.

## **2. JUSTIFICATIVA**

A pandemia de COVID-19 tem sido um desafio de saúde pública global por mais de dois anos. A necessidade de um rápido rastreamento da infecção por SARS-CoV-2 acarretou uma busca constante no desenvolvimento de testes diagnósticos. Embora vários métodos possam ser utilizados para o diagnóstico de vírus, muitos ainda são metodologias caras que necessitam de treinamento profissional específico e não podem ser disponibilizadas em laboratórios clínicos de pronto atendimento ou em áreas rurais.

O desenvolvimento de testes POC tem tido um efeito transformador nos cuidados de saúde por sua fácil implementação em centros de atendimento remoto, disponibilização do teste à beira do leito e redução do tempo de resultado, ajudando no manejo clínico, especialmente no contexto da pandemia de COVID-19.

Os testes de diagnóstico rápido de antígenos (Ag-RDT) são uma alternativa para o diagnóstico rápido e barato de COVID-19 e podem ser realizados no ponto de atendimento. Adicionalmente, os testes sorológicos que detectam anticorpos produzidos pelo corpo humano em resposta à infecção com o SARS-CoV-2 são aplicados por serem úteis em estudos de sorovigilância para apoiar a investigação de um surto em andamento e apoiar a avaliação retrospectiva da taxa de ataque ou tamanho de um surto e ajudam a identificar pacientes assintomáticos.

Ademais, a construção de biossensores para detecção de doenças virais tem ganhado atenção nos últimos anos e a implementação da nanotecnologia nesses dispositivos lhes confere maior sensibilidade, especificidade e simplicidade e se mostram uma ferramenta promissora para o uso em ponto de atendimento.

Frente ao exposto, este trabalho faz um levantamento acerca da sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes rápidos desenvolvidos para COVID-19 no último ano da pandemia e adicionalmente, em vista da necessidade do desenvolvimento de novas ferramentas para detecção viral, propomos desenvolver um biossensor para detecção direta de SARS-CoV-2 usando nanobastões de ouro.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral:**

Avaliar parâmetros de confiabilidade de testes rápidos para o diagnóstico de COVID-19 relatados na literatura e desenvolver um biossensor utilizando nanobastões de ouro para detecção de SARS-CoV-2.

#### **3.2. Objetivos específicos**

1 - Realizar uma revisão sistemática;

1.1 - Analisar a sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes selecionados;

1.2 - Comparar as análises dos testes no primeiro ano de pandemia com os testes do segundo ano;

2 – Analisar o efeito de diferentes condições de armazenamento dos nanobastões de ouro na viabilidade de uso;

3 – Bioconjugar nanobastões de ouro com anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2;

6 – Avaliar a eficácia do nanosensor plasmônico para detecção de amostras inativadas de SARS-CoV-2

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Revisão sistemática

#### 4.1.1. Busca literária

Foi realizada à busca de estudos publicados de 01 de novembro de 2020 a 30 de novembro de 2021 nas bases de dados *PubMed* e *Google Scholar*. Foram considerados títulos de assuntos e títulos/subtítulos (quando aplicável), além de palavras-chave e resumos para identificar os termos pesquisados: “*point of care sarscov2 diagnostic or diagnosis*”, “*point of care covid-19 diagnostic or diagnosis*”, “*rapid test covid-19 diagnostic or diagnosis*” e “*rapid test sars-cov-2 diagnostic or diagnosis*”.

#### 4.1.2. Critério de seleção

Caso-controle, estudos de coorte e ensaios clínicos randomizados com dados experimentais em testes POC ou RDT para SARS-CoV-2 realizaram análises eficientes e forneceram dados robustos sobre seus resultados foram elegíveis para inclusão. A OMS e o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) apontam que o RDT deve preferencialmente fornecer resultados entre 15 e 30 minutos para melhor lidar com a pandemia de COVID-19. Portanto, apenas testes rápidos POC e RDT que fornecem resultados em até 30 minutos foram incluídos. Artigos duplicados, *preprints* e outros artigos com temas não correlacionados, como editoriais, relatos de casos, estudos de modelagem e estudos que não apresentavam dados de POC ou RDT para COVID-19 não foram incluídos na presente revisão sistemática. Não houve restrições de idioma. A estratégia para seleção dos dados está representada na Figura 5.

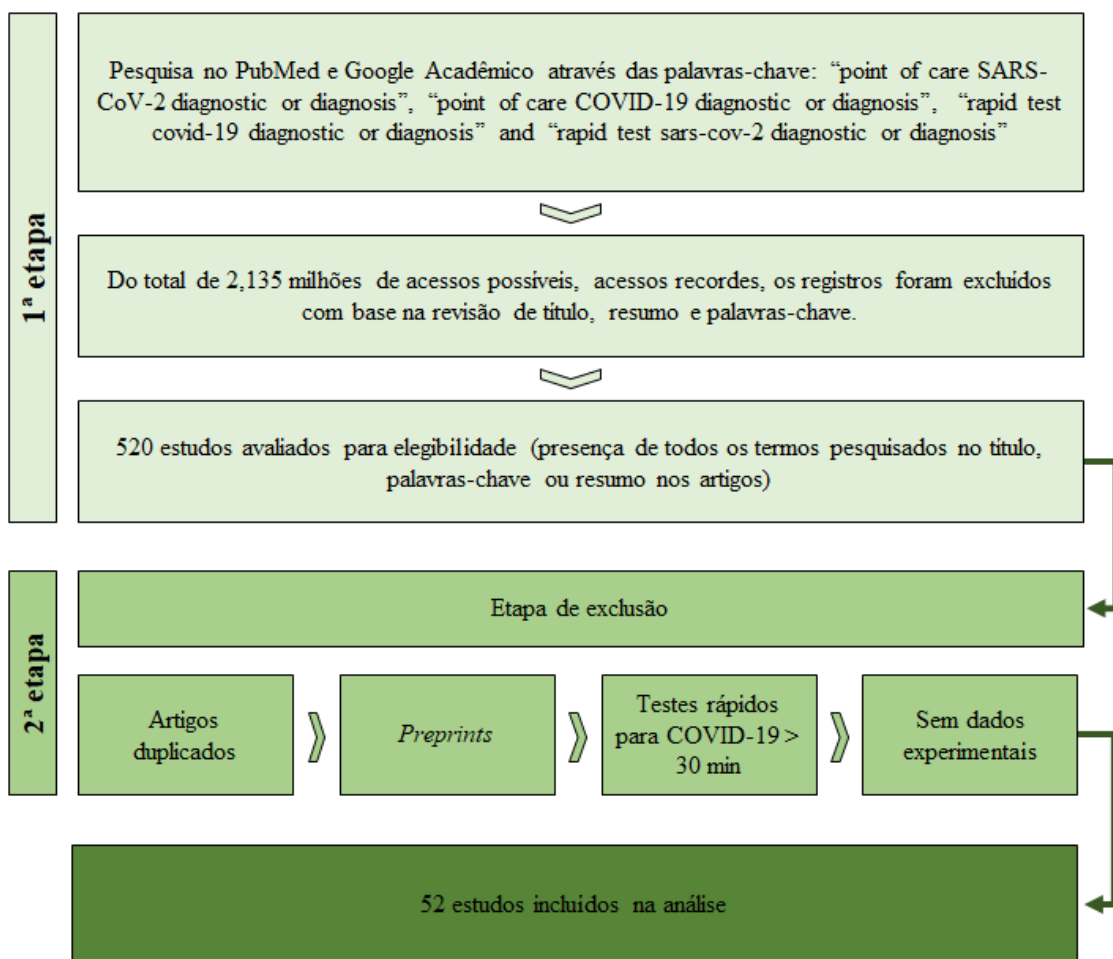
#### 4.1.3. Extração de dados e avaliação de qualidade

Um investigador independente realizou uma busca sistemática nas bases de dados. Sete pesquisadores analisaram independentemente o título, resumo e artigos na íntegra para aplicar os critérios de seleção seguindo um roteiro com os mesmos parâmetros. Foram extraídos autores, ano de publicação, tipo de teste, método de ensaio, critérios diagnósticos (sensibilidade, especificidade/precisão), tempo de detecção, tamanho da amostra e análise de reação cruzada para cada estudo. Dois revisores analisaram e resolveram independentemente a qualidade metodológica dos estudos elegíveis.

#### 4.1.4. Análise estatística

Os dados de sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes sorológicos POC e RDT entre o primeiro e o segundo ano da pandemia de COVID-19 foram analisados pelo programa GraphPad Prism 7.0 software. De acordo com o teste de normalidade Shapiro-Wilk as diferenças entre os grupos do primeiro ano e segundo ano foram consideradas significantes quando o valor de P foi menor ou igual a 0,05 por meio do teste Kruskal-Wallis.

Figura 5. Esboço da metodologia. Fluxograma das duas principais etapas do estudo.



## **4.2. Desenvolvimento do biossensor**

### **4.2.1. Vírus SARS-CoV-2**

O SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2 Wuhan Hu-1 amostra SP02/BRA) foi isolado a partir de amostra de swab nasofaríngeo de paciente testado na Universidade de São Paulo. O vírus foi cultivado em células Vero e titulado, pelo método de técnica de contagem de Unidades Formadoras de Placas (UFP) de Dulbecco, conforme descrito por Araújo et al., 2020. Para a utilização do SARS-CoV-2 uma alíquota do vírus foi inativada por luz UV-C 254nm. A dose de UV (fluxo radiante) foi igual 2160 Joules/m<sup>2</sup>, referente a 5 minutos de exposição direta no aparelho colimador de luz UV-C. A inativação completa do vírus foi confirmada pela falta de placas de vírus após ensaios da técnica de UFP. Todo o processo de isolamento do vírus foi realizado pela equipe da Universidade de São Paulo, coordenado pelo Dr. Edison Durigon. A produção do estoque viral e inativação do vírus foi realizada pela equipe da Universidade Federal de Minas Gerais coordenada pelo Dr. Mauro Teixeira, que nos cedeu gentilmente alíquotas do vírus inativado.

### **4.2.2. Anticorpos anti-SARS-CoV-2**

O vírus SARS-CoV-2 (linhagem B.1.1.28) foi isolado a partir de amostra de paciente testado na FUNED, cultivado em células Vero e à posteriori inativados com B-propionolactona. Uma vez comprovada a inativação viral por titulação, o vírus foi concentrado, purificado e em seguida liofilizado e utilizado numa preparação antigênica para a imunização de equinos. Os ciclos de imunização e coleta de plasma dos cavalos foram realizados na fazenda experimental da FUNED, sendo a produção de IgG anti-SARS-CoV-2 observada, por ELISA (ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática), durante a sangria exploratória dos animais. Após a obtenção do pool de plasma, as imunoglobulinas do lote experimental foram digeridas por um processo enzimático com pepsina e purificadas por precipitações salinas. O produto foi concentrado e o excesso de sal retirado por diálise em filtração tangencial, obtendo-se o soro concentrado a granel que tem como princípio ativo fragmentos f(ab)<sup>2</sup> da Imunoglobina G, com sítios de ligação ao antígeno, dissolvidos em solução salina 0,8 % e fenol 0,25 %. Ensaios *in vitro* realizados com este lote teste demonstraram alta produção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 (ensaios de ELISA), assim como alta capacidade neutralizante da

infecção em ensaios de placas com células infectadas (Ensaio de PRNT – Plaque reduction neutralization teste). Todo o processo foi realizado pela equipe da Funed, a partir de projeto de pesquisa coordenado pelo Dr. Sergio Caldas, que nos cedeu gentilmente alíquotas do soro processado e do plasma hiperimune.

#### **4.2.3. Vírus Mayaro**

O vírus Mayaro cepa Acre27 (número de acesso ao GenBank KM400591) foi utilizado como controle negativo nos experimentos do biossensor. A amostra do vírus foi gentilmente cedida pelo Professor Dr. Maurício Lacerda Nogueira da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP).

Células de rim de macaco verde africano – VERO, foram utilizadas para a produção e realização da titulação do vírus Mayaro. Essas células foram cultivadas em Meio DMEM High Glucose (DMEM – HG) (Sigma) suplementado com 5% de SFB, penicilina/estreptomicina (Sigma - 10.000UI/ml) e anfotericina B (Cultilab - 250µg/mL) em estufa a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>.

##### **4.2.3.1. Estoque viral**

O estoque de vírus foi produzido em garrafa média (75 cm<sup>2</sup>) contendo monocamada de células Vero que foi infectada com uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,01 com volume final de 2 ml de meio de cultura e ausência de SFB. A adsorção ocorreu em um período de 1 hora com homogeneização constante. Posteriormente, o meio foi completado e suplementado com 1% SFB. As células infectadas foram incubadas por 2 dias ou até o aparecimento de 90% de efeito citopático. Após esse período, o sobrenadante da infecção celular foi clarificado por centrifugação a 5000 rpm (Eppendorf 5804 R) por 5 minutos a 4 °C e logo em seguida o sobrenadante clarificado foi alíquotado e mantido em freezer -80 °C para posterior uso.

Para a utilização do vírus Mayaro, uma alíquota do vírus foi inativada por luz ultravioleta (UV). Para inativação, o vírus foi disperso em uma placa de cultura de células e uma lâmpada UV compacta foi colocada diretamente acima da placa por 30 minutos. A inativação completa do vírus foi confirmada pela falta de placas de vírus após ensaios da técnica de Unidades Formadoras de Placas (UFP).



#### **4.2.3.2. Titulação do estoque viral**

Para determinar o título viral foi realizada a técnica de contagem de Unidades Formadoras de Placas (UFP) de Dulbecco. Para isso,  $1 \times 10^6$  células/poço de células vero foram cultivadas em placas de seis poços e, quando a monocamada estava confluenta, foram adicionados a 5 poços 0,3 mL de diluições seriadas do vírus Mayaro realizadas em DMEM-HG 0% de SFB. No poço final, foram adicionados 0,3 mL de DMEM – HG 0% SFB, como controle negativo. Após 1h de adsorção, com homogeneização de 10 em 10 minutos, o meio foi removido e a cada poço foram adicionados 2 mL de meio 199 suplementado com 1,25% de carboximetilcelulose e 1,5% de SFB. A placa foi incubada a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 2 dias. Após esse período, as células foram fixadas em solução 10% de formol por 30 minutos. Desprezado o meio, os poços foram corados com solução de cristal violeta. O título foi expresso pelo número UFP obtido nas câmaras cujas diluições apresentaram entre 30 e 300 placas de lise, multiplicado pelo inverso da diluição, e convertido para UFP/mL.

#### **4.2.4. Síntese de nanobastões de ouro**

Nanobastões de ouro foram sintetizados pelo método mediado por semente utilizando ácido ascórbico ou hidroquinona como agentes redutores.

##### **4.2.4.1. Método com ácido ascórbico**

A solução semente foi preparada por meio da mistura de 5 mL de HAuCl<sub>4</sub> (0,005M), 5 mL de CTAB (0,2 M) e 0,6 mL de solução resfriada de NaBH<sub>4</sub> (0,01M) sob agitação magnética contínua, resultando em uma solução marrom-amarelada. A solução de crescimento foi obtida misturando 5 mL de solução HAuCl<sub>4</sub> (1M) a 5 mL de CTAB (0,2M) e 0,2 mL de AgNO<sub>3</sub> (0,004 M). Então, 0,07 mL de ácido ascórbico (0,0788 M) foram adicionados durante agitação magnética vigorosa. Nessa etapa o ácido ascórbico age como agente redutor e a solução altera a cor de amarelo intenso para transparente. Por fim, 0,012 mL da solução semente foi adicionado à solução recém-preparada para iniciar o crescimento dos nanobastões. A cor da solução se alterou gradualmente entre os primeiros 15-20 min sob agitação magnética, até se estabilizar em tom arroxeadado e foi mantida 27-30 °C por 24 horas sem agitação. O excesso de CTAB dos nanobastões foi retirado por centrifugação a 5.600 x g por 15 min duas vezes e redispersos em água deionizada.

#### 4.2.4.2. Método com hidroquinona

A solução semente foi preparada a partir de 5 mL de  $\text{HAuCl}_4$  (0,005M) adicionados a 5 mL de CTAB (0,2M) e 0,46 mL de solução básica resfriada de  $\text{NaBH}_4$  (0,01M) em 0,01M de NaOH sob agitação magnética contínua, resultando em uma solução marrom-amarelada. Para a preparação da solução de crescimento, foram adicionados 5 mL de solução  $\text{HAuCl}_4$  (0,05M), 5 mL de CTAB (0,1M) e 0,0115 mL de  $\text{AgNO}_3$  (0,1M) sob agitação magnética constante. A essa solução, foi adicionado 0,5 mL de hidroquinona (0,1M) sob agitação magnética manual até que ficasse transparente. Então, 0,16 mL da solução semente foi adicionado à solução recém-preparada para iniciar o crescimento dos nanobastões. Em torno de 15-20 min, sob agitação magnética, a cor da solução se alterou gradualmente até se estabilizar em tom arroxeadado e foi mantida sem agitação magnética a 27-30 °C por 24 horas. O excesso de CTAB dos nanobastões foi retirado por centrifugação a 5.600 x g por 15 min duas vezes e redispersos em água deionizada.

#### 4.2.5. Funcionalização com PEI

A Polietilenoimina (PEI) deve ser utilizada para que o resíduo amina de uma das extremidades se ligue ao ouro e o grupo amina ( $-\text{NH}_2$ ) da outra extremidade se ligue covalentemente ao grupo carboxila ( $-\text{COOH}$ ) da porção C-terminal do anticorpo (ZAPP et al., 2014). Para que ocorra a ligação dos grupos carboxila com as aminas é necessária uma reação de amidação por diimida. Por isso, é utilizado cloridrato de N-etil-N'-(3-dimetil-aminopropil) carbodiimida (EDAC) como agente acoplante e N-hidroxisuccinimida (NHS) como agente estabilizante, o qual converte os ácidos carboxílicos em ésteres ativos, que em seguida reagem com os grupos amina dos reagentes ligantes.

Para isso, 0,1 mL de solução de nanopartículas foi centrifugado a 6000 x g por 20 minutos, ressuspendido em 0,1 mL de PEI em água ultra-pura e incubado a temperatura ambiente por ultrassonicação para desestabilização do CTAB presente na superfície das nanopartículas. Em seguida, a solução foi novamente centrifugada a 6000 x g por 20 minutos e ressuspendida em 0,1 mL de anticorpo previamente preparado.

#### 4.2.6. Bioconjugação com imunoglobulinas

Após a incubação com PEI os NB foram funcionalizados com anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2 (0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Para conjugação com a PEI, a solução de imunoglobulina

foi previamente preparada de modo que a solução de anticorpo foi adicionada à 0,4M EDAC e 0,1M de NHS e Tampão fosfato (PBS 1X, pH 7,4 em água deionizada) para um volume final de 0,1 mL e depois, incubada por 30 minutos a 4°C. Ao final deste tempo, os NB foram novamente centrifugados a 6000 x g por 20 minutos e ressuspendidas em 0,1 mL de solução com vírus e lidos no espectrofotômetro.

#### **4.2.7. Ensaaios com vírus**

Para analisar a sensibilidade de detecção, amostras de SARS-CoV-2 foram diluídas de forma seriada em PBS para um volume final de 0,1 mL e depois adicionada ao biossensor. O vírus Mayaro foi utilizado como controle negativo (inativado) e foi diluído da mesma forma como realizado para o SARS-CoV-2. A reação ocorreu à temperatura ambiente por no máximo 30 minutos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados dos deslocamentos descritos são referentes a média calcula entre as triplicatas. Os gráficos de espectroscopia UV-VIS-NIR e da derivada representam uma das amostras.

#### **4.2.8. Tratamento das amostras**

Com o intuito de aumentar a disponibilidade das proteínas virais do SARS-CoV-2, amostras do vírus foram tratadas com Triton X-100 ou por aquecimento antes de serem adicionados no biossensor.

Para o tratamento com Triton X-100, foi pipetado a quantidade suficiente para que quando misturado na amostra de SARS-CoV-2 sua concentração fosse de 1% do volume final. Após sua adição, a amostra foi deixada incubando por 30 minutos antes de ser incubado com o biossensor.

Para o tratamento por calor, amostras de SARS-CoV-2 foram colocadas em um termobloco a 100 °C por 5 minutos. Após esse tempo, a amostra foi incubada com o biossensor.

#### **4.2.9. Caracterização dos nanobastões de ouro**

A caracterização óptica dos nanobastões foi realizada pelo espectrofotômetro UV-1800, SHIMADZU, no espectro visível e NIR de 400 a 1000 nm. Para as medidas, 0,1 mL dos NB foi adicionado a Cubetas de Quartzo (105.203-QS 10 mm) e lidos no

espectrofotômetro. As absorvâncias obtidas foram normalizadas e convertidas em gráficos pelo programa Origin 8.1 (Origin Lab®, USA).

Os dados de deslocamentos foram plotados no GraphPad Prism 7 e as diferenças entre os grupos analisados foram consideradas significantes quando o valor de P foi menor ou igual a 0,05 por meio do teste t de Student.

As medidas de Potencial Zeta ( $\zeta$ ) foram realizadas no aparelho Zetasizer Nano ZS (NanoSeries – Malvern) no Laboratório Multiusuários da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

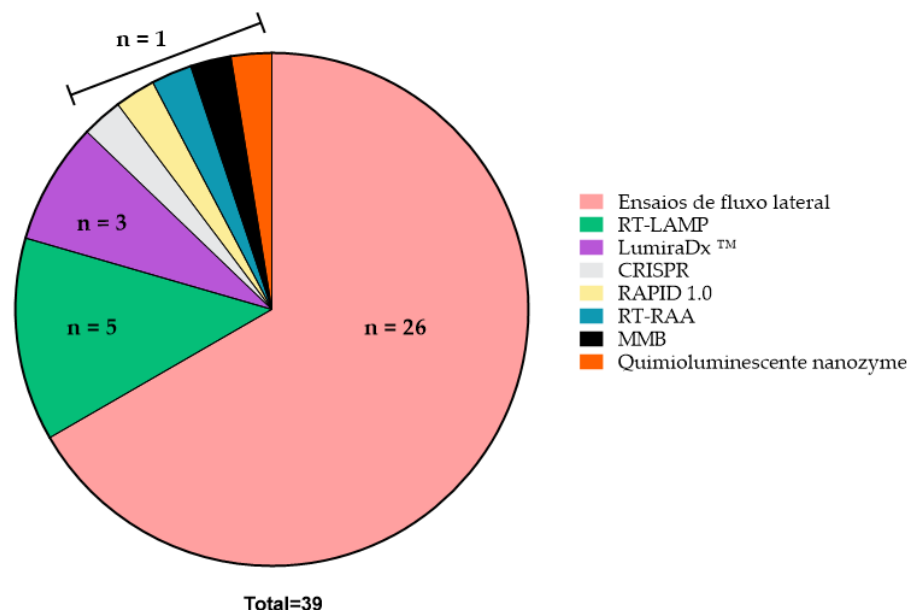
Para facilitar o entendimento, os resultados e discussão serão divididos em dois tópicos principais. No primeiro tópico (5.1.) serão expostos os resultados e a discussão da análise dos testes POC e RDT para SARS-CoV-2 nesses dois anos de pandemia. No segundo tópico (5.2.) serão descritos e analisados os resultados do desenvolvimento de um biossensor para SARS-CoV-2 usando nanobastões de ouro.

### **5.1. Análises de testes POC e RDT**

Um total de 2.135 milhões de publicações foram recuperadas das bases de dados, uma amostra robusta o suficiente para identificar os artigos relevantes sobre o tema abordado, como nosso estudo anterior do primeiro ano da pandemia (BORGES et al., 2021). Após a triagem dos títulos, resumos e/ou palavras-chave, 520 estudos foram selecionados e 52 foram escolhidos para revisão do texto completo. Os artigos selecionados nesta revisão foram publicados de 01 de novembro de 2020 a 30 de novembro de 2021.

#### **5.1.2. Testes de detecção direta**

Identificamos 30 testes rápidos que detectaram estruturas antigênicas e 9 que detectaram RNA SARS-CoV-2. Dentre os métodos de ensaio, 26 foram realizados por ensaios de fluxo lateral (considerando ensaios com ouro e fluorescência); 5 por Amplificação Isotérmica Mediada por Transcriptase Reversa (RT-LAMP); 1 por reverso em tempo real baseado em sonda de transcrição fluorescente (RT-RAA); 1 por repetições palindrômicas curtas com espaçamento regular agrupadas (CRISPR); 1 por protótipo de detecção impedimétrica portátil precisa em tempo real 1.0 (RAPID 1.0); e 3 por imunofluorescência microfluídica (LumiraDx™) (Figura 6). Além disso, dois outros estudos desenvolveram novas metodologias de diagnóstico, que são o biossensor de modulação magnética (MMB) e o teste de papel quimioluminescente nanozyme (Apêndice 1).

**Figura 6.** Métodos de ensaios utilizados para detecção direta do SARS-CoV-2

Nos estudos que relatam detecção direta, 37 relataram a sensibilidade e especificidade do teste, 11 estudos forneceram informações sobre a precisão do diagnóstico, e 2 estudos não revelaram nenhum desses parâmetros, mencionando apenas o limite de detecção (Apêndice I). Todos os estudos que relataram sensibilidade usaram variações de RT-PCR como padrões de referência para determinar a infecção por SARS-CoV-2.

A maioria dos estudos analisados foram ensaios baseados em fluxo lateral para detecção de antígeno viral. Entre os 26 estudos que relataram Ag-RDTs, apenas 10 atenderam aos requisitos mínimos de desempenho recomendados pela OMS de 80% de sensibilidade e 97% de especificidade (Figura 7 e Apêndice I).

Em geral, os estudos Ag-RDT usaram amostras de zaragatoas nasofaríngeas (NPS). Entretanto, dois deles utilizaram swabs nasais (CASSUTO et al., 2021; TINKER et al., 2021) um usou swabs de NPS/garganta (CHAIMAYO et al., 2020), um utilizou os NPs de ambos os swabs, como swabs nasais e salivares (MASIA et al., 2021); e três usaram swabs de NPS/orofaringe (OP) (AMER et al., 2021; MOCKEL et al., 2021; SINGH et al., 2021).

Diferenças notáveis foram observadas nos valores de sensibilidade entre os estudos que usaram amostras de swab nasal [20% (TINKER et al., 2021), 44,7% (MASIA et al., 2021) e >96% (CASSUTO et al., 2021)]. Da mesma forma, amostras de swab NPS/OP mostraram valores divergentes de sensibilidade entre os estudos [35,29% (AMER et al.,

2021), 75% (MOCKEL et al., 2021) e 78,2% (SINGH et al., 2021)]. Em amostras de saliva, a sensibilidade foi menor em comparação com amostras de NPS/swab de garganta [23,1% saliva (MASIA et al., 2021) contra >98% NPS/swab de garganta (CHAIMAYO et al., 2020)].

Sensibilidade abaixo do ideal também foi observada em amostras com baixas cargas virais (alto valor de Ct em RT-PCR) (Apêndice I) e em amostras pediátricas, quando comparadas com amostras de pacientes adultos (ALBERT et al., 2021; MERINO et al., 2021; SINGH et al., 2021; VILLAVERDE et al., 2021). Apenas dois estudos apresentaram valores de especificidade inferiores a 98% (64,2% e 83,3%) (AMER et al., 2021; RASTAWICKI et al., 2021).

Em relação a outros métodos de detecção direta, os ensaios RT-RAA, RT-LAMP e MMB relataram sensibilidade e especificidade >90%. Em estudos usando o teste de antígeno LumiraDx™ SARS-CoV-2, a especificidade foi >92%, e apenas no ensaio realizado por Krüger et al. a sensibilidade foi inferior a 90% (82,2%). No método proposto por Torres et al., a sensibilidade foi maior em amostras de saliva (100%) do que em swabs NPS/OP (83,5%). O contrário foi verificado para os valores de especificidade, com valores maiores nas amostras NPS/OP (100%) do que nas amostras de saliva (86,5%) (Tabela 1 do ANEXO I).

A acurácia diagnóstica foi relatada em apenas 11 estudos (Tabela 1 do ANEXO I), com valores superiores a 80%, exceto por um estudo que relatou 75,9% (Tabela 1 do ANEXO I), demonstrando que os testes desenvolvidos tiveram um bom desempenho na detecção de SARS-CoV-2. Por outro lado, as análises de reações cruzadas foram verificadas em apenas nove estudos, mostrando a necessidade de melhorar o desempenho diagnóstico e as informações fornecidas sobre eles.

Diferentes patógenos foram considerados, como Rhinovirus (CARBONELL-SAHUQUILLO et al., 2021; KRUGER et al., 2022), Enterovirus (CARBONELL-SAHUQUILLO et al., 2021), Adenovirus (KRUGER et al., 2022; LI, F., et al., 2021), Bocavirus (KRUGER et al., 2022), Influenza A (KRUGER et al., 2022; LI, F., et al., 2021; LOU et al., 2021; LIU et al., 2020; MARGULIS et al., 2021; TINKER et al., 2021; TORRES et al., 2021), Influenza B (KRUGER et al., 2022; LI, F., et al., 2021; MARGULIS et al., 2021; TINKER et al., 2021; TORRES et al., 2021), Metapneumovirus (KRUGER et al., 2022), *Parainfluenza virus* (KRUGER et al., 2022), *Respiratory syncytial virus* (KRUGER et al., 2022; MARGULIS et al., 2021), Herpes simplex virus-2 (TORRES et al., 2021), *Mycoplasma pneumoniae* (KRUGER et al.,

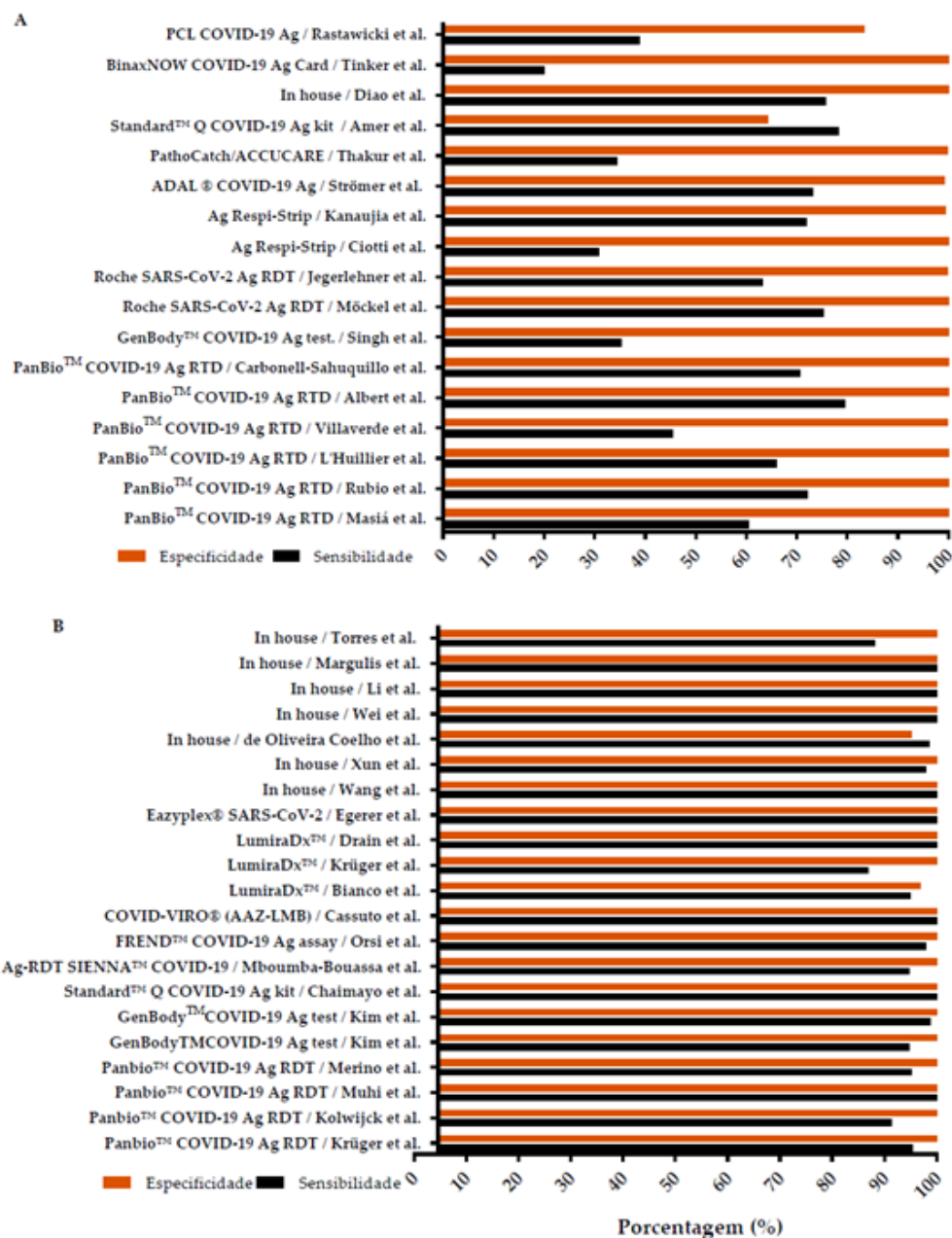
2022), *Staphylococcus aureus* (KRUGER et al., 2022), e *Streptococcus sp.* (KRUGER et al., 2022).

Entre esses estudos, cinco avaliaram a reatividade cruzada com outros coronavírus: HCoV-229E (LIU et al., 2020; TORRES et al., 2021; XUN et al., 2021), HCoV-229E (TORRES et al., 2021; XUN et al., 2021), HCoV-HKU1 (LIU et al., 2020) e HCoV-NL63 (XUN et al., 2021), Murine hepatitis virus (TORRES et al., 2021), SARS-CoV (LIU et al., 2020; WEI et al., 2021; XUN et al., 2021) e MERS-CoV (LIU et al., 2020; WEI et al., 2021; XUN et al., 2021). Apenas um estudo relatou reação cruzada (CARBONELL-SAHUQUILLO et al., 2021). Este relatório analisou sete amostras com resultados discordantes entre RT-PCR (resultados positivos) e Ag-RDT (resultados negativos) por um ensaio de PCR multiplex visando vírus respiratórios comuns. Curiosamente, dois apresentaram resultado positivo para Rhinovirus/Enterovirus (CARBONELL-SAHUQUILLO et al., 2021).

A sensibilidade e especificidade desses testes são mostradas na Figura 7.



**Figura 7.** Sensibilidade e especificidade dos testes diretos. A) testes diagnósticos diretos com sensibilidade < 80% B) testes diagnósticos diretos com sensibilidade ≥ 80%. Testes que não apresentaram valores de sensibilidade e especificidade não foram adicionados.

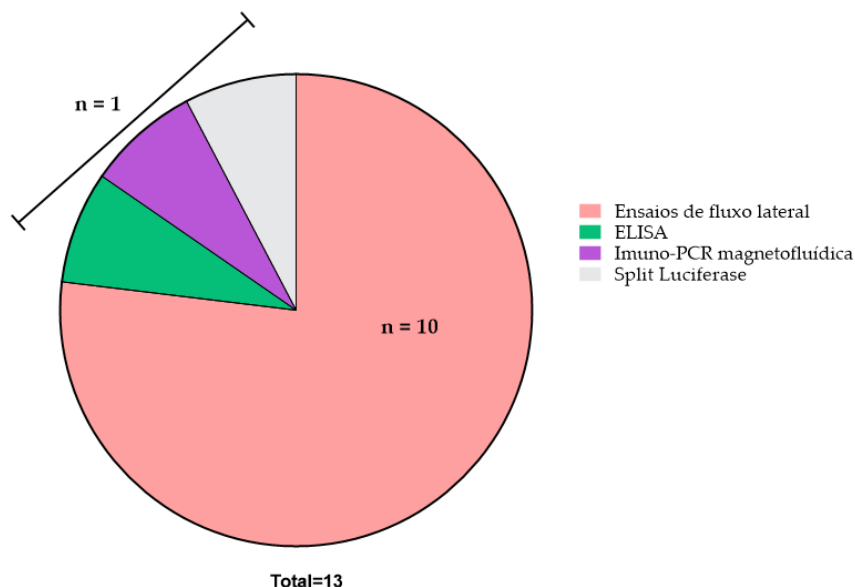


### 5.1.3. Testes de detecção de imunoglobulinas

Em relação aos testes de detecção de imunoglobulinas, identificamos nove estudos que avaliaram os níveis de IgM e IgG, três avaliando apenas IgG e um avaliando IgA, IgG e IgM (Tabela 2 do ANEXO I). Um total de 10 testes de anticorpos foram realizados por ensaios de fluxo lateral (considerando ensaios de ouro e fluorescência), um por imunoenensaio enzimático eletroquímico (ELISA), um por

plataforma de imuno-PCR magneto fluídica, e um pelo sensor de anticorpos Split Luciferase (spLUC) (Figura 8).

**Figura 8.** Métodos de ensaios utilizados para detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2



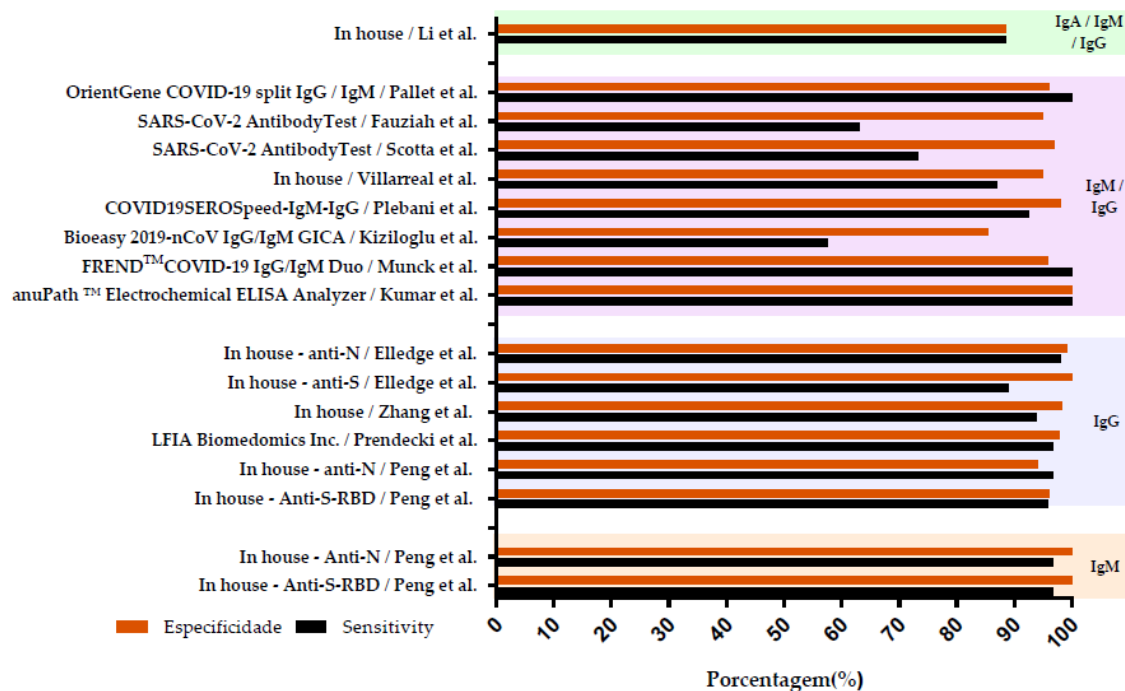
Entre os 13 estudos selecionados, 10 apresentaram valores elevados de sensibilidade e especificidade (>80%), e um relatou 100% de sensibilidade e especificidade. Valores de sensibilidade mais baixos foram observados nos primeiros dias após a infecção do que nos dias pós-infecção. A acurácia foi relatada em três estudos e valores inferiores a 80% foram encontrados apenas no estudo de Fauziah et al. A acurácia de 100% foi verificada no estudo de Kumar et al. (Apêndice I).

Reações cruzadas foram analisadas em seis estudos para *Mycoplasma pneumoniae* (LI, K., et al., 2021; PLEBANI et al., 2021), *Toxoplasma gondii* (PLEBANI et al., 2021), vírus do sarampo (PLEBANI et al., 2021), citomegalovírus (PLEBANI et al., 2021), HIV (PLEBANI et al., 2021), vírus da hepatite B (PLEBANI et al., 2021), vírus da dengue (FAUZIAH et al., 2021; VILLARREAL et al., 2021), Febre tifóide (FAUZIAH et al., 2021), Influenza vírus (ELLEDDGE et al., 2021), pacientes com múltiplos autoanticorpos (PLEBANI et al., 2021), pacientes com infecções do trato respiratório (LI, K., et al., 2021) e pacientes com tuberculose pulmonar e tuberculose latente (VILLARREAL et al., 2021). Outros coronavírus foram testados apenas no estudo de Elledge et al. (2021). Reações cruzadas foram encontradas em amostras com *Mycoplasma pneumoniae* (LI, K., et al., 2021; PLEBANI et al., 2021), *Toxoplasma gondii* (PLEBANI et al., 2021), vírus da dengue (VILLARREAL et al., 2021),

al., 2021) e em amostras de pacientes com infecções do trato respiratório (LI, K., et al., 2021).

A sensibilidade e especificidade desses testes são mostradas na Figura 9.

**Figura 9.** Sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos POC e RDT para detecção de anticorpos contra SARS-CoV-2.



A pandemia de COVID-19 tem sido um desafio global de saúde pública há mais de dois anos. A necessidade de triagem rápida da infecção por SARS-CoV-2 levou a uma busca constante pelo desenvolvimento de testes diagnósticos (UNICEF, 2021; WHO, 2021). Portanto, nosso objetivo foi realizar uma revisão sistemática de estudos de testes POC e RDT para COVID-19 um ano após nossa primeira análise para verificar se houve progresso na pesquisa dos testes considerando as descobertas sobre SARS-CoV-2.

Neste trabalho, selecionamos 52 estudos que relataram o uso de testes POC e RDT para diagnosticar COVID-19. Os dados foram divididos em testes POC e RDT para detecção direta de SARS-CoV-2 e testes sorológicos POC e RDT para detecção de anticorpos contra SARS-CoV-2.

A maioria dos estudos POC e RDT selecionados mostrou boa sensibilidade e especificidade. Nossos resultados indicam bom desempenho para amostras de saliva, swabs NPS/OP e amostras de garganta, sugerindo que essas amostras podem ser usadas

como alternativa ao NPS ou swabs nasais comumente usados para o teste de diagnóstico de SARS-CoV-2 (MASIA et al.,2021).

Em relação às amostras pediátricas, encontramos valores de sensibilidade inferiores quando comparados com amostras de pacientes adultos (ALBERT et al., 2021; MERINO et al., 2021; SINGH et al., 2021; VILLAVERDE et al., 2021). Além disso, a idade foi associada ao desempenho do teste de antígeno, independentemente dos valores de Ct e duração dos sintomas (MASIA et al.,2021). Embora as crianças sejam mais propensas a serem assintomáticas ou apresentarem sintomas leves, elas podem transmitir o SARS-CoV-2, tornando a triagem essencial para ajudar a conter a propagação do vírus (GAYTHORPE et al., 2021).

A menor sensibilidade também foi observada em amostras que apresentaram altos valores de Ct no RT-PCR (Apêndice I), indicando uma menor carga viral. Nas infecções por SARS-CoV-2, a carga viral atinge o pico na primeira semana após o início dos sintomas no trato respiratório superior. Os testes Ag-RDTS e de amplificação de ácidos nucleicos devem funcionar melhor durante este período (CEVIK et al., 2021; CDC, 2022). Embora os testes diagnósticos sejam geralmente realizados quando os sintomas aparecem (carga viral alta), há relatos na literatura de indivíduos infectados vacinados com carga viral reduzida (LEVINE-TIEFENBRUN et al., 2021; MCELLISTREM et al., 2021; PUHACH, et al., 2022). Assim, indivíduos vacinados e infectados podem levar à transmissão oculta do vírus.

Em relação aos testes sorológicos POC e RDT para detecção de anticorpos, a maioria apresentou valores de sensibilidade e especificidade elevados, indicando bom desempenho clínico. No entanto, observamos valores de sensibilidade mais baixos nos testes que realizaram a análise nos primeiros dias após a infecção por SARS-CoV-2 do que nos estudos pós-infecção (PALLETT et al., 2021; VILLARREAL et al., 2021; MUNCK et al., 2022; SCOTTA et al., 2022).

A menor sensibilidade verificada pode estar relacionada ao tempo necessário para desenvolver anticorpos. Embora a soroconversão de IgM e IgG possa ocorrer simultaneamente ou sequencialmente e os títulos de anticorpos possam estabilizar após seis dias (LONG et al., 2020), a maioria dos pacientes não produz uma resposta de anticorpos até a segunda semana após o início dos sintomas (WHO, 2020c).

Assim, para um diagnóstico mais preciso da COVID-19, os testes baseados na detecção direta são preferíveis nos primeiros dias de sintomas, cerca de 3 a 7 dias de infecção, e os testes de anticorpos devem ser utilizados após esse período devido à sua

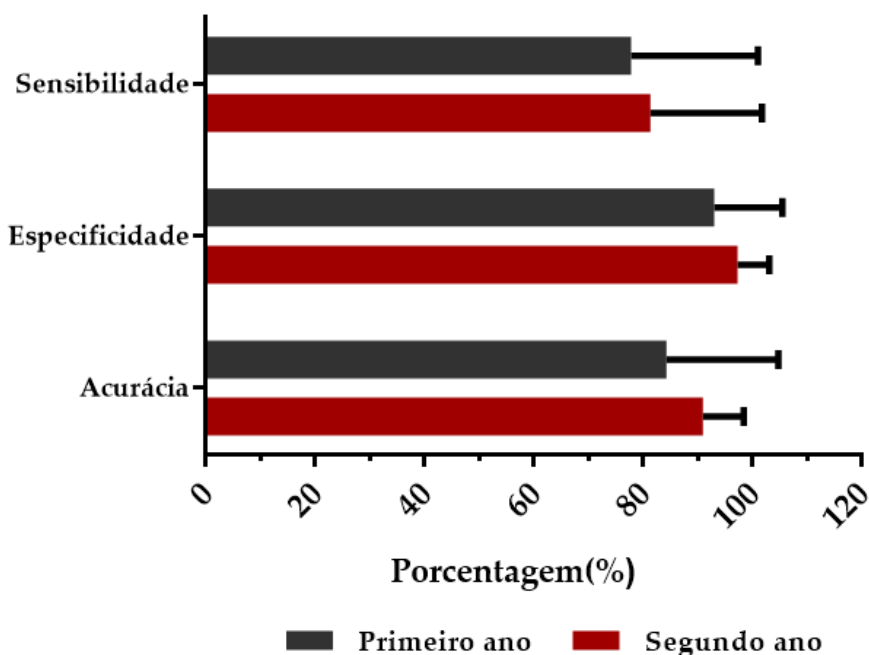
maior sensibilidade (KIZILOGLU et al., 2021; WHO, 2021). Além disso, a combinação de técnicas pode aumentar a sensibilidade no diagnóstico da infecção por SARS-CoV-2 (GUO et al., 2020; KIZILOGLU et al., 2021; De CARLO et al., 2020).

Por outro lado, é preocupante que apenas alguns estudos tenham relatado ensaios de reação cruzada. Embora muitos fabricantes tenham testado a reação cruzada para diferentes patógenos e apresentado dados de baixa similaridade entre as proteínas do SARS-CoV-2 e outros coronavírus humanos (usados para fabricação), a reação cruzada não é comumente abordada. Reatividade cruzada foi relatada em casos de COVID-19 e Dengue (FACCINI-MARTINEZ, et al., 2020; HUBER et al., 2021; MASYENI et al., 2021; STEINHARDT et al., 2021), tanto na sorologia para COVID-19 em pacientes com Dengue quanto na sorologia para Dengue entre pacientes com COVID-19 (LUSTIG et al., 2020).

Além disso, a coinfeção entre SARS-CoV-2 e outros patógenos, como influenza e vírus da dengue, foi relatada (CUADRADO-PAYAN et al., 2020; FAN et al., 2020; KONALA et al., 2020; LANSBURY et al., 2020; OZARAS et al., 2020; SARDAR et al., 2020; VERDUYN et al., 2020; WANG et al., 2021). Os sintomas clínicos semelhantes aos do SARS-CoV-2 e outras doenças febris favorecem o diagnóstico errado. O diagnóstico incorreto ou tardio pode afetar o manejo clínico, exacerbar as complicações e aumentar a mortalidade. Portanto, é essencial identificar as coinfeções rapidamente. O teste para SARS-CoV-2 em áreas com surtos sobrepostos não é suficiente para descartar a possibilidade de coinfeção, sendo necessários testes de PCR para confirmar a infecção.

Em relação aos achados de nosso primeiro estudo (BORGES et al., 2021), mais 117 estudos foram publicados e mais 30 ensaios foram testados em um ano. Da mesma forma, a reação cruzada foi avaliada em 13,05% dos estudos no primeiro ano analisado e 28,85% no segundo ano. Embora a porcentagem de artigos que relataram acurácia tenha permanecido semelhante (26,09% em 2020 e 26,93% em 2021), os valores de acurácia obtidos aumentaram. Da mesma forma, os parâmetros de sensibilidade e especificidade foram melhorados. No entanto, não foi observada diferença estatística (Figura 10).

**Figura 10.** Comparação da sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes sorológicos POC e RDT entre o primeiro e o segundo ano da pandemia de COVID-19. O teste de Shapiro-Wilk's foi utilizado para avaliar a normalidade apresentada pelo grupo. Os testes de Kruskal-Wallis foram realizados para comparar as medianas de grupos múltiplos, considerando a significância do valor de  $p < 0,05$ . Nenhuma diferença estatística foi observada.



Vários fatores podem estar relacionados ao desempenho heterogêneo dos exames, como a qualidade do esfregaço individual, se a amostra é fresca ou não, as condições de armazenamento da amostra, local anatômico da coleta, carga viral da amostra, dia de início de sintomas, entre outros (ALBERT et al., 2021; KIM et al., 2021; PARVU et al., 2021). Esses problemas dificultam a comparação direta dos testes.

Também explica porque são observadas tantas divergências de desempenho relatadas por estudos ou fabricantes de testes. Ainda encontramos poucos ensaios que revelaram a precisão dos testes, levantando incertezas sobre a precisão dos testes COVID-19 POC e RDT.

Considerando a importância de um diagnóstico preciso, esperávamos encontrar mais estudos avaliando reações cruzadas com outros patógenos, principalmente com coronavírus endêmicos, neste segundo ano da pandemia.

Acreditamos que os testes de próxima geração devem incorporar análises filogenéticas e/ou estruturais para selecionar os antígenos usados em seu processo de fabricação. Por exemplo, no primeiro semestre da pandemia, foram relatados 45 epítomos com mutações no antígeno principal do SARS-CoV-2 (GONÇALVES et al., 2022), denotando a necessidade do uso preventivo de antígenos com variantes para o desenvolvimento de sorologias.

Com a infecção de centenas de milhões de pessoas, as mutações tornaram-se muito mais frequentes, chegando a mais de 50 ocorrências apenas na proteína *spike* da variante Omicron, que é responsável por uma fuga robusta das etapas de neutralização (DEJNIRATTISAI et al., 2022). Portanto, a incorporação de mutações importantes em epítomos deve ser o foco principal no desenvolvimento de testes que utilizem anticorpos/antígenos.

Embora os testes POC e RDT ofereçam várias vantagens e desempenhem um excelente papel no manejo do COVID-19, nossos achados corroboram que os testes POC e RDT ainda precisam de validação adicional em relação à precisão do teste e reatividade cruzada com outros patógenos (FDA, 2021).

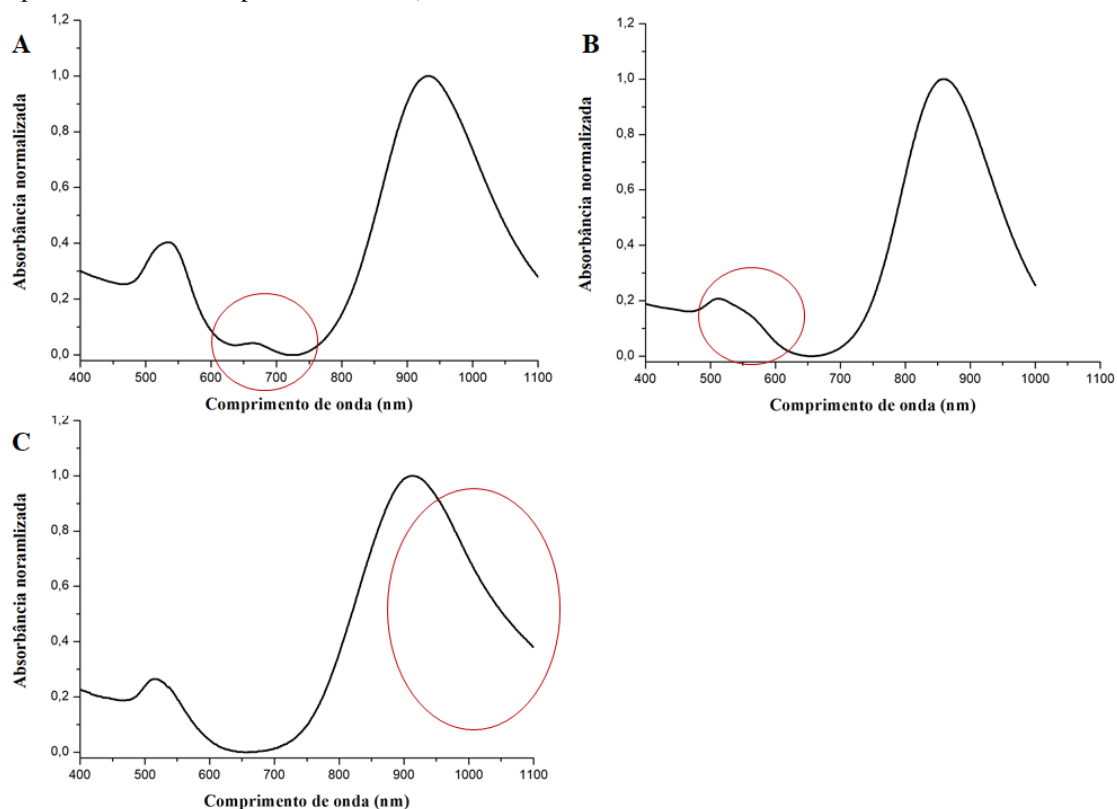
No geral, identificamos algumas limitações nos estudos analisados: números de amostra discrepantes para validações, diferenças nas amostras utilizadas e um baixo número de estudos avaliando acurácia e reatividade cruzada. Este trabalho também apresenta limitações: não foi possível realizar uma meta-análise devido à variabilidade dos métodos e resultados encontrados nos estudos.

## 5.2. Biossensor de nanobastões de ouro

### 5.2.1. Síntese de nanobastões de ouro

Ao longo do desenvolvimento desse trabalho mais de 92 processos de síntese de NBs foram realizados. No processo de estabelecimento de metodologia, diversas sínteses não apresentaram formação adequada até que fossem encontrados os parâmetros apropriados. Alguns exemplos desse processo são mostrados na Figura 9. Na figura 9A é observado o espectro de absorção na região de 400 a 1100 nm de um subproduto denominado de *'Dog bones'* ou *'dumbbells'*, o qual está relacionada ao pH da solução de crescimento, à temperatura da reação ou à alta concentração do agente redutor, os quais podem aumentar a taxa de reação de síntese, gerando esse padrão de crescimento de ouro indesejado nas extremidades dos NB. Na Figura 11B, o pequeno “ombro” observado pode estar relacionado a pequenas diferenças na forma das hastes e também a impureza. Na Figura 11C a assimetria vista pode ser indicativa de polidispersidade de tamanho e proporção ou leve agregação (HENSON; HARRIS; HOMAN, 2017).

**Figura 11.** Espectroscopia de UV-VIS-NIR com absorbância normalizada das sínteses de nanobastões de ouro com subprodutos. A) Dentro do círculo vermelho se observa uma banda relativa a síntese com um subproduto denominado de *'Dog bones'* ou *'dumbbells'*. B) Dentro do círculo vermelho se observa um pequeno “ombro” no espectro do NB. C) Dentro do círculo vermelho se observa uma banda assimétrica.



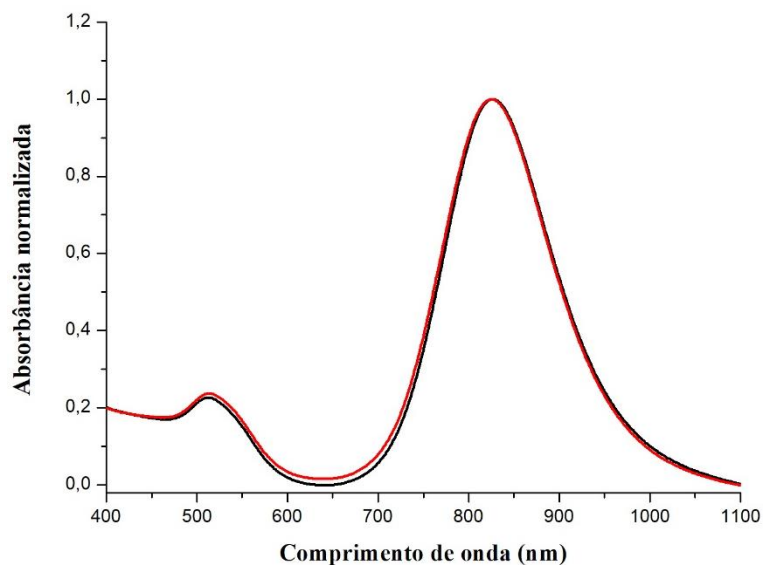


Para contornar esses problemas, estabeleceu-se a lavagem de todas as vidrarias com água régia (3:1– HCl/HNO<sub>3</sub>) antes do uso. Esta solução pode dissolver quaisquer partículas metálicas residuais que possam interferir na síntese. Adotou-se também a preparação fresca de todas as soluções e o ato de mantê-las em frascos selados e protegidos da luz. Para a produção da solução semente, estabeleceu-se que os reagentes fossem adicionados em temperaturas de 27–30 °C e em agitação magnética constante. Depois do tempo determinado para a agitação, a solução semente seria mantida em 25 °C por até duas horas. Já para a solução de crescimento, durante todo o processo a temperatura foi mantida entre 27 e 30 °C e em agitação magnética constante. Após a adição da solução semente, a temperatura foi mantida a 30 °C (RIBEIRO, 2018). Além disso, o tempo e a ordem de adição dos reagentes foram padronizados.

A maioria das sínteses mediadas por sementes utilizam o ácido ascórbico como agente redutor, no entanto, o ácido ascórbico pode tornar o crescimento de NB difícil de controlar, e pode acarretar aparecimento de algumas estruturas não bastonetes. Diante disso, resolvemos utilizar a hidroquinona como agente redutor. A hidroquinona pode reduzir quase quantitativamente os íons de ouro, permitindo a produção de maior quantidade de NB (PICCIOLINI et al., 2016). A utilização de hidroquinona em vez de ácido ascórbico parece diminuir a sensibilidade da síntese de nanobastões à concentração dos demais reagentes, aumentando assim a confiabilidade dessa técnica (ZUBAREV; VIGDERMAN, 2013).

Após numerosos experimentos com mudanças nos parâmetros, conseguimos encontrar as condições propícias para uma síntese reprodutível que foram descritas no tópico ‘4. Metodologia’ e pode ser ilustrado na Figura 12.

**Figura 12.** Espectroscopia de UV-VIS-NIR com absorvância normalizada de duas sínteses de nanobastões de ouro após padronização. Linha em preto representa a síntese 1 e linha vermelha representa a síntese 2 que foi realizada em dia diferente.



### 5.2.2. Armazenamento

Além das condições de síntese avaliamos também a melhor forma de armazenar os NB. Kumar et al. (2018), observaram que alguns NB podem agregar mais rapidamente à temperatura ambiente. Já no trabalho de Koepl et al. (2010), os NB permaneceram estáveis à temperatura ambiente ou em geladeira. Diante disso, avaliamos os NB em três condições diferentes de armazenamento: (1) em estufa do tipo B.O.D. a uma temperatura controlada de 28 °C (28°); (2) em geladeira (4°); (3) em temperatura ambiente (T.A.). A caracterização das medidas dos NB foi realizada após um mês e novamente um ano após a síntese por meio da técnica de LSPR utilizando um espectrofotômetro UV-Vis.

Como as avaliações de Kumar et al. (2018) e Koepl et al (2010) foram realizadas em NB sintetizados usando o ácido ascórbico como agente redutor e, a síntese estabelecida em trabalho foi usando hidroquinona, resolve utilizar duas sínteses de NB com agente redutor diferente. O NB1 corresponde aos NB em que o agente redutor usado na síntese foi o ácido ascórbico, e o NB5 corresponde aos NB em que o agente redutor utilizado na síntese foi a hidroquinona.

Antes de serem armazenados, os NB foram centrifugados e redispersos em água para remoção da solução de crescimento. A remoção da solução de crescimento faz-se necessária, pois esta contribui para o crescimento lento e contínuo dos NB. Após a

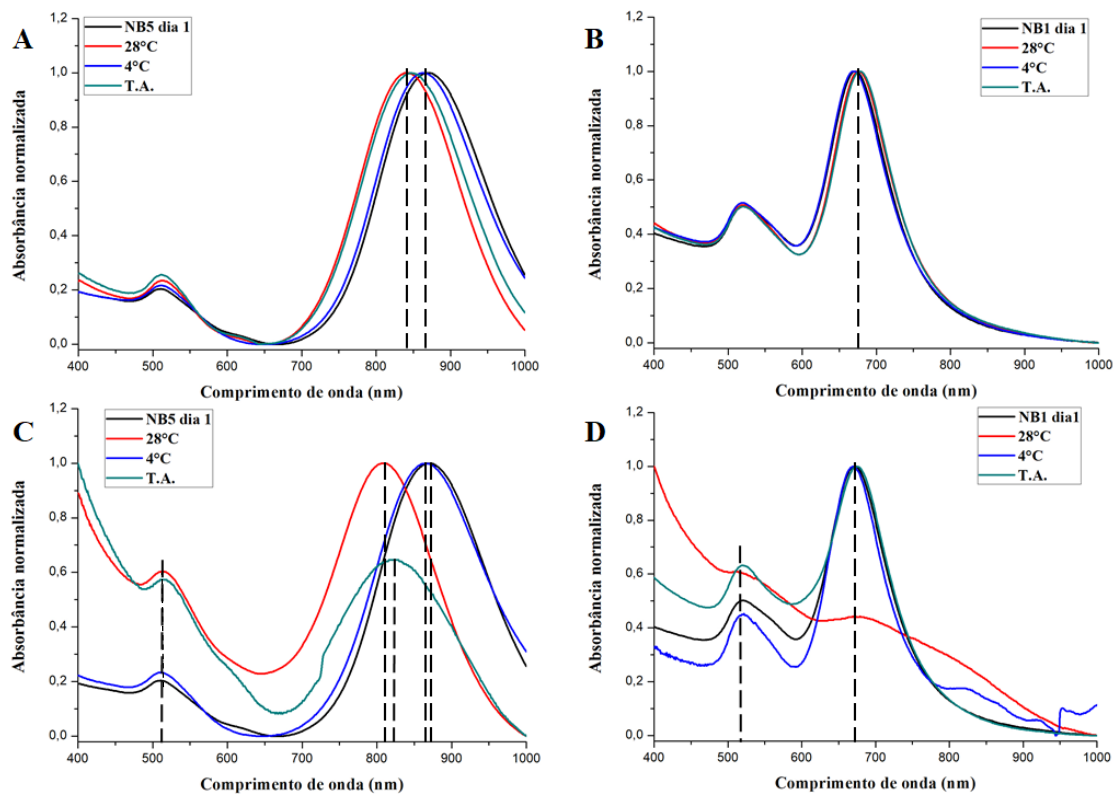
centrifugação, o NB1 e o NB5 foram então armazenados nas três condições diferentes citadas.

A Figura 13 A e C apresentam os espectros do NB5 durante 1 mês e 1 ano e a Figura 13 B e D apresentam os espectros do NB1 durante 1 mês e 1 ano respectivamente. A Figura 14 apresenta os deslocamentos da banda longitudinal dos NB ao longo do tempo.

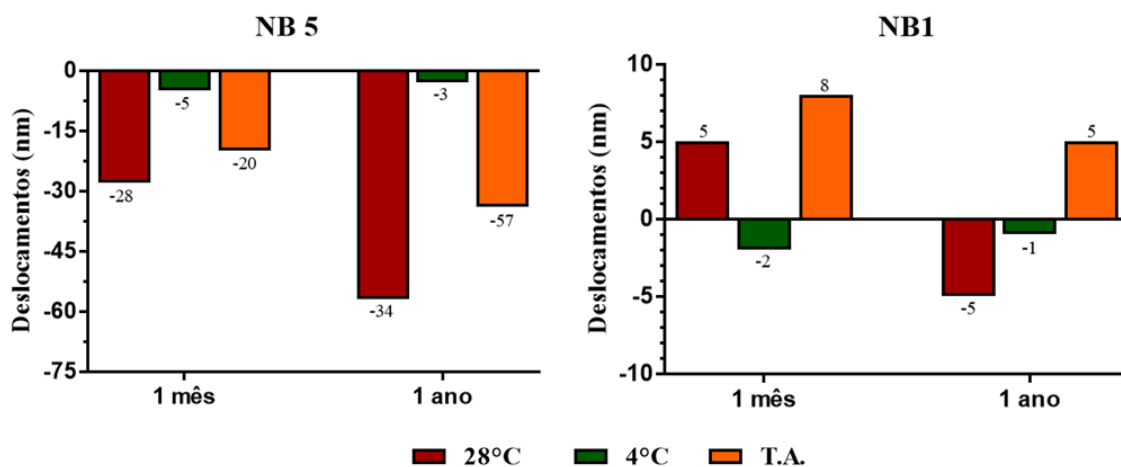
Após um mês da síntese, as alíquotas de NB5 armazenado em B.O.D., geladeira e em temperatura ambiente apresentaram mudanças significativas (maiores que 3nm) no máximo da banda longitudinal, apresentando deslocamentos de -28 nm, -5 nm e -20 nm, respectivamente. Depois de um ano, somente a alíquota do NB5 armazenado em geladeira não sofreu mudanças significativas no máximo de absorção, apresentando deslocamento de 3 nm da banda longitudinal e -3 nm na banda transversal. Já quando armazenadas em B.O.D. e em temperatura ambiente, os deslocamentos da banda longitudinal foram de -57 nm e -34 nm, respectivamente. Ainda, a alíquota de NB5 armazenada em temperatura ambiente sofreu deslocamento de -6 nm na banda transversal, enquanto a alíquota armazenada em B.O.D. apenas 1 nm.

Com relação às alíquotas do NB1, foram observados deslocamentos da banda longitudinal de 5 nm, -2 nm e 8 nm quando as alíquotas foram armazenadas em B.O.D., geladeira e em temperatura ambiente, respectivamente, após 1 mês da síntese. Ao final de um 1 ano, a alíquota de NB1 armazenada em B.O.D. agregou. Quando armazenada em geladeira, o deslocamento do máximo de absorção da banda longitudinal foi de -1 nm e da banda transversal de 3 nm, enquanto para as alíquotas armazenadas em temperatura ambiente não houve deslocamento da banda transversal e da banda longitudinal foi de -5nm. No geral, as alíquotas de NB1 se mostraram mais estáveis ao longo do tempo em relação às alíquotas de NB5.

**Figura 13.** Espectro de absorção para as amostras de nanobastões de ouro em diferentes condições de armazenamento. As imagens A e C mostram os espectros dos NB5 no período de um mês e um ano, respectivamente. As imagens B e D mostram os espectros dos NB1 no período de um mês e um ano, respectivamente. Linhas em preto representam o respectivo NB sintetizado no dia. Linhas em vermelho representam o deslocamento na condição de armazenamento a temperatura ambiente (28°C), linhas verdes em geladeira (4°C) e em laranja em temperatura ambiente (T.A.).



**Figura 14.** Deslocamentos da banda longitudinal dos nanobastões de ouro gerados após diferentes condições de armazenamento. A imagem A representa os deslocamentos da banda longitudinal dos NB5 após um mês e um ano após a síntese nas diferentes condições de armazenamento e a imagem B representa os deslocamentos da banda longitudinal dos NB1 após um mês e um ano após a síntese nas diferentes condições de armazenamento. Barras em vermelho representam o deslocamento na condição de armazenamento a temperatura ambiente (28°C); verdes em geladeira (4°C) e laranjas em temperatura ambiente (T.A.).

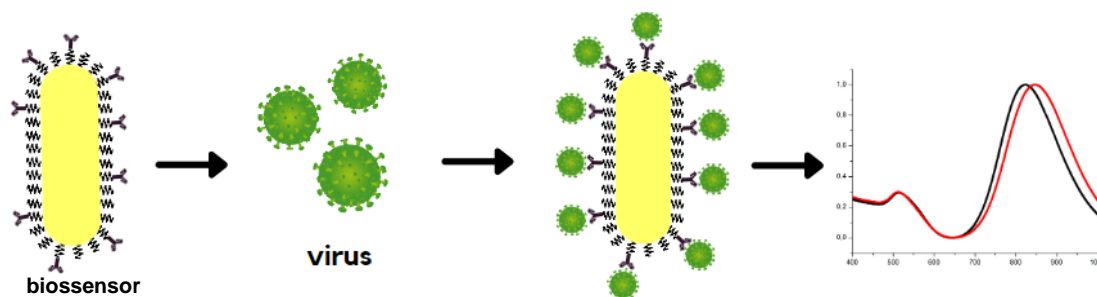


Perante esses resultados, a melhor forma de armazenar os NB sintetizados em nosso laboratório, independente do agente redutor, é na geladeira, uma vez que foi a condição de armazenamento em que foi observada uma menor mudança no máximo de absorção das bandas longitudinal e transversal ao longo do tempo, caracterizando certa estabilidade na síntese.

### 5.2.3. Construção do biossensor

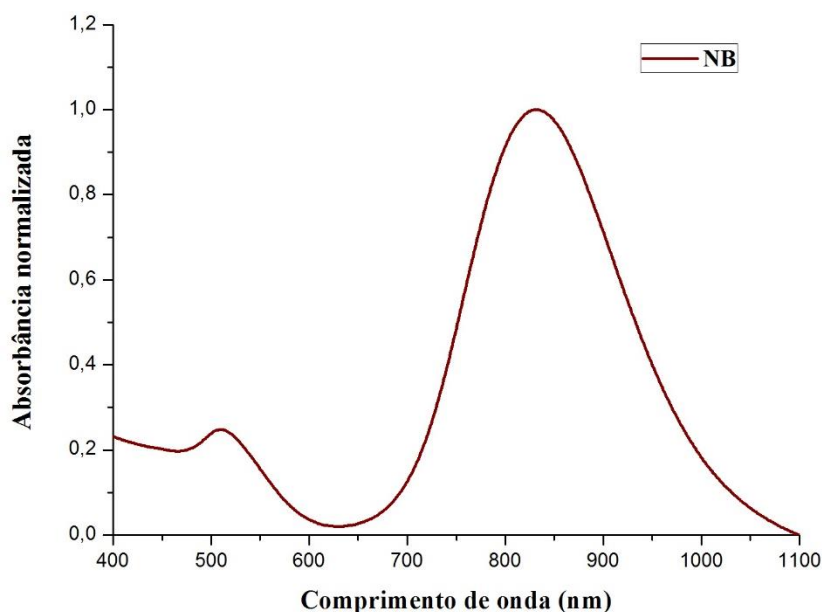
Nessa etapa do trabalho, demonstramos o desenvolvimento de um biossensor de NB para a detecção de SARS-CoV-2. A Figura 15 representa o desenho esquemático do funcionamento geral dos biossensores de NB que foram propostos neste trabalho.

**Figura 15.** Representação esquemática da estratégia de funcionamento do biossensor proposto. Após funcionalizar a superfície do nanobastão de ouro com polietilenoimina e anticorpos, o biossensor estará pronto para uso. Uma alíquota de vírus é adicionada no biossensor e deixada incubando por no máximo 30 minutos. Após o tempo de incubação é feita a leitura no espectrofotômetro e analisado o deslocamento da banda LSPR.



Os NB utilizados no presente trabalho foram sintetizados pelo método mediado por semente usando hidroquinona como agente redutor. A confirmação da formação de bastões foi dada pela espectroscopia de UV-visível a qual foi observada a banda transversal (505 nm) e a banda longitudinal (830 nm) que confere a característica de bastonetes (Figura 16). A razão de aspecto do NB (4,4) foi calculada conforme relato por Gans (1915) e expressa na equação 1.

$$\text{Equação 1: } \lambda \text{ max} = 95 \cdot AR + 420$$

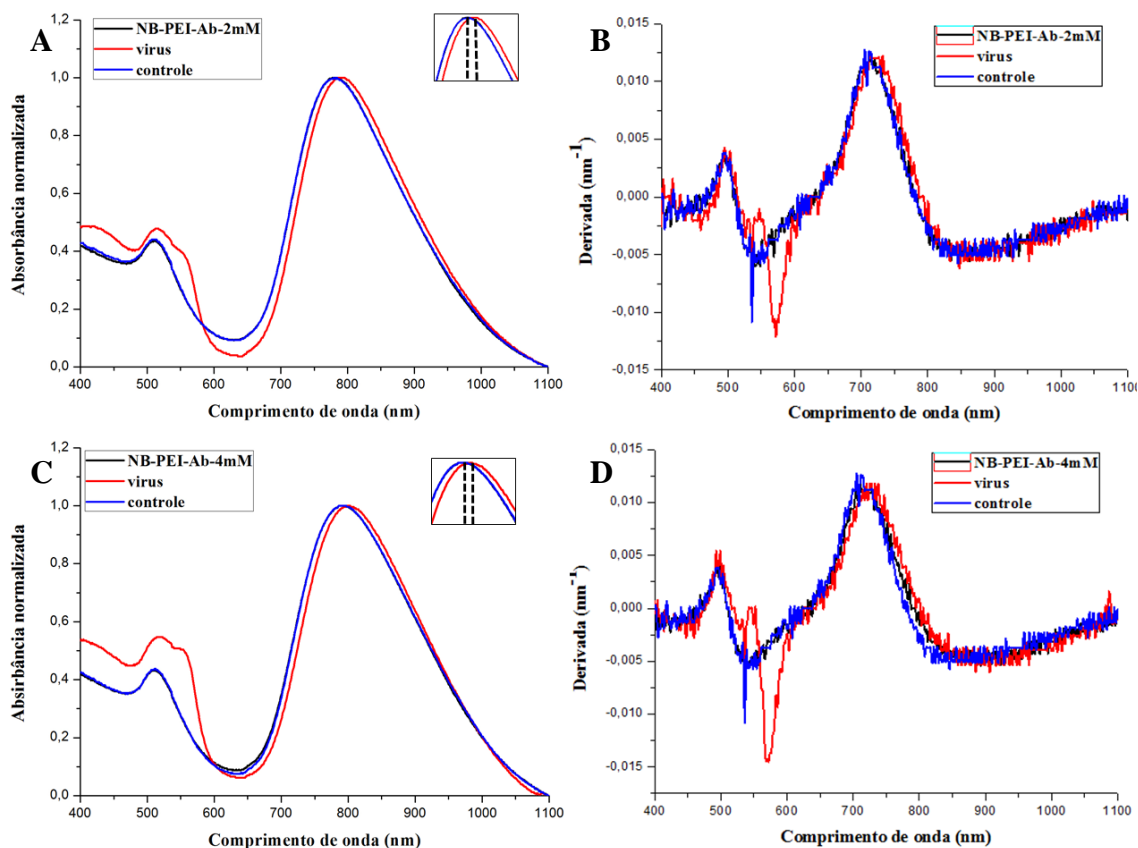
**Figura 166.** Espectroscopia de UV-VIS-NIR do NB usado para construção do biossensor de SARS-CoV-2.

De modo a modificar a superfície dos NB para a ligação de anticorpos específicos, os NB foram funcionalizados com PEI. Em experimentos anteriores realizados em nosso laboratório, observamos que em NB com AR menores, em torno de 3, a melhor concentração da PEI foi de 2mM (DIAS, 2018), já para NB com AR maiores, em torno de 5, a melhor concentração da PEI foi de 4mM (RIBEIRO, 2019). Diante disso, experimentos preliminares testando as duas concentrações de PEI em NB com AR entorno de 4 foram realizados. Na Tabela 1 estão plotados os dados de deslocamentos das bandas de absorção dos biossensores montados. A Figura 17A mostra o gráfico de absorvância e a Figura e 17B o gráfico das derivadas dos biossensores construídos com diferentes concentrações de PEI.

**Tabela 1.** Deslocamentos da banda longitudinal do NB funcionalizado com diferentes concentrações de PEI

Biossensor	Deslocamentos (nm)	
	Amostra alvo	Controle
PEI 2mM	13	1
PEI 4mM	9	0

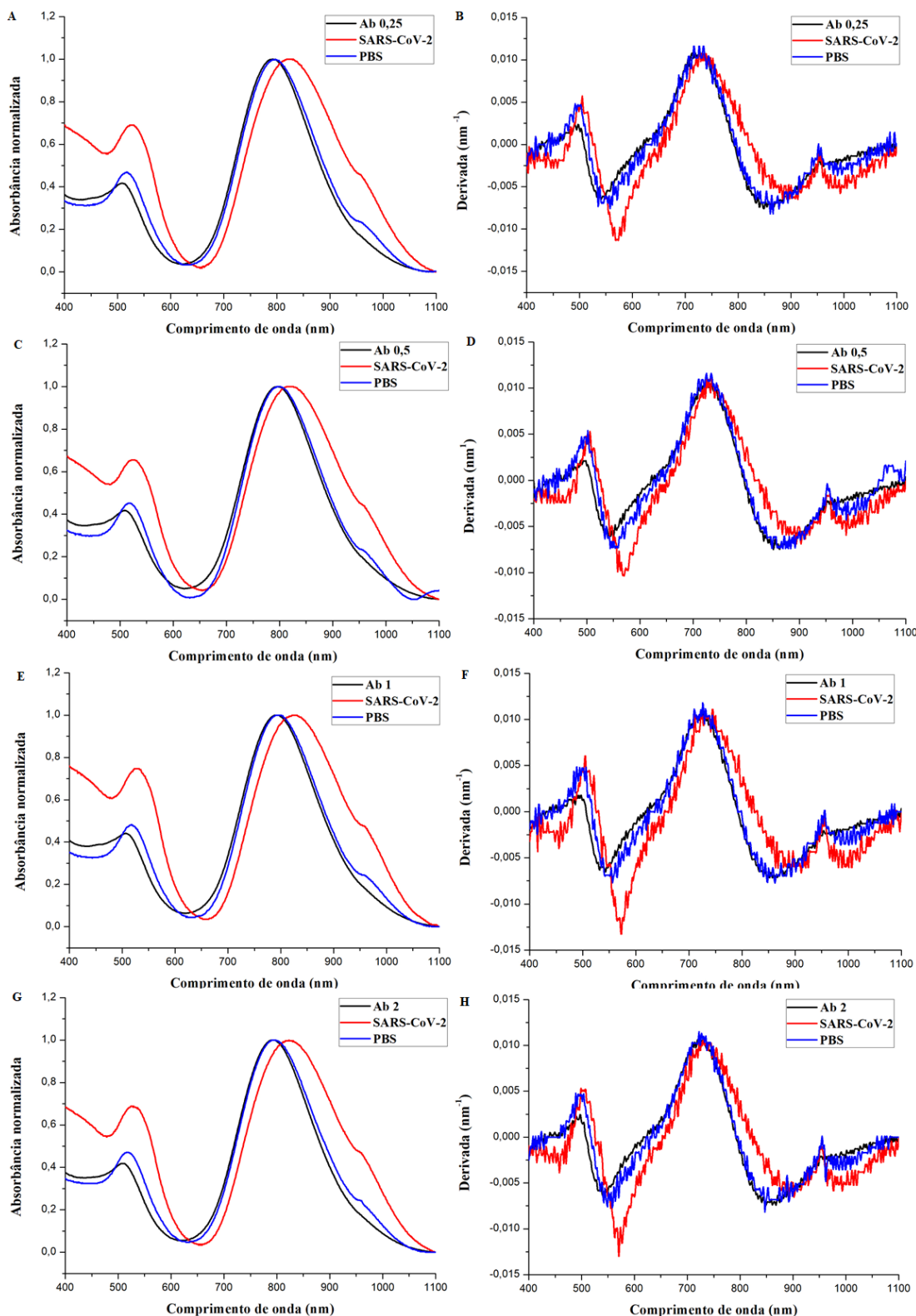
**Figura 17.** NB funcionalizado com concentrações diferentes de PEI. A) Espectroscopia de UV-VIS com absorvância normalizada dos nanobastões de ouro funcionalizados com 2mM de PEI. B) Cálculo derivativo. C) Espectroscopia de UV-VIS com absorvância normalizada dos nanobastões de ouro funcionalizados com 4mM de PEI. D) Cálculo derivativo. A linha preta representa o biossensor, linha vermelha amostra alvo (vírus) e linha azul controle.



Em ambos biossensores construídos foi possível observar deslocamentos das bandas longitudinal significativos (maiores que 3 nm em relação aos NB funcionalizados) quando o sensor era incubado com a amostra alvo (linha vermelha). Já quando esses eram incubados com uma amostra que não deveria se ligar ao biossensor (controle, linha azul), não foi observado deslocamento significativo. Como o biossensor construído com a PEI na concentração de 2 mM obteve maior deslocamento da amostra alvo, esta foi a concentração de PEI escolhida para os próximos experimentos.

Definida a concentração da PEI (NB-PEI), quatro concentrações diferentes (0,25  $\mu\text{g/mL}$ , 0,50  $\mu\text{g/mL}$ , 1  $\mu\text{g/mL}$  e 2  $\mu\text{g/mL}$ ) de anticorpos foram avaliadas com o intuito de definir a melhor concentração para a montagem do biossensor.

**Figura 18.** Nanobastões de ouro funcionalizados com diferentes concentrações de anticorpos anti-SARS-CoV-2. Medições de espectroscopia de UV-VIS-NIR são observados nos gráficos A, C, E, G. Cálculo derivado do sinal LSPR é observado nos gráficos B, D, F, H. A, B) NB-PEI funcionalizado com 0,25  $\mu\text{g/mL}$  de anticorpo. C, D) NB-PEI funcionalizado com 0,5  $\mu\text{g/mL}$  de anticorpo. E, F) NB-PEI funcionalizado com 1  $\mu\text{g/mL}$  de anticorpo. G, H) NB-PEI funcionalizado com 2  $\mu\text{g/mL}$  de anticorpo. A linha preta representa o espectro do NB funcionalizado com PEI e anticorpo; linha vermelha representa a mudança de espectro após adição do SARS-CoV-2 e a linha azul representa a mudança de espectro após adição de PBS.





Conforme se observa na Figura 18 e na Tabela 2, a melhor concentração e definida para uso foi a de 0,25 µg/mL (NB-PEI-Ab 0,2), já que essa apresentou maior deslocamento da banda longitudinal de detecção em relação às outras concentrações, apresentou deslocamento considerado negativo (até 3 nm) para o controle e é a menor concentração utilizada.

**Tabela 2.** Média dos deslocamentos da banda longitudinal da funcionalização do NB-PEI com diferentes concentrações de anticorpo

Concentração de anticorpo	Deslocamentos (nm)	
	Amostra alvo	Controle
0,25 µg/ml	29	2
0,50 µg/ml	18	2
1 µg/ml	28	3
2 µg/ml	28	4

Além da leitura em UV-Vis as amostras de NB, NB-PEI e NB-PEI com anticorpos nas diferentes concentrações foram submetidas à leitura de Potencial Zeta (Tabela 5). Esse potencial é a medida da magnitude da repulsão ou atração entre partículas, estando relacionado tanto a medida da estabilidade quanto da ligação de moléculas nas partículas (CHUMAKOVA et al., 2008). Assim, quando alguma molécula é adsorvida na superfície do NB, ela move o plano de elétrons para longe da superfície e altera o potencial zeta (VERSIANI, 2018). A camada de CTAB na superfície dos NB confere carga positiva e estabilidade às partículas, quando ocorre a ligação de outras moléculas na superfície dos NB parte deste CTAB é retirado e a estabilidade é perdida, conseqüentemente, ocorre a diminuição do potencial zeta (LIOPO et al., 2012). Considerando isso, ao adicionar a PEI na superfície do NB ocorre diminuição do potencial zeta, sugerindo a ligação de tal ligante na superfície dos NB por substituição ao CTAB. Como as cargas ainda apresentavam valores altos, indica que a PEI manteve a estabilidade do NB. O mesmo ocorre quando os anticorpos são adicionados na superfície do NB-PEI, sugerindo a ligação efetiva.

**Tabela 3.** Potencial zeta

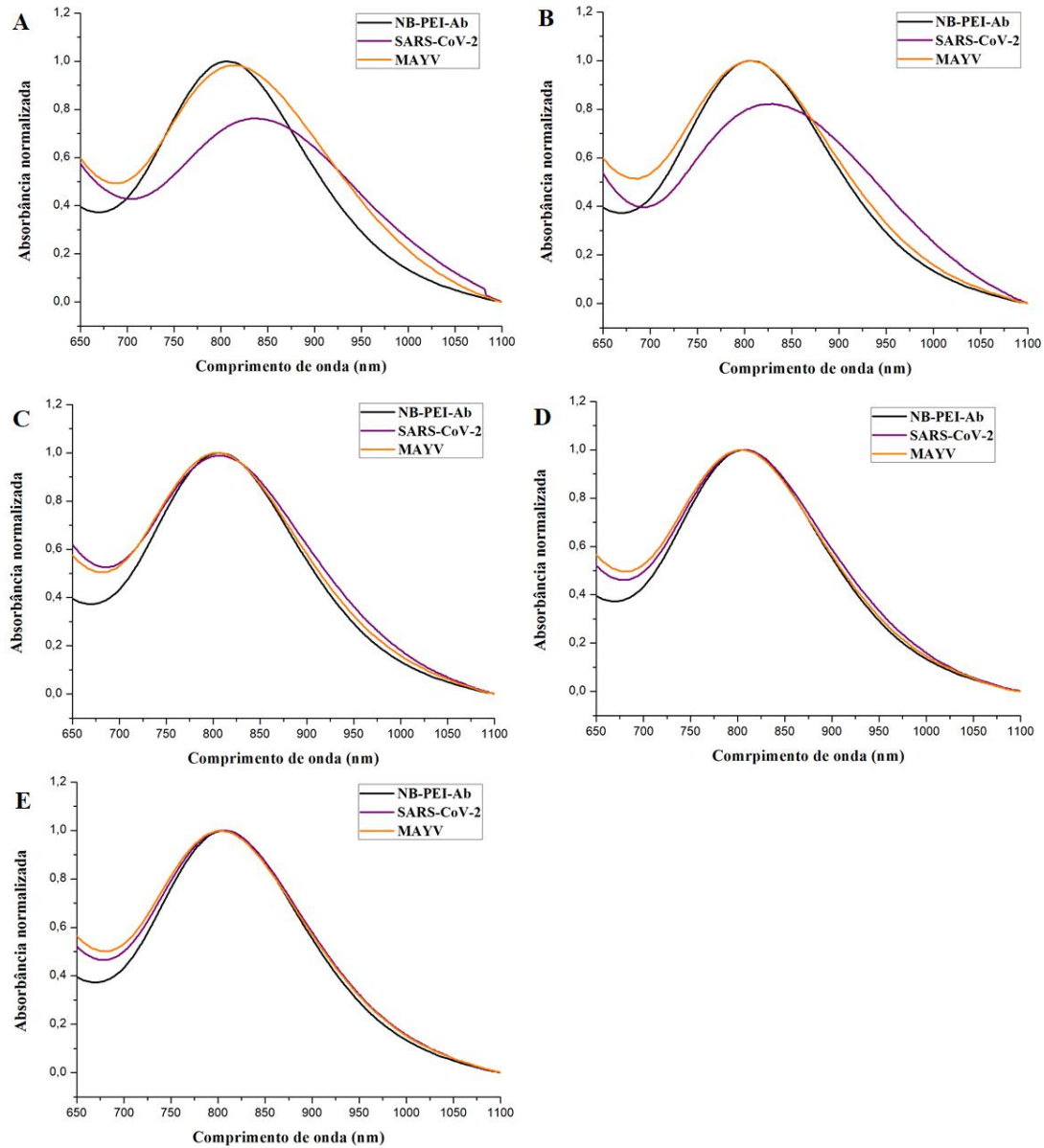
Amostra	Potencial Zeta, mV
<b>NB</b>	33,83
<b>NB-PEI</b>	28,07
<b>NB-PEI + FAB 0,25µg/ml</b>	15,63
<b>NB-PEI + FAB 0,5µg/ml</b>	20,6
<b>NB-PEI + FAB 1µg/ml</b>	20,6
<b>NB-PEI + FAB 2µg/ml</b>	19,17

Após confirmação da construção do biossensor NB-PEI-Ab, foi então avaliado o limite de detecção para SARS-CoV-2. Para tanto, amostras de SARS-CoV-2 (vírus alvo) e Mayaro vírus (controle negativo) foram utilizados nas concentrações de  $10^6$  UFP/mL até a concentração de  $10^2$  UFP/mL (Figura 19 e 20). Os dados dos deslocamentos foram plotados na Tabela 4.

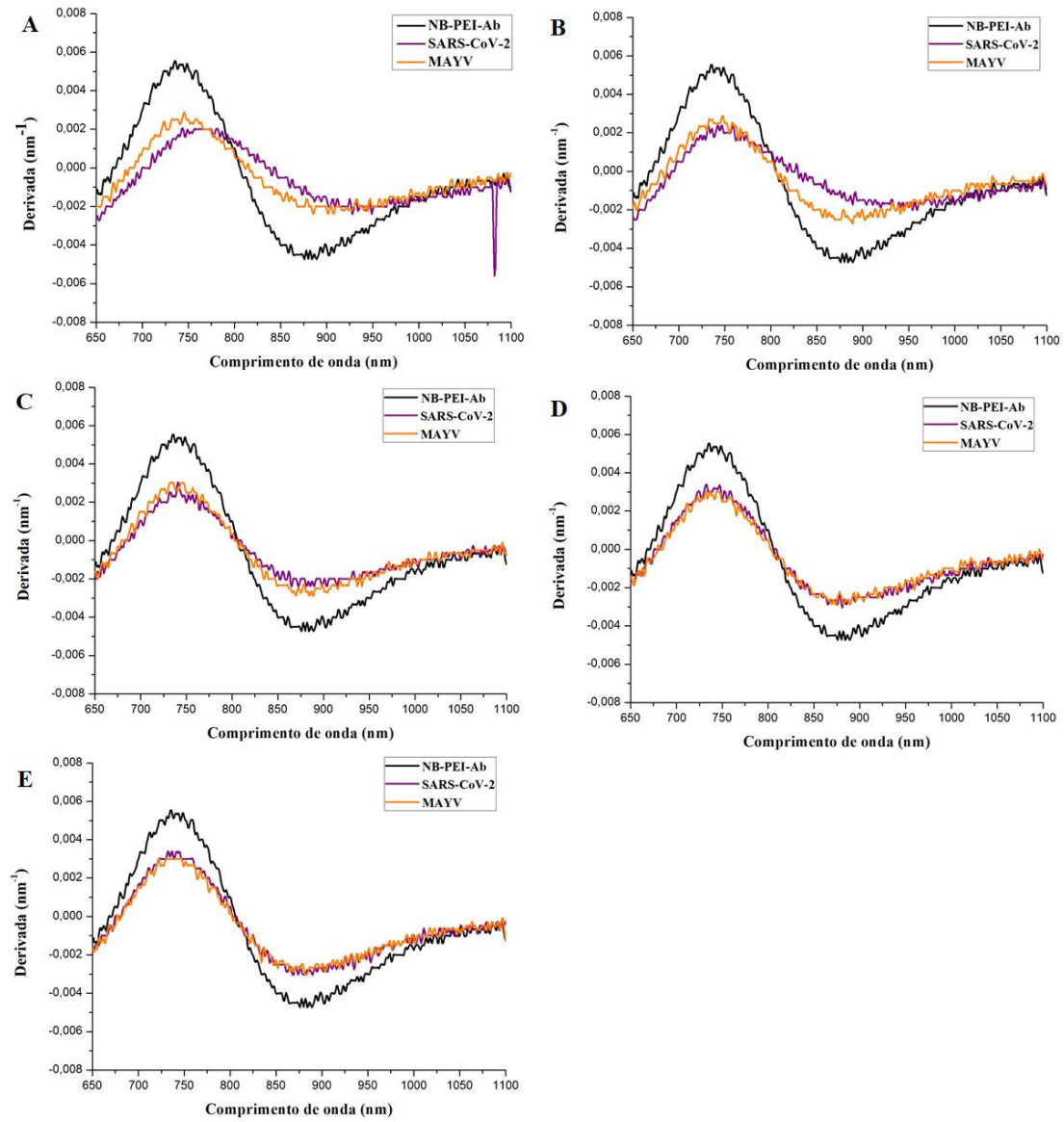
**Tabela 4.** Deslocamentos da banda longitudinal do biossensor em diferentes quantidades de amostras

UFP/mL	Deslocamentos (nm)	
	<b>SARS-CoV-2</b>	<i>Mayaro virus</i>
$10^6$	29	23
$10^5$	20	1
$10^4$	1	1
$10^3$	1	2
$10^2$	1	2

**Figura 19.** Medições de espectroscopia de UV-VIS-NIR do biossensor testado com diferentes concentrações de vírus. Amostra do vírus alvo (SARS-CoV-2) e do vírus controle (MAYV) foram usadas nas concentrações: A)  $10^6$  UFP/mL B)  $10^5$  UFP/mL C)  $10^4$  UFP/mL D)  $10^3$  UFP/mL E)  $10^2$  UFP/mL. A linha preta representa o espectro do biossensor pronto (NB-PEI-Ab); linha roxa representa a mudança de espectro após adição do SARS-CoV-2 e a linha laranja representa a mudança de espectro após adição de PBS.



**Figura 20.** Cálculo derivado do sinal LSPR do biossensor testado com diferentes concentrações de vírus. Amostra do vírus alvo (SARS-CoV-2) e do vírus controle (MAYV) foram usadas nas concentrações: A)  $10^6$  UFP/mL B)  $10^5$  UFP/mL C)  $10^4$  UFP/mL D)  $10^3$  UFP/mL E)  $10^2$  UFP/mL. A linha preta representa o espectro do biossensor pronto (NB-PEI-Ab); linha roxa representa a mudança de espectro após adição de SARS-CoV-2 e a linha laranja representa a mudança de espectro após adição de PBS.



O biossensor proposto foi capaz de detectar amostras de SARS-CoV-2 nas concentrações de  $10^6$  e  $10^5$  UFP/mL, apresentando deslocamentos da banda longitudinal de 29 nm e 20 nm, respectivamente (Tabela 4). Nas outras concentrações os deslocamentos encontrados não foram significativos (menores que 3 nm), indicando que não houve a ligação do vírus no biossensor.

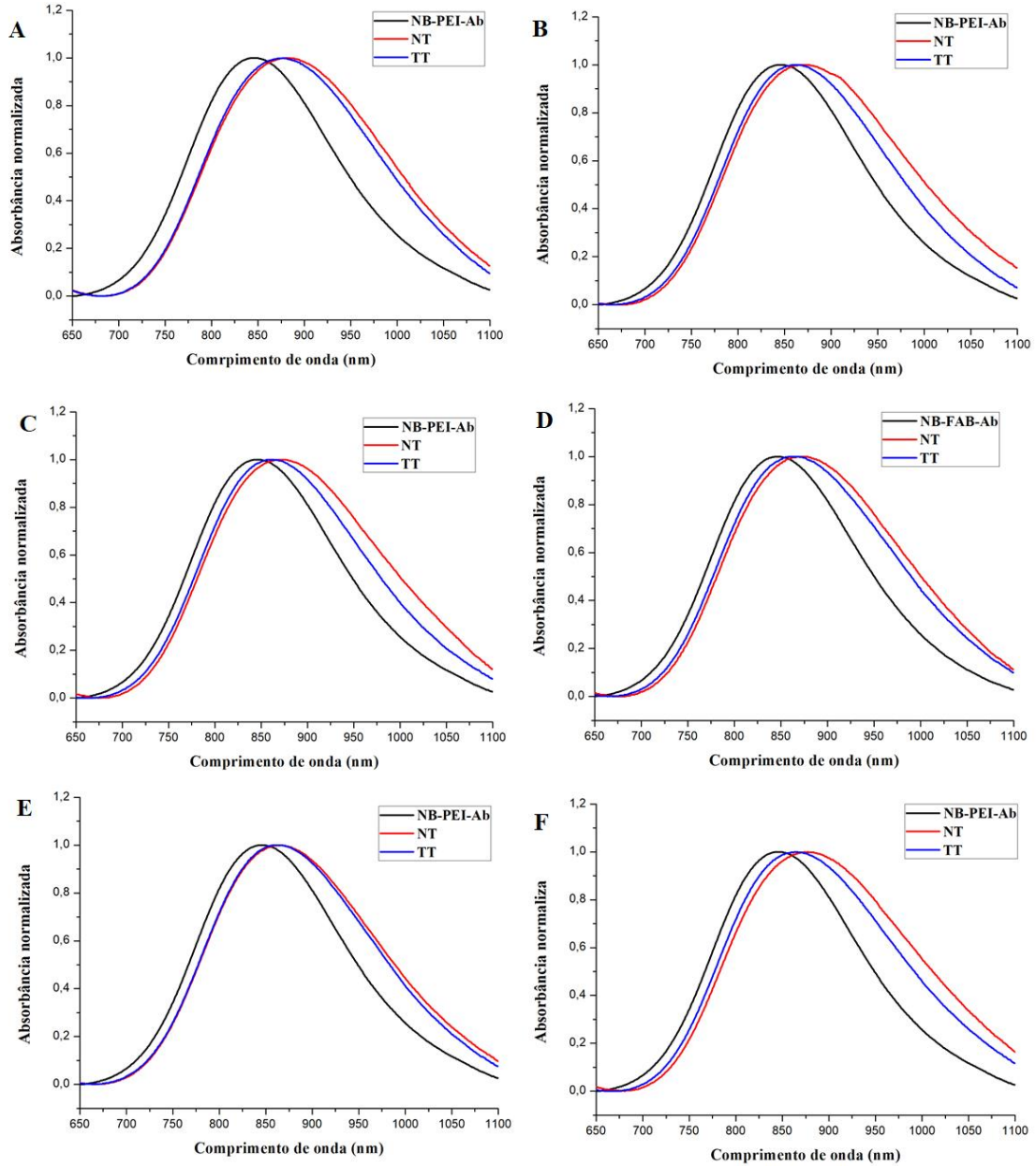
As amostras do vírus Mayaro (controle negativo) apresentaram um deslocamento da banda longitudinal de 6 nm na concentração de  $10^6$  UFP/mL em relação ao deslocamento gerado pelo SARS-CoV-2 na mesma concentração. A partir da concentração de  $10^5$  UFP/mL até a concentração  $10^2$  UFP/mL não foram observados deslocamentos significativos. Diferença estatística foi encontrada nas concentrações  $10^6$  e  $10^5$  UFP/mL entre a amostra alvo e o controle.

Além disso, resolvemos aumentar a disponibilidade das proteínas virais e analisar se teria algum efeito sobre a sensibilidade do biossensor. Para isso, amostras de SARS-CoV-2 foram tratadas com Triton X-100 ou foram aquecidas antes da ligação ao biossensor. O Triton X-100 foi escolhido por se tratar de um detergente não iônico comumente utilizado para lisar células de forma a manter a conformação das proteínas (JOHNSON, 2013). Os deslocamentos da banda longitudinal dos experimentos com Triton X-100 foram plotados na Tabela 5 e são observados na Figura 21 e 22. Os experimentos das amostras aquecidas foram plotados na Tabela 6 e são observados na Figura 23 e 24.

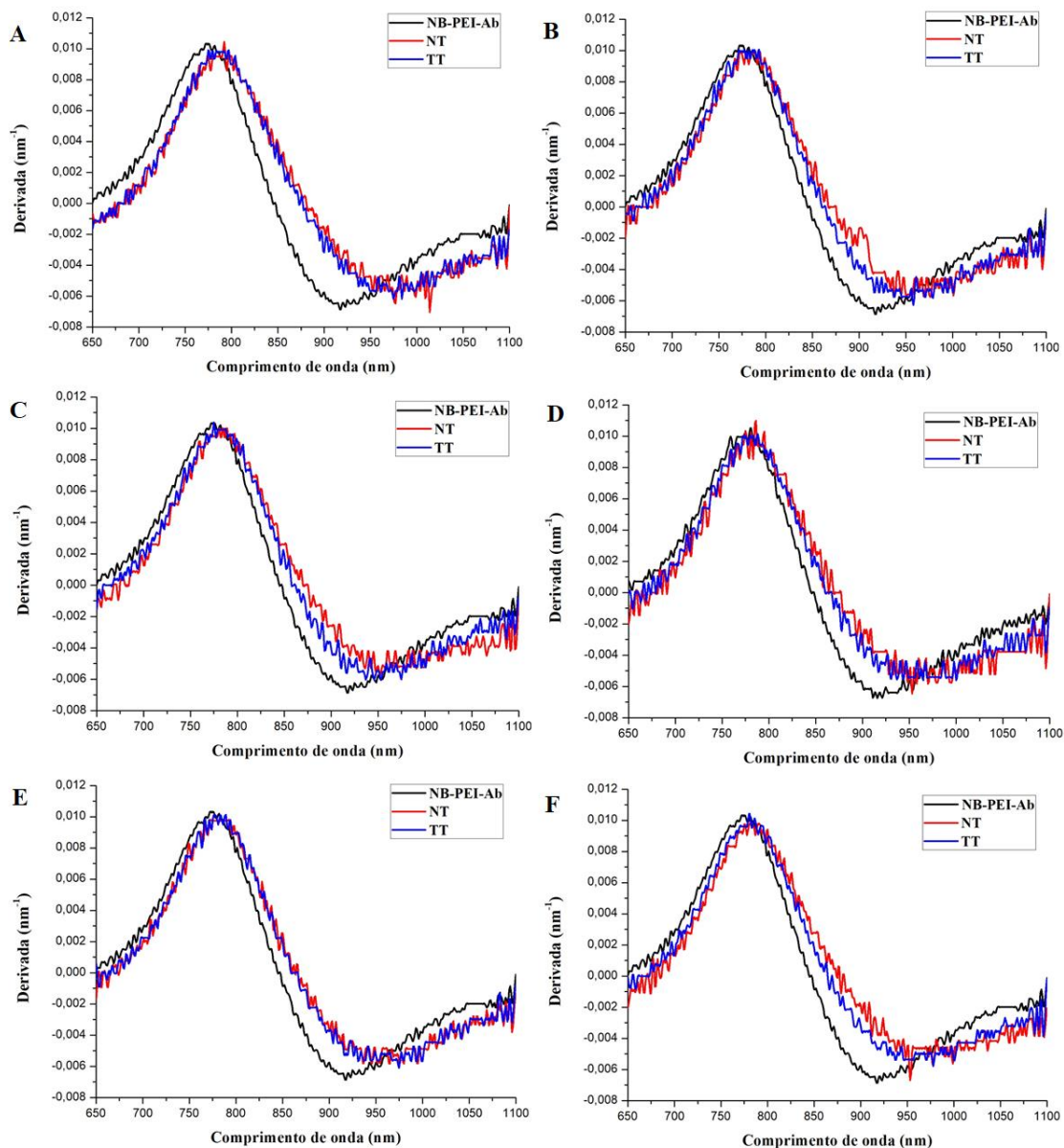
**Tabela 5.** Média dos deslocamentos da banda longitudinal gerados nas amostras tratadas ou não com Triton X-100

UFP/mL	Deslocamentos (nm)	
	Não tratado	Tratado com Triton-100x
$10^6$	34	32
$10^5$	25	16
$10^4$	21	16
$10^3$	29	24
$10^2$	20	16
Controle	30	18

**Figura 21.** Medições de espectroscopia de UV-VIS-NIR do biossensor testado com amostras tratadas ou não com Triton X-100. Amostras de SARS-CoV-2 foram usadas nas concentrações: A)  $10^6$  UFP/mL B)  $10^5$  UFP/mL C)  $10^4$  UFP/mL D)  $10^3$  UFP/mL E)  $10^2$  UFP/mL F) Controle. A linha preta representa o espectro do biossensor pronto (NB-PEI-Ab); linha vermelha representa a mudança de espectro após adição da amostra não tratada (NT) e a linha azul representa a mudança de espectro após adição da amostra tratada com Triton X-100 (TT).



**Figura 22.** Cálculo derivado do sinal LSPR do biossensor testado com amostras tratadas ou não com Triton X-100. Amostras de SARS-CoV-2 foram usadas nas concentrações: A)  $10^6$  UFP/mL B)  $10^5$  UFP/mL C)  $10^4$  UFP/mL D)  $10^3$  UFP/mL E)  $10^2$  UFP/mL F) Controle. A linha preta representa o espectro do biossensor pronto (NB-PEI-Ab); linha vermelha representa a mudança de espectro após adição da amostra não tratada (NT) e a linha azul representa a mudança de espectro após adição da amostra tratada com Triton X-100 (TT).



Em todas as concentrações de SARS-CoV-2 e para os controles tratados com Triton X-100 (TT), o deslocamento foi menor em relação às amostras que não foram tratadas. Foi observada diferença estatística somente nas amostras da diluição de  $10^5$  UFP/mL,  $10^2$  UFP/mL e no controle. Como no experimento anterior, o maior deslocamento observado foi na diluição de  $10^6$  UFP /mL (34 nm amostra não tratada), entretanto, a diferença entre a amostra não tratada e tratada foi de apenas 2 nm, não sendo considerado significativo. Em média, amostras tratadas com Triton X-100,

incluindo o controle, apresentaram deslocamentos 76% menores em relação às amostras não tratadas, ou seja, tiveram sua sensibilidade diminuída, sustentando que esse detergente não foi eficaz para a proposta de aumentar a sensibilidade do biossensor.

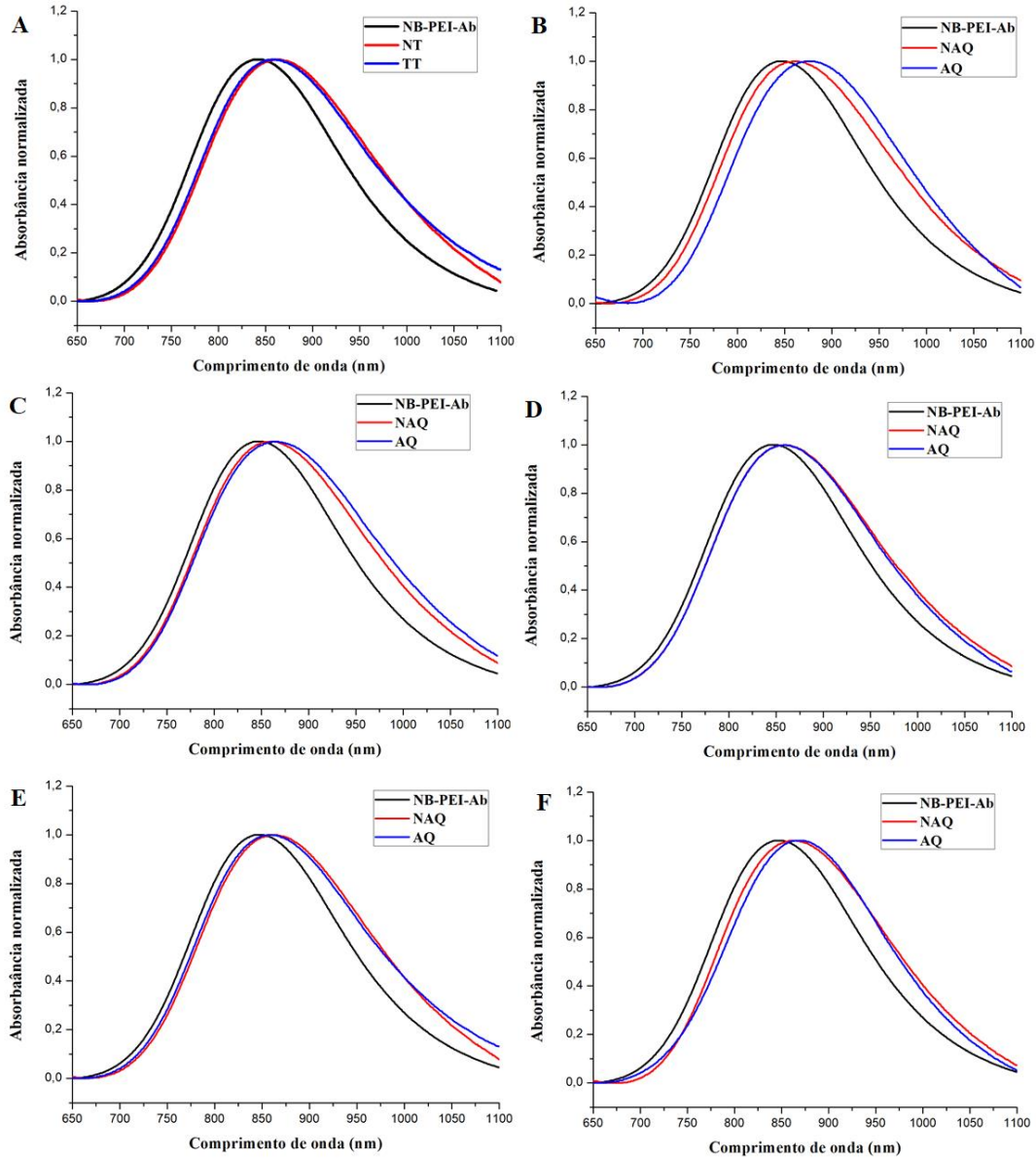
De modo geral, quando as amostras controle e de SARS-CoV-2 (em diferentes concentrações) foram aquecidas, estas apresentaram um deslocamento da banda longitudinal maior em relação às amostras que não foram. A partir da diluição de  $10^5$  UFP/mL, conforme a diluição diminuía os deslocamentos da banda longitudinal das amostras aquecidas também diminuía até a diluição de  $10^2$  UFP/mL, onde ambas as amostras (aquecida ou não) apresentaram deslocamento da banda longitudinal igual a 10 nm. Foi observada diferença estatística somente nas amostras da diluição de  $10^5$  UFP/mL,  $10^4$  UFP/mL e no controle. Os maiores deslocamentos da banda longitudinal também foram observados nas diluições de  $10^6$  UFP/mL, com uma diferença de 5 nm entre a amostra aquecida e a não aquecida.

**Tabela 6.** Média dos deslocamentos da banda longitudinal das amostras de SARS-CoV-2 tratadas ou não por aquecimento

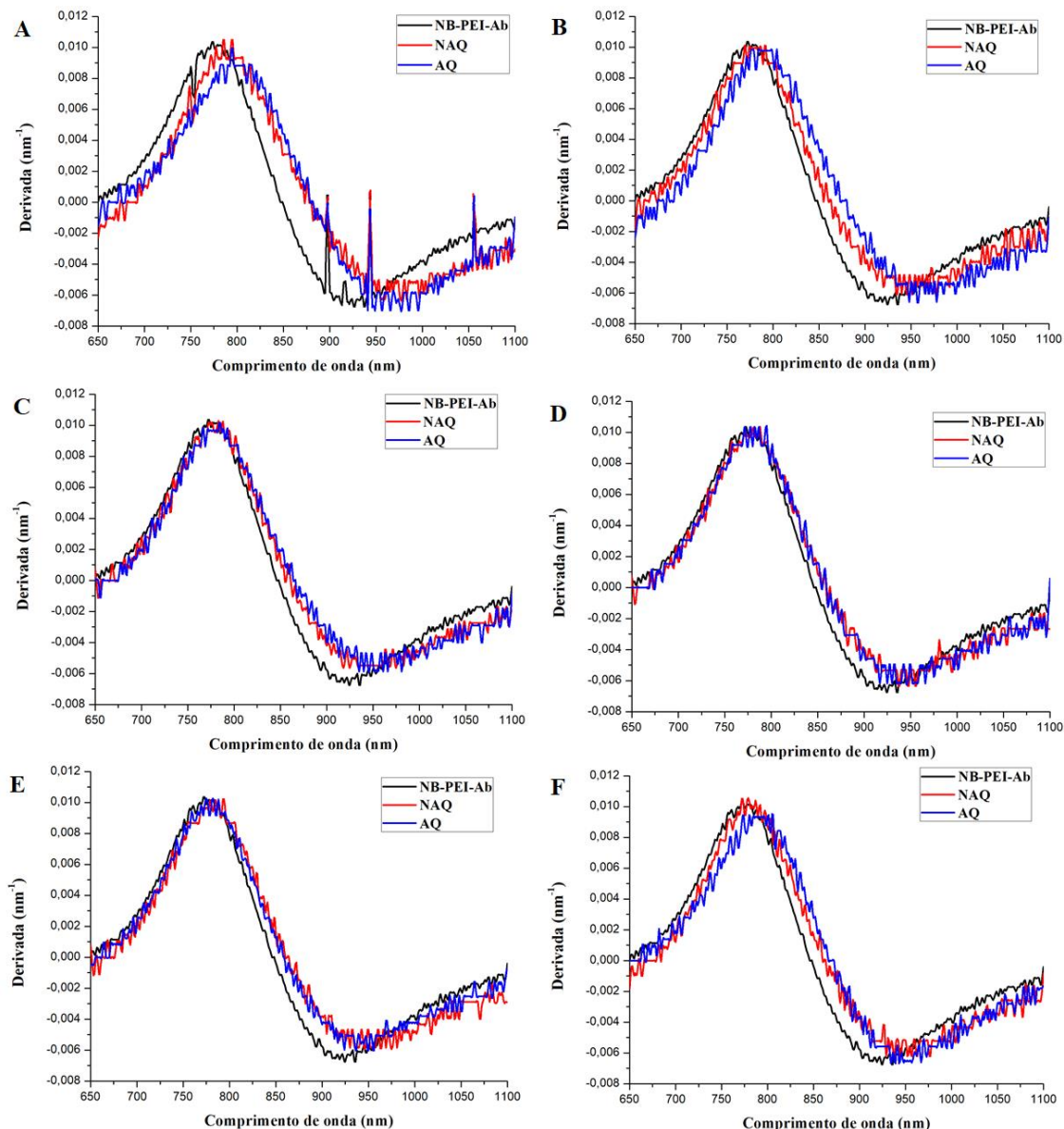
UFP/mL	Deslocamentos (nm)	
	Não aquecido	Aquecido
$10^6$	27	32
$10^5$	12	25
$10^4$	12	18
$10^3$	10	12
$10^2$	10	10
Controle	12	21



**Figura 23.** Medições de espectroscopia de UV-VIS-NIR do biossensor testado com amostras tratadas ou não por aquecimento. Amostras de SARS-CoV-2 foram usadas nas concentrações: A)  $10^6$  UFP/mL B)  $10^5$  UFP/mL C)  $10^4$  UFP/mL D)  $10^3$  UFP/mL E)  $10^2$  UFP/mL F) Controle. A linha preta representa o espectro do biossensor pronto (NB-PEI-Ab); linha vermelha representa a mudança de espectro após adição da amostra não tratada (NAQ) e a linha azul representa a mudança de espectro após adição da amostra tratada por aquecimento (AQ).



**Figura 24.** Cálculo derivado do sinal LSPR do biossensor testado com amostras tratadas ou não por aquecimento. Amostras de SARS-CoV-2 foram usadas nas concentrações: A)  $10^6$  UFP/mL B)  $10^5$  UFP/mL C)  $10^4$  UFP/mL D)  $10^3$  UFP/mL E)  $10^2$  UFP/mL F) Controle. A linha preta representa o espectro do biossensor pronto (NB-PEI-Ab); linha vermelha representa a mudança de espectro após adição da amostra não tratada (NAQ) e a linha azul representa a mudança de espectro após adição da amostra tratada por aquecimento (AQ).



Esses dados sugerem que o aquecimento das amostras foi capaz de melhorar a detecção do biossensor. Ao contrário do tratamento com Triton X-100, quando as amostras foram tratadas, no caso aquecidas, elas obtinham maior deslocamento da banda longitudinal em relação às amostras não tratadas (não aquecidas) na mesma diluição. Essa melhora na detecção pode ser devido à desnaturação das proteínas virais e desmontagem de estruturas do vírion, que deixa mais sítios disponíveis da proteína para se ligar aos anticorpos que estão na superfície do NB. Assim, para o biossensor

proposto, amostras de SARS-CoV-2 podem ser primeiramente aquecidas a 100 °C por 5 minutos antes da sua aplicação nos NB para melhorar a detecção.

Embora o biossensor tenha gerado deslocamento da banda longitudinal no controle negativo na maior diluição ( $10^6$  UFP /mL), conforme visto na Tabela 4, este foi capaz de diferenciar a amostra positiva da negativa com uma diferença de 6 nm. Apesar de não ter sido capaz de detectar o vírus alvo em amostras mais diluídas, na literatura já foi demonstrado que na fase aguda da doença o SARS-CoV-2 pode ser encontrado na quantidade de  $10^5$  UFP/ml a  $10^6$  UFP /mL dependendo do tipo de amostra (LIN et al., 2022; SUNG et al., 2022). Dessa forma o biossensor seria capaz de identificar uma amostra positiva na fase aguda da doença, que é a janela ideal para o diagnóstico precoce da infecção (WHO, 2021).

No presente trabalho foi utilizada amostra de soro que continha anticorpos anti-SARS-CoV-2 e outros anticorpos que não são específicos para ligar ao vírus, este fato pode ter interferido na detecção, visto que poderiam estar se ligando mais anticorpos inespecíficos na superfície do NB do que os anticorpos anti-SARS-CoV-2. Uma forma eficiente de contornar essa situação seria fazer o uso de anticorpos monoclonais, uma vez que esses seriam dirigidos contra epítomos únicos e garantiriam maior especificidade para o antígeno alvo e diminuiria a reatividade cruzada encontrada em anticorpos policlonais (SIDDIQUI, 2010).

Também se faz necessário testar o biossensor em outras amostras de SARS-CoV-2, dado que as amostras utilizadas nesse experimento foram inativadas por luz ultravioleta e essa exposição pode ter danificado alguma parte da proteína viral e reduzindo a detecção do vírus. Além disso, seria interessante avaliar a capacidade do biossensor, já funcionalizado com anticorpos monoclonais, em detectar diferentes variantes do SARS-CoV-2, uma vez que já foi identificado impacto no desempenho de testes já comercializados devido a mutações genéticas do SARS-CoV-2 (FDA, 2022).

A incorporação de partículas magnéticas com o propósito de concentrar vírus se mostra uma alternativa atraente para ser aplicada como uma etapa anterior à incubação da amostra no biossensor. As partículas magnéticas se ligam às partículas virais e isso fornece passos de biosseparação fáceis através de orientação magnética externa (SAKUDO e IKUTA, 2008; SAKUDO et al., 2011; SAKUDO, BABA e IKUTA, 2016). Dessa forma, aliadas com as adequações necessárias do biossensor, a utilização de partículas magnéticas poderia contribuir com a melhora da detecção de vírus em menores concentrações.

Em síntese, o biossensor de nanobastões de ouro direcionados para a detecção de SARS-CoV-2 mostrou algumas limitações, indicando que ainda é necessário melhorar o desempenho do biossensor proposto. No entanto, experimentos anteriores em nosso laboratório (RIBEIRO, 2019) evidenciam que nanobastões de ouro podem ser utilizados para a geração de biossensores simples e eficientes, corroborando achados da literatura (WANG et al., 2010; VERSIANI et al., 2020), sugerindo que, se forem aperfeiçoados, podem ser empregados no desenvolvimento de uma nova e eficaz abordagem de diagnóstica para SARS-CoV-2 e outros vírus de importância médica e veterinária.

## 6. CONCLUSÕES

Ainda que já se tenha passado mais de dois anos do início da pandemia de COVID-19, os testes rápidos e precisos ainda são necessários, pois, contribuem para o gerenciamento da doença. Neste trabalho foi fornecida uma visão geral dos estudos que relatam o uso de testes POC e RDT para diagnosticar COVID-19 publicados de novembro de 2020 a novembro de 2021.

Em nossa análise, identificamos desempenho heterogêneo entre os testes POCs e RDTs que podem estar relacionados a vários fatores, como qualidade da amostra, carga viral, e local de coleta anatômica. De forma geral, os testes apresentaram bons valores (<80%) de sensibilidade e especificidade. As informações sobre a precisão desses testes foram limitadas e algumas reações cruzadas com diferentes patógenos foram encontradas. Comparado com os dados encontrados do presente trabalho com a nossa revisão do ano anterior, houve um aumento no número de estudos e nos valores de sensibilidade, especificidade, acurácia e reação cruzada dos testes. Apesar desses aumentos, ainda são necessárias mais validações sobre a reatividade cruzada com outros patógenos e a precisão dos testes.

Em relação ao biossensor proposto, o estabelecimento de um protocolo de síntese de nanobastões de ouro utilizando hidroquinona como agente redutor foi eficaz. Entre as diferentes temperaturas de armazenamento testadas, os nanobastões armazenados 4 °C apresentaram menor deslocamento da banda longitudinal após um ano da síntese, indicando certa estabilidade, indicando ser esta a melhor condição para o armazenamento do nanomaterial.

O biossensor proposto foi capaz de diferenciar o vírus alvo (SARS-CoV-2) do controle apenas em concentrações mais altas de vírus. A utilização de Triton X-100 não se mostrou eficaz para melhorar a sensibilidade do biossensor. No entanto, quando as amostras eram aquecidas os resultados se mostraram melhores quando comparados a amostras não aquecidas. Assim, o aquecimento prévio das amostras pode melhorar a eficácia do biossensor.

De forma geral, novos ensaios deverão ser realizados para o desenvolvimento de um biossensor específico e sensível que explore adequadamente as propriedades únicas dos nanobastões de ouro para serem utilizados como um teste rápido para COVID-19.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERT, E. et al. Field evaluation of a rapid antigen test (Panbio COVID-19 Ag Rapid Test Device) for COVID-19 diagnosis in primary healthcare centres. **Clin Microbiol Infect**, v. 27, n. 3, p. 472 e477-472 e410, Mar 2021.
- ALI, M. R. K.; SNYDER, B.; EL-SAYED, M. A. Synthesis and optical properties of small Au nanorods using a seedless growth technique. **Langmuir**, v. 28, n. 25, p. 9807–9815, 2012.
- AMER, R. M. et al. Diagnostic performance of rapid antigen test for COVID-19 and the effect of viral load, sampling time, subject's clinical and laboratory parameters on test accuracy. **J Infect Public Health**, v. 14, n. 10, p. 1446-1453, Oct 2021.
- ANKER, J. N. et al. Biosensing with plasmonic nanosensors. **Nature materials**, v. 7, n. 6, p. 442–53, 2008.
- ARTIKA, I. M. et al. Pathogenic viruses: Molecular detection and characterization. **Infect Genet Evol**, v. 81, p. 104215, 1020 doi: 10.1016/j.meegid.2020.104215.
- BAYDA, S. et al. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. **Molecules**, v.25, 1, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>
- BIANCO, G. *et al.* Evaluation of an antigen-based test for hospital point-of-care diagnosis of SARS-CoV-2 infection. **J Clin Virol**, 139, p. 104838, Jun 2021.
- BORGES, A. A. et al. SARS-CoV-2: origem, estrutura, morfogênese e transmissão. In: BARRAL-NETTO, M.; BARRETO, M. L.; PINTO JUNIOR, E. P.; ARAGÃO, E. (org.). Construção de conhecimento no curso da pandemia de COVID-19: aspectos biomédicos, clínico-assistenciais, epidemiológicos e sociais. Salvador: Edufba, 2020. v. 1. DOI: <https://doi.org/10.9771/9786556300443.002>.
- BORGES, L. P. et al. Rapid diagnosis of COVID-19 in the first year of the pandemic: A systematic review. **Int Immunopharmacol**, v. 101, n. Pt A, p. 108144, 2021.
- CANIZAL, G. et al. Multiple Twinned Gold Nanorods Grown by Bio-reduction Techniques. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 3, n. 5/6, p. 475–481, 2001.
- CAO, J.; SUN, T.; GRATAN, K. T.V. Gold nanorod-based localized surface plasmon resonance biosensors: A review. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 195, p. 332-351, 2014.
- CARBONELL-SAHUQUILLO, S. et al. Evaluation of a rapid antigen detection test (Panbio COVID-19 Ag Rapid Test Device) as a point-of-care diagnostic tool for COVID-19 in a pediatric emergency department. **J Med Virol**, v. 93, n. 12, p. 6803-6807, 2021.
- CARTER, J. R. et al. A novel dengue virus detection method that couples DNzyme and gold nanoparticle approaches. **Virology journal**, v. 10, n. 1, p. 201, 2013.
- CASE, J. B. et al. Growth, detection, quantification, and inactivation of SARS-CoV-2. **Virology**, v. 548, p. 39–48, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.05.015>
- CASSEDY, A.; PARLE-MCDERMOTT, A.; O'KENNEDY, R. Virus Detection: A Review of the Current and Emerging Molecular and Immunological Methods. **Front Mol Biosci.**, v. 8, p. 637559, 2021. doi: 10.3389/fmolb.2021.637559. PMID: 33959631; PMCID: PMC8093571.

- CASSUTO, N. G. et al. Evaluation of a SARS-CoV-2 antigen-detecting rapid diagnostic test as a self-test: Diagnostic performance and usability. **J Med Virol**, v. 93, n. 12, p. 6686-6692, 2021.
- CDC, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2021. Scientific Brief: SARS-CoV-2 Transmission, 2021. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/science/science-briefs/sars-cov-2-transmission.html>> Acessado em 02 de agosto de 2022
- CEVIK, M. et al. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Microbe**, v. 2, n. 1, p. e13-e22, Jan 2021.
- CHAIMAYO C, K. B. et al. Rapid SARS-CoV-2 antigen detection assay in comparison with real-time RT-PCR assay for laboratory diagnosis of COVID-19 in Thailand. **Virology journal**, v.17, p. 177, 2020.
- CHANG, J. Y. et al. Oriented assembly of Au nanorods using biorecognition system. **Chem Commun (Camb)**, n. 8, p. 1092-4, ISSN 1359-7345. 2005.
- CHANG, H. H.; MURPHY, C. J. Mini Gold Nanorods with Tunable Plasmonic Peaks beyond 1000 nm. **Chemistry of Materials**, v. 30, n. 4, p. 1427–1435, 2018.
- CHUMAKOVA, O. V. et al. Composition of PLGA and PEI/DNA nanoparticles improves ultrasoundmediated gene delivery in solid tumors in vivo. **Cancer Letters**, v. 261, p. 215–225, 2008.
- CIOTTI, M. et al. Performance of a rapid antigen test in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection. **J Med Virol**, v. 93, n. 5, p. 2988-2991, 2021.
- CORTES RUBIO, J. A. et al. [Evaluation of the diagnostic test for rapid detection of covid-19 antigen (Panbio Covid rapid test) in primary care]. **Semergen**, v. 47, n. 8, p. 508-514, Nov-Dec 2021.
- CUADRADO-PAYAN, E. et al. SARS-CoV-2 and influenza virus co-infection. **Lancet**, 395, n. 10236, p. e84, 2020.
- DANIEL, M.-C.; ASTRUC, D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. **Chemical reviews**, v.104, n. 1, p. 293–346, 2004.
- Da SILVA, S. J.R. et al. Clinical and Laboratory Diagnosis of SARS-CoV-2, the Virus Causing COVID-19. **ACS Infectious Diseases**, v. 6, n. 9, 2319-2336, 2020  
DOI: 10.1021/acsinfecdis.0c00274
- De CARLO, A. et al. SARS-COV-2 Serological Profile in Healthcare Professionals of a Southern Italy Hospital. **Int J Environ Res Public Health**, v. 17, n. 24, Dec 13 2020.
- DE MUNCK, D. G. et al. Performance of the FRENED COVID-19 IgG/IgM Duo point-of-care test for SARS-CoV-2 antibody detection. **Acta Clin Belg**, v. 77, n. 3, p. 647-652, 2022.
- DE OLIVEIRA COELHO, B. et al. Essential properties and pitfalls of colorimetric Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification as a point-of-care test for SARS-CoV-2 diagnosis. **Mol Med**, v. 27, n. 1, p. 30, 2021.
- DEJNIRATTISAI, W. et al. Reduced neutralisation of SARS-CoV-2 omicron B.1.1.529 variant by post-immunisation serum. **Lancet**, v. 399, n. 10321, p. 234-236, 2022.

DIAO, B. et al. Accuracy of a nucleocapsid protein antigen rapid test in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection. **Clin Microbiol Infect**, v. 27, n. 2, p. 289 e281-289 e284, 2021.

DIAS, B.P. Nanobastões de ouro no desenvolvimento de um método de diagnóstico de paracoccidiodomicose. Orientador: Breno de Mello Silva. 2018.50. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação de Biotecnologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, 2018.

DIAS, B. P. et al. A nanotecnologia no brasil e o desenvolvimento de produtos com atividade antimicrobiana. **Quim. Nova**, v. 44, n. 8, p. 1084-1092, 2021  
<http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170743>

DIAS, B. P. et al. Update on Rapid Diagnostics for COVID-19: A Systematic Review. **Int. J. Trad. Med.**, v. 2, p. 252-274, 2022. <https://doi.org/10.3390/ijtm2020023>

DRAIN, P. K. et al. A Rapid, High-Sensitivity SARS-CoV-2 Nucleocapsid Immunoassay to Aid Diagnosis of Acute COVID-19 at the Point of Care: A Clinical Performance Study. **Infect Dis Ther**, v. 10, n. 2, p. 753-761, 2021.

DROBYSH, M. et al. Biosensors for the Determination of SARS-CoV-2 Virus and Diagnosis of COVID-19 Infection. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 23, p. 666, 2022.  
<https://doi.org/10.3390/ijms23020666>

DYKMAN, L.; KHLEBTSOV, N. Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives. **Chem . Soc. Rev.**, v. 41, p. 2256-2282  
doi:10.1039/C1CS15166E

EGERER, R. et al. Performance of the RT-LAMP-based eazyplex(R) SARS-CoV-2 as a novel rapid diagnostic test. **J Clin Virol**, v. 138, p. 104817, 2021.

ELLEDGE, S. K. et al. Engineering luminescent biosensors for point-of-care SARS-CoV-2 antibody detection. **Nat Biotechnol**, v. 39, n. 8, p. 928-935, 2021.

FACCINI-MARTINEZ, A. A. et al. Serological cross-reactivity using a SARS-CoV-2 ELISA test in acute Zika virus infection, Colombia. **Int J Infect Dis**, v. 101, p. 191-193, 2020.

FAN, B. E. et al. COVID-19 and mycoplasma pneumoniae coinfection. **Am J Hematol**, v. 95, n. 6, p. 723-724, 2020.

FARZIN, A. et al. Magnetic Nanoparticles in Cancer Therapy and Diagnosis. **Adv Healthc Mater.**, v. 9, p. 1901058, 2020. <https://doi.org/10.1002/adhm.201901058>

FAUZIAH, N. et al. The performance of point-of-care antibody test for COVID-19 diagnosis in a tertiary hospital in Bandung, Indonesia. **J Infect Dev Ctries**, v. 15, n. 2, p. 237-241, 2021.

FDA. **SARS-CoV-2 Viral Mutations: Impact on COVID-19 Tests**. Disponível em: <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-covid-19-and-medical-devices/sars-cov-2-viral-mutations-impact-covid-19-tests> Acesso em: 02 de setembro de 2022

FDA. **Policy for Coronavirus Disease-2019 Tests During the Public Health Emergency (Revised): Guidance for Clinical Laboratories, Commercial Manufacturers, and Food and Drug Administration Staff**. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration; Center for Devices and Radiological Health. 2021.



- FENNER, F. et al. Structure and Composition of Viruses. **Veterinary Virology**, p. 3–19, 1987. doi: 10.1016/B978-0-12-253055-5.50005-0.
- FERREIRA, H.S.; RANGEL, M. do C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise Revisão. **Quím. Nova**, v. 32, n.7, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000700033>
- FILCHAKOVA, O. et al. Review of COVID-19 testing and diagnostic methods. **Talanta**, v. 244, p. 123409, 2022. doi: 10.1016/j.talanta.2022.123409.
- GANS, R. Über die Form ultramikroskopischer Silberteilchen. **Annalen der Physik**, v. 352, n. 10, p. 270–284, 1915.
- GAYTHORPE, K. A. M. et al. Children's role in the COVID-19 pandemic: a systematic review of early surveillance data on susceptibility, severity, and transmissibility. **Sci Rep**, v. 11, n. 1, p. 13903, 2021.
- GELDERBLOM HR. Structure and Classification of Viruses. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 41. PMID: 21413309.
- GONCALVES, R. L. et al. SARS-CoV-2 mutations and where to find them: an in silico perspective of structural changes and antigenicity of the spike protein. **J Biomol Struct Dyn**, v. 40, n. 7, p. 3336-3346, 2022.
- GORBALENYA, A. E. et al. (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. **Nat Microbiol.**, v. 5, p. 536–544, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
- GUO, L. et al. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). **Clin Infect Dis**, v. 71, n. 15, p. 778-785, Jul 28 2020.
- HAN, L. et al. A direct route toward assembly of nanoparticle-carbon nanotube composite materials. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 20, n. 14, p. 6019–25, 2004.
- HENSON, B. C. et al. Gold Nanorod Synthesis. **NanoHybrids Inc. Material Matters**, v.12.1, 2017. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/en/technical-documents/technical-article/materials-science-and-engineering/nanoparticle-and-microparticle-synthesis/synthesis-of-gold-nanorods>. Acesso em 02 de agosto de 2022
- HERRADA, C.A. et al. Advances in Diagnostic Methods for *Zika Virus* Infection. **J Med Device**. v.12, p. 0408021-4080211, 2018. doi:10.1115/1.4041086
- HERRERO-URIBE, Lúbia. Vírus, definições e realidade. **Rev. biol. trop**, San José, v. 59, n. 3, pág. 993-998, 2011. Disponível em <[http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-77442011000300002&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442011000300002&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em 08 de agosto de 2022.
- HUANG, Y. et al. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. **Acta Pharmacol Sin.**, v. 41, p. 1141-1149, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>
- HUANG, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **Lancet**, v. 395, p. 497–506, 2020.

HUANG, X.; NERETINA, S.; EL-SAYED, M. A. Gold nanorods: From synthesis and properties to biological and biomedical applications. **Advanced Materials**, v. 21, n. 48, p. 4880-4910, 2009.

HUBER, T. et al. Diagnostic performance of four SARS-CoV-2 antibody assays in patients with COVID-19 or with bacterial and non-SARS-CoV-2 viral respiratory infections. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 40, n. 9, p. 1983-1997, Sep 2021.

HWANG, S.-Y.; TAO, A. R. Biofunctionalization of gold nanorods. *Pure and Applied Chemistry*, v. 83, n. 1, 2010.

IIEP – Informações, Estudos e Pesquisas. Guia de nanotecnologias para trabalhadores. 2015. Disponível em:  
[http://www.anamt.org.br/site/upload\\_arquivos/legislacao\\_2015\\_251120151338147055475.pdf](http://www.anamt.org.br/site/upload_arquivos/legislacao_2015_251120151338147055475.pdf). Acesso em 02 de agosto de 2022

JAZAYERI, M. H. et al. Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. **Sensing and Bio-Sensing Research**, v. 9, p. 17-22, 2016.

JEGERLEHNER, S. et al. Diagnostic accuracy of a SARS-CoV-2 rapid antigen test in real-life clinical settings. **Int J Infect Dis**, v. 109, p. 118-122, Aug 2021.

JEONG, H-H. et al. Recent advances in gold nanoparticles for biomedical applications: from hybrid structures to multi-functionality. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 7, p. 3480-3496. 2019. doi:10.1039/c9tb00557a.

JIN, Y. et al. Diagnostic value and dynamic variance of serum antibody in coronavirus disease 2019. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 94, p. 49–52, 2020.

JOHNSON, M. Detergents: Triton X-100, Tween-20, and More. **Mater Methods**, v.3, p. 163, 2013. Disponível em: <https://www.labome.com/method/Detergents-Triton-X-100-Tween-20-and-More.html>. Acesso em 02 de agosto de 2022

KANAUJIA, R.; et al. Rapid antigen detection kit for the diagnosis of SARS-CoV-2 - are we missing asymptomatic patients? **Indian J Med Microbiol**, v. 39, n. 4, p. 457-461, Oct-Dec 2021.

KANG, J.; TAHIR, A.; WANG, H.; CHANG, J. Applications of nanotechnology in virus detection, tracking, and infection mechanisms. **WIREs Nanomed Nanobiotechnol**, v. 13, p. e1700, 2021. <https://doi.org/10.1002/wnan.1700>

KARAKUŞ E. et al. Colorimetric and electrochemical detection of SARS-CoV-2 spike antigen with a gold nanoparticle-based biosensor. **Anal Chim Acta.**, v. 1182, 2021.

KIM, D. et al. Development and Clinical Evaluation of an Immunochromatography-Based Rapid Antigen Test (GenBody COVAG025) for COVID-19 Diagnosis. **Viruses**, v. 13, n. 5, 29 2021.

KIM, F.; SONG, J. H.; YANG, P. Photochemical synthesis of gold nanorods. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 48, p. 14316–7, 2002.

KIZILOGLU, I.; SENER, A.; SILIV, N. Comparison of rapid antibody test and thorax computed tomography results in patients who underwent RT-PCR with the pre-diagnosis of COVID-19. **Int J Clin Pract**, 75, n. 10, p. e14524, Oct 2021.

KOEPPL, S. et al. "Towards a Reproducible Synthesis of High Aspect Ratio Gold Nanorods". **Journal of Nanomaterials**, Article ID 515049 <https://doi.org/10.1155/2011/515049>

- KOLWIJCK, E. et al. Validation and implementation of the Panbio COVID-19 Ag rapid test for the diagnosis of SARS-CoV-2 infection in symptomatic hospital healthcare workers. **Infect Prev Pract**, v. 3, n. 2, p. 100142, Jun 2021.
- KONALA, V. M. et al. Co-infection with Influenza A and COVID-19. **Eur J Case Rep Intern Med**, v. 7, n. 5, p. 001656, 2020.
- KRUGER, L. J. et al. The Abbott PanBio WHO emergency use listed, rapid, antigen-detecting point-of-care diagnostic test for SARS-CoV-2-Evaluation of the accuracy and ease-of-use. **PLoS One**, v. 16, n. 5, p. e0247918, 2021.
- KRUGER, L. J. et al. Evaluation of accuracy, exclusivity, limit-of-detection and ease-of-use of LumiraDx: An antigen-detecting point-of-care device for SARS-CoV-2. **Infection**, v. 50, n. 2, p. 395-406, Apr 2022.
- KUMAR, N.; SHARMA, S.; NARA, S. Tweaking homogeneity and stability of gold nanorods by synergistic action of pH and temperature. **Advanced Materials Proceedings**, v. 3, n. 8, p. 501-507, 2018.
- KUMAR, S. et al. Structural, glycosylation and antigenic variation between 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) and SARS coronavirus (SARS-CoV). **Virusdisease**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.13-21, 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s13337-020-00571-5>
- KUMAR, V. et al. Multicentric evaluation of a novel point of care electrochemical ELISA platform for SARS-CoV-2 specific IgG and IgM antibody assay. **J Virol Methods**, 298, p. 114275, 2021.
- L'HUILLIER, A. G. et al. Diagnostic Accuracy of SARS-CoV-2 Rapid Antigen Detection Testing in Symptomatic and Asymptomatic Children in the Clinical Setting. **J Clin Microbiol**, v. 59, n. 9, p. e0099121, Aug 18 2021.
- LANSBURY, L.; LIM, B.; BASKARAN, V.; LIM, W. S. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **J Infect**, v. 81, n. 2, p. 266-275, 2020.
- LEE, C. Y. et al. Fluorescence polarization system for rapid COVID-19 diagnosis. **Biosens Bioelectron**, v. 178, p. 113049, 2021.
- LEVINE-TIEFENBRUN, M.; et al. Initial report of decreased SARS-CoV-2 viral load after inoculation with the BNT162b2 vaccine. **Nat Med**, v. 27, n. 5, p. 790-792, 2021.
- LEWIS, D. COVID-19 rarely spreads through surfaces. So why are we still deep cleaning? **Nature**, v. 590, p. 26-28, 2021. doi: <https://doi.org/10.1038/d41586-021-00251-4> Disponível em: <https://www.nature.com/articles/d41586-021-00251-4>
- LI, F.; HE, P. et al. A Reverse Transcription Recombinase-Aided Amplification Method for Rapid and Point-of-Care Detection of SARS-CoV-2, including Variants. **Viruses**, 13, n. 9, 2021.
- LI, K. et al. Development and clinical evaluation of a rapid antibody lateral flow assay for the diagnosis of SARS-CoV-2 infection. **BMC Infect Dis**, v. 21, n. 1, p. 860, 2021.
- LIU D, J. C. et al. Nanozyme chemiluminescence paper test for rapid and sensitive
- LIN, Y.C. et al. Detection and quantification of infectious severe acute respiratory coronavirus-2 in diverse clinical and environmental samples. **Sci Rep**. v. 12, n. 1, p. 5418, 2022

detection of SARS-CoV-2 antigen. **Biosensors & bioelectronics**, v. 173, p. 112817, 2020.

LOCATELLI, E.; MONACO, I.; COMES FRANCHINI, M. Surface modifications of gold nanorods for applications in nanomedicine. **RSC Advances**, v. 5, n. 28, p. 21681–21699, 2015.

LONG, Q. X. et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. **Nat Med**, 26, n. 6, p. 845-848, 2020.

LUSTIG, Y. et al. Potential Antigenic Cross-reactivity Between Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and Dengue Viruses. **Clinical Infectious Diseases**, 73, n. 7, p. e2444-e2449, 2020.

MARDIAN, Y. et al. Review of Current COVID-19 Diagnostics and Opportunities for Further Development. **Frontiers in medicine**, v. 8, p. 615099, 2021.  
<https://doi.org/10.3389/fmed.2021.615099>

MARGULIS, M. et al. A Magnetic Modulation Biosensing-Based Molecular Assay for Rapid and Highly Sensitive Clinical Diagnosis of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **J Mol Diagn**, 23, n. 12, p. 1680-1690, 2021.

MASIA, M. et al. Nasopharyngeal Panbio COVID-19 Antigen Performed at Point-of-Care Has a High Sensitivity in Symptomatic and Asymptomatic Patients With Higher Risk for Transmission and Older Age. **Open Forum Infect Dis**, v. 8, n. 3, p. ofab059, 2021.

MASLOVA, A. O.; HSING, I. M. Thiol-free oligonucleotide surface modification of gold nanoparticles for nanostructure assembly. **Nanoscale Adv.**, v. 1, p. 430-435, 2019.

MASYENI, S. et al. Serological cross-reaction and coinfection of dengue and COVID-19 in Asia: Experience from Indonesia. **Int J Infect Dis**, v. 102, p. 152-154, Jan 2021.

MBOUMBA BOUASSA, R. S.; VEYER, D.; PERE, H.; BELEC, L. Analytical performances of the point-of-care SIENNA COVID-19 Antigen Rapid Test for the detection of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein in nasopharyngeal swabs: A prospective evaluation during the COVID-19 second wave in France. **Int J Infect Dis**, 106, p. 8-12, May 2021.

MCELLISTREM, M. C. et al. Single Dose of an mRNA Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-Cov-2) Vaccine Is Associated With Lower Nasopharyngeal Viral Load Among Nursing Home Residents With Asymptomatic Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **Clin Infect Dis**, v. 73, n. 6, p. e1365-e1367, 2021.

MERINO, P. et al. Multicenter evaluation of the Panbio COVID-19 rapid antigen-detection test for the diagnosis of SARS-CoV-2 infection. **Clin Microbiol Infect**, 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE a. O que é a COVID-19? 2021. Disponível em: <  
<https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/o-que-e-o-coronavirus>> Acessado em: 05 de Agosto de 2022

MINISTÉRIO DA SAÚDEb, 2021. SINTOMAS. Disponível em: <  
<https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/sintomas>> Acessado em: 05 de agosto de 2022.

- MOCKEL, M.; CORMAN, V. M.; STEGEMANN, M. S.; HOFMANN, J. *et al.* SARS-CoV-2 antigen rapid immunoassay for diagnosis of COVID-19 in the emergency department. **Biomarkers**, 26, n. 3, p. 213-220, May 2021.
- MOKHTARZADEH, A. *et al.* Nanomaterial-based biosensors for detection of pathogenic virus. **Trends in analytical chemistry : TRAC**, v. 97, p. 445-457, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.005>
- MUHI, S. *et al.* Multi-site assessment of rapid, point-of-care antigen testing for the diagnosis of SARS-CoV-2 infection in a low-prevalence setting: A validation and implementation study. **Lancet Reg Health West Pac**, 9, p. 100115, 2021.
- NAKAMURA, H.; KARUBE, I. Current research activity in biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 377, n.3, p. 446-468, 2003.
- NEHL, C. L.; HAFNER, J.H. Shape-dependent plasmon resonances of gold nanoparticles. **J. Mater. Chem.**, v. 18, p. 2415-2419, 2008. doi: 10.1039/B714950F
- NI, W. *et al.* Tailoring Longitudinal Surface Plasmon Wavelengths, Scattering and Absorption Cross Sections of Gold Nanorods. **ACS Nano**, v. 2, n. 4, p. 677-686, 2008.
- NIIDOME, Y. *et al.* Rapid synthesis of gold nanorods by the combination of chemical reduction and photoirradiation processes; morphological changes depending on the growing processes. **Chem. Commun.**, v. 3, n. 18, p. 2376-2377, 2003.
- O'FARRELL B. Evolution in Lateral Flow Immunoassay Systems. In; Wong RC, Tse HY, editors. **Lateral Flow Immunoassay**. Springer, New York: Springer. p.1-34, 2009.
- ORSI, A. *et al.* On-field evaluation of a ultra-rapid fluorescence immunoassay as a frontline test for SARS-CoV-2 diagnostic. **J Virol Methods**, v. 295, p. 114201, 2021.
- OZARAS, R. *et al.* Influenza and COVID-19 coinfection: Report of six cases and review of the literature. **J Med Virol**, v. 92, n. 11, p. 2657-2665, 2020.
- PAEZ-ESPINO, D. *et al.* Diversity, evolution, and classification of virophages uncovered through global metagenomics. **Microbiome**, v. 7, p. 157, 2019. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0768-5>
- PALLETT, S. J. C. *et al.* Point-of-care SARS-CoV-2 serological assays for enhanced case finding in a UK inpatient population. **Sci Rep**, v. 11, n. 1, p. 5860, 2021.
- PARIHAR, A. *et al.* Point-of-Care Biosensor-Based Diagnosis of COVID-19 Holds Promise to Combat Current and Future Pandemics. **ACS Appl Bio Mater.**, v. 3, n. 11, p.7326-7343, 2020. doi:10.1021/acsabm.0c01083
- PARK, K. *et al.* Engineering the Optical Properties of Gold Nanorods: Independent Tuning of Surface Plasmon Energy, Extinction Coefficient, and Scattering Cross Section. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 118, n. 11, p. 5918-5926, 2014.
- PARVU, V. *et al.* Factors that Influence the Reported Sensitivity of Rapid Antigen Testing for SARS-CoV-2. **Front Microbiol**, v. 12, p. 714242, 2021.
- PECK, K.R. Early diagnosis and rapid isolation: response to COVID-19 outbreak in Korea. **Clin Microbiol Infect.** v. 26, n. 7, p. 805-807, 2020. doi:10.1016/j.cmi.2020.04.025
- PEELING, R. W. *et al.* Evaluation of diagnostic tests: dengue. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 12, p. S30-S37, 2010.

PENG, T. et al. Point-of-care test system for detection of immunoglobulin-G and -M against nucleocapsid protein and spike glycoprotein of SARS-CoV-2. **Sens Actuators B Chem**, v. 331, p. 129415, 2021.

PICCIOLINI, S. et al. Hydroquinone Based Synthesis of Gold Nanorods. **Journal of Visualized Experiments**, n. 114, p. 1–7, 2016.

PLEBANI, M. et al. Performance of the COVID19SEROSpeed IgM/IgG Rapid Test, an Immunochromatographic Assay for the Diagnosis of SARS-CoV-2 Infection: a Multicenter European Study. **J Clin Microbiol**, v. 59, n. 2, 2021.

PRENDECKI, M.; CLARKE, C.; MCKINNON, T.; LIGHTSTONE, L. *et al.* SARS-CoV-2 Antibody Point-of-Care Testing in Dialysis and Kidney Transplant Patients With COVID-19. **Kidney Med**, 3, n. 1, p. 54-59 e51, Jan-Feb 2021.

PREVENTION, C. f. D. C. a. **Guidance for Antigen Testing for SARS-CoV-2 for Healthcare Providers Testing Individuals in the Community (2022)**. 2022. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antigen-tests-guidelines.html> Acesso em: 02 Junho de 2022.

PUHACH, O. et al. Infectious viral load in unvaccinated and vaccinated individuals infected with ancestral, Delta or Omicron SARS-CoV-2. **Nat Med**, 2022.

RASTAWICKI, W. et al. Evaluation of PCL rapid point of care antigen test for detection of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal swabs. **J Med Virol**, v. 93, n. 4, p. 1920-1922, 2021.

RIBEIRO, Erica Milena de Castro. Desenvolvimento de biossensor para detecção direta de *Flavivirus* utilizando nanobastões de ouro. Orientador: Breno de Mello Silva. 2019.115. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação de Biotecnologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, 2019.

SAFIABADI TALI, S.H. et al. Tools and Techniques for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 Detection. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 34, p. e00228-20, 2021.

SAHOO SK, PARVEEN S, PANDA JJ. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine**, v. 3, n. 1, p. 20–31, 2007. doi:10.1016/j.nano.2006.11.008

SAKUDO, A.; BABA, K.; IKUTA, K. Capturing and concentrating adenovirus using magnetic anionic nanobeads. **Int J Nanomedicine.**, v.11, p.1847-1857, 2016. doi:10.2147/IJN.S104926

SAKUDO, A.; MASRINOUL, P.; TANAKA, Y.; IKUTA, K. Capture of dengue virus type 3 using anionic polymer-coated magnetic beads. **Int J Mol Med.**, v. 28, n. 4, p. 625–628, 2011.

SAKUDO A, IKUTA K. Efficient capture of infectious H5 avian influenza virus utilizing magnetic beads coated with anionic polymer. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 377, n. 1, p. 85-88, 2008.

SANG, S. et al. Progress of new label-free techniques for biosensors: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 465-81, 2015.

SANI, A.; CAO, C.; CUI, D. Toxicity of gold nanoparticles (GNPs): A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 26, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.100991>.

- SARDAR, S.; SHARMA, R.; ALYAMANI, T. Y. M.; ABOUKAMAR, M. COVID-19 and Plasmodium vivax malaria co-infection. **IDCases**, 21, p. e00879, 2020.
- SAYLAN, Y. et al. An Alternative Medical Diagnosis Method: Biosensors for Virus Detection. **Biosensors**, v. 9, p. 65, 2019. <https://doi.org/10.3390/bios9020065>
- SCARABELLI, L. et al. A "Tips and Tricks" Practical Guide to the Synthesis of Gold Nanorods. **J Phys Chem Lett.**, v. 6, n. 21, p. 4270-4279, 2015.
- SCOTTA, M. C. et al. Low performance of a SARS-CoV-2 point-of-care lateral flow immunoassay in symptomatic children during the pandemic. **J Pediatr (Rio J)**, v. 98, n. 2, p. 136-141, 2022.
- SHAND, H et al. New Age Detection of Viruses: The Nano-Biosensors. **Front. Nanotechnol**, v. 3, p.814550, 2022. doi: 10.3389/fnano.2021.814550
- SIDDIQUI, M. Z. Monoclonal antibodies as diagnostics; an appraisal. **Indian J Pharm Sci.**, v. 72, n. 1, p. 12-17, 2010. doi:10.4103/0250-474X.62229
- SIM, S.; WONG, N.K. Nanotechnology and its use in imaging and drug delivery (Review). **Biomed Rep.** v.14, n. 5, p. 42, 2021. doi:10.3892/br.2021.1418
- STANISAVLJEVIC, M. et al. Quantum dots-fluorescence resonance energy transfer-based nanosensors and their application. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 74, p. 562–574, 2015.
- SINGH, A. et al. Comparative Evaluation of Nasopharyngeal and Oropharyngeal Swab Based Rapid SARS-CoV-2 Antigen Detection and Real-Time RT-PCR for Diagnosis of COVID-19 in Tertiary Care Hospital. **Cureus**, v. 13, n. 7, p. e16785, Jul 2021.
- STEINHARDT, L. C. et al. Cross-Reactivity of Two SARS-CoV-2 Serological Assays in a Setting Where Malaria Is Endemic. **J Clin Microbiol**, v. 59, n. 7, p. e0051421, 2021.
- STRÖMER, A. et al. Performance of a Point-of-Care Test for the Rapid Detection of SARS-CoV-2 Antigen. **Microorganisms**. v. 9, n. 1, p. 58, 2021.
- SUNG, A. et al. Isolation of SARS-CoV-2 in Viral Cell Culture in Immunocompromised Patients With Persistently Positive RT-PCR Results. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 12, p. 804175, 2022.
- TALEGHANI, N.; TAGHIPOUR. F. Diagnosis of COVID-19 for controlling the pandemic: A review of the state-of-the-art. **Biosens Bioelectron.**, v. 174, p.112830, 2021. doi:10.1016/j.bios.2020.112830
- THAKUR, P. et al. Utility of Antigen-Based Rapid Diagnostic Test for Detection of SARS-CoV-2 Virus in Routine Hospital Settings. **Lab Med**, v. 52, n. 6, p. e154-e158, 2021.
- TINKER, S. C. et al. Point-of-Care Antigen Test for SARS-CoV-2 in Asymptomatic College Students. **Emerg Infect Dis**, v. 27, n. 10, p. 2662-2665, 2021.
- TORRES, M. D. T. et al. Low-cost biosensor for rapid detection of SARS-CoV-2 at the point of care. **Matter**, v. 4, n. 7, p. 2403-2416, 2021.
- UNICEF. Supply Division, Most Affordable COVID-19 Rapid Diagnostic Test Now Available. Disponível em: <https://www.unicef.org/supply/stories/most-affordable-covid-19-rapid-diagnostic-test-now-available>. Acessado em 2 junho de 2022.

VERDUYN, M. et al. Co-infection of dengue and COVID-19: A case report. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 14, n. 8, p. e0008476, Aug 2020.

VERSIANI, Alice Freitas. Desenvolvimento de nanoplateformas diagnósticas para detecção diferencial de infecções pelo vírus da dengue e pelo vírus da Zika baseados em nanopartículas de ouro. Orientador: Flávio Guimarães da Fonseca. 2018.189. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação do Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2018.

VERSIANI, A. F. et al. Nanosensors based on LSPR are able to serologically differentiate dengue from Zika infections. **Sci Rep**. v. 10, p. 11302, 2020. doi: 10.1038/s41598-020-68357-9.

VILLARREAL, A. et al. Performance of a Point of Care Test for Detecting IgM and IgG Antibodies Against SARS-CoV-2 and Seroprevalence in Blood Donors and Health Care Workers in Panama. **Front. Med.**, v. 8, p. 616106, 2021.

VILLAVERDE, S. et al. Diagnostic Accuracy of the Panbio Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Antigen Rapid Test Compared with Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction Testing of Nasopharyngeal Samples in the Pediatric Population. **J Pediatr**, v. 232, p. 287-289 e284, 2021.

WANG, J. et al. Gold nanoparticles in virus detection: Recent advances and potential considerations for SARS-CoV-2 testing development. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 14, n. 1, e1754, 2022. <https://doi.org/10.1002/wnan.1754>

WANG, L. et al. An observational cohort study of bacterial co-infection and implications for empirical antibiotic therapy in patients presenting with COVID-19 to hospitals in North West London. **J Antimicrob Chemother**, v. 76, n. 3, p. 796-803, 2021.

WANG, M.Y. et al. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 10, p. 587269, 2020. doi: 10.3389/fcimb.2020.587269

WANG, X. et al. Gold nanorod-based localized surface plasmon resonance biosensor for sensitive detection of hepatitis B virus in buffer, blood serum and plasma. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 2, p. 404-410, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.07.121>.

WANG, Y. et al. Low-Cost and Scalable Platform with Multiplexed Microwell Array Biochip for Rapid Diagnosis of COVID-19. **Research (Wash D C)**, p. 2813643, 2021.

WEI, S. et al. Field-deployable, rapid diagnostic testing of saliva for SARS-CoV-2. **Sci Rep**, v. 11, n. 1, p. 5448, Mar 9 2021.

**WHO, Global Partnership to Make Available 120 Million Affordable, Quality COVID-19 Rapid Tests for Low- and Middle-Income Countries.** 2020 a. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/28-09-2020-global-partnership-to-make-available-120-million-affordable-quality-covid-19-rapid-tests-for-low--and-middle-income-countries>. Acessado em: 02 de agosto de 2022.

**WHO, WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020.** 2020b. Disponível em: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>



**WHO, Advice on the use of point-of-care immunodiagnostic tests for COVID-19 (2020).** 2020c. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/advice-on-the-use-of-point-of-care-immunodiagnostic-tests-for-covid-19> Acesso em: 02 junho de 2022.

**WHO, Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection (2021).** 2021. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/antigen-detection-in-the-diagnosis-of-sars-cov-2infection-using-rapid-immunoassays> Acesso em: 02 junho de 2022.

**WHO, Zika virus disease - Outbreak 2015 – 2016.** 2016. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/situations/zika-virus-outbreak>

**WHO, Monkeypox outbreak 2022 Global.** 2022. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/situations/monkeypox-oubreak-2022>WHO, Coronavirus (COVID-19) Dashboard. 2020b. Disponível em: <https://covid19.who.int/> Acessado em: 02 junho de 2022.

XU, M. et al. COVID-19 diagnostic testing: Technology perspective. **Clin Transl Med.** 2020; 10:e158. <https://doi.org/10.1002/ctm2.158>

XUN, G. et al. A rapid, accurate, scalable, and portable testing system for COVID-19 diagnosis. **Nat Commun**, v. 12, n. 1, p. 2905, 2021.

ZAPP, E. et al. Liquid crystal and gold nanoparticles applied to electrochemical immunosensor for cardiac biomarker. **Biosensors & bioelectronics**, v. 59, p. 127–33, 2014.

ZHANG, P. et al. Magnetofluidic immuno-PCR for point-of-care COVID-19 serological testing. **Biosens Bioelectron**, v. 195, p. 113656, 2022.

ZHOU, J. *et al.* Functionalized gold nanorods for nanomedicine: Past, present and future. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 352, p. 15–66, 2017.

ZHU, Y.-J.; HU, X.-L. Microwave-polyol Preparation of Single-crystalline Gold Nanorods and Nanowires. **Chemistry Letters**, v. 32, n. 12, p. 1140–1141, 2003.

ZUBAREV, E. R.; VIGDERMAN, L. High-Yield Synthesis of Gold Nanorods with Longitudinal SPR Peak Greater than 1200 nm Using Hydroquinone as a Reducing Agent. **Chemistry of Materials**, v. 25, n.1450–1457, 2013.

## APÊNDICE I

**Tabela 1.** Testes POC e RDT para detecção direta de SARS-CoV-2.

Autor / Métodos usados	Sensibilidade			Especificidade / Acurácia	N	Reação cruzada
	Dia após o início dos sintomas					
	01 – 07	08 – 14	15 – 39			
Masiá <i>et al.</i> / Teste imunocromatográfico para detecção rápida do nucleocapsídeo SARS-CoV-2 em amostras de swab nasofaríngeo (NPS), swab nasal e saliva, Panbio COVID-19 Ag RTD (Abbott).	NPS: 60,5% Saliva: 23,1% Nasal samples: 44,7%	ND	ND	100% / ND	913 pacientes incluídos. 296 eram assintomáticos, confirmados por ensaio de RT-PCR.	ND
Krüger <i>et al.</i> / Teste imunocromatográfico para detecção rápida do nucleocapsídeo SARS-CoV-2 em swab nasofaríngeo , PanBio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device (Abbott).	90,8% overall	61,5% overall	ND	0-7 dias: 99,6% no geral / ND 08-14 dias: 100% no geral/ ND	1108 casos foram testados no total. A informação sobre a duração dos sintomas desde o dia do teste em dias estava disponível em 687 pacientes.	ND
Kolwijck, <i>et al.</i> / Teste imunocromatográfico para detecção rápida do nucleocapsídeo SARS-CoV-2 em amostra nasofaríngea , Panbio™ COVID-19 Ag RDT (Abbott).	86,7%	ND	ND	100% / ND	433 participantes, sendo 45 positivos por RT-qPCR.	ND
Rubio <i>et al.</i> / Teste imunocromatográfico para detecção rápida do nucleocapsídeo SARS-CoV-2 em swab nasofaríngeo , Panbio™ COVID-19 Ag RDT (Abbott).	72%	ND	ND	100% / ND	Foram avaliados 103 swabs nasofaríngeos, confirmados por RT-PCR .	ND
L'Huillier <i>et al.</i> / Teste imunocromatográfico para detecção rápida do nucleocapsídeo SARS-CoV-2 em swab nasofaríngeo , Panbio™ COVID-19 Ag RDT (Abbott).	66% overall	ND	ND	100% / ND	822 participantes pediátricos completaram o estudo com RT-PCR positivo.	ND
Villaverde <i>et al.</i> / Teste imunocromatográfico para detecção	45,4%	ND	ND	99,8% /	1620 pacientes pediátricos de 0 a 16 anos	ND

rápida do nucleocapsídeo SARS-CoV-2 em swab nasofaríngeo, Panbio™ COVID-19 Ag RDT (Abbott).				97,2%	com sintomas compatíveis com infecção respiratória aguda grave por SARS-CoV-2.	
Muhi <i>et al.</i> / Teste imunocromatográfico para detecção rápida do nucleocapsídeo SARS-CoV-2 em swab nasofaríngeo, Panbio™ COVID-19 Ag RDT (Abbott).	ND		ND	99,96% / ND	2.413 indivíduos testados em hospitais (ou clínicas de triagem associadas), nenhum indivíduo testou positivo usando RT-PCR.	
	100%	ND	ND	100% / 100%	26 participantes com COVID-19 (conforme notificado ao Departamento de Saúde e Serviços Humanos de Victoria) com o tempo de início dos sintomas variando de 1 a 33 dias.	ND
Merino <i>et al.</i> / Teste imunocromatográfico para detecção rápida do nucleocapsídeo SARS-CoV-2 em swab nasofaríngeo, Panbio™ COVID-19 Ag RDT (Abbott).	90,5%	ND	ND	98,8% / ND	Foram incluídos 958 indivíduos que apresentaram pelo menos um sintoma compatível com COVID-19 (n = 830) ou que estiveram em contato próximo com um paciente diagnosticado com COVID-19 (n = 128). RT-PCR foi positivo em 359 e negativo em 599.	ND
Albert <i>et al.</i> / Teste imunocromatográfico para detecção rápida do nucleocapsídeo SARS-CoV-2 em swab nasofaríngeo, Panbio™ COVID-19 Ag RDT (Abbott).	Adultos: 82,6% Pediatríco: 62,5% No geral: 79,6%	ND	ND	100% no geral / ND	412 pacientes com suspeita clínica de COVID-19, sendo 327 adultos e 85 crianças. 43 foram positivos por RT-PCR e 358 foram negativos.	ND
Carbonell-Sahuquillo <i>et al.</i> / Teste imunocromatográfico para detecção rápida do nucleocapsídeo SARS-CoV-2 em swab nasofaríngeo, Panbio™ COVID-19 Ag RDT (Abbott).	70,6%	ND	ND	100% / 95,6%	357 pacientes (0 a 14 anos) com suspeita clínica de COVID-19 ( $\leq 5$ dias desde o início dos sintomas). 34 tiveram resultado positivo por RT-PCR.	7 das 10 amostras com resultados discordantes (RT-PCR/RAID-) foram executadas em um ensaio de PCR multiplexado visando vírus respiratórios comuns. Duas das 7 amostras testaram positivo para <i>Rhinovirus/Enterovirus</i>
Kim <i>et al.</i> / Ensaio de fluxo lateral imunocromatográfico para detecção rápida de nucleocapsídeo SARS-CoV-2 em swab nasofaríngeo, GenBody™ COVID-19 Ag test (COVAG025).	90%	ND	ND	98% / 96,15%	130 swabs NPS residuais de indivíduos que visitaram ou foram hospitalizados no Centro Médico da Universidade de Yeungnam. 30	ND

					foram confirmados positivos para COVID-19 e 100 foram designados negativos, com base no ensaio RT-PCR.	
	94%			100% / 97%	200 swabs NPS sintomáticos e assintomáticos, com 100 amostras positivas por PCR em tempo real para COVID-19.	
Singh <i>et al.</i> / Ensaio de fluxo lateral imunocromatográfico para detecção rápida do nucleocapsídeo SARS-CoV-2 em swab nasofaríngeo e orofaríngeo, GenBody™ COVID-19 Ag test.	35,29%	ND	ND	100% / ND	240 amostras respiratórias (esfregaços de nasofaringe e orofaringe) foram coletadas de casos suspeitos de COVID-19. 102 amostras foram positivas para RT-PCR.	ND
Möckel <i>et al.</i> / Imunoensaio para a determinação rápida da presença do antígeno SARS-CoV-2 em swabs oro-nasofaríngeos humanos, Roche SARS-CoV-2 rapid antigen test (Penzberg, Germany).	Adulto: 75,3% Pediatrico:7 2%	ND	ND	Adulto: 100% / ND Pediatrico: 99,4% / ND	473 pacientes analisados (n = 271 pacientes do PS adulto e n = 202 do PS pediátrico).	ND
Jegerlehner <i>et al.</i> / Imunoensaio para a determinação rápida da presença do antígeno SARS-CoV-2 em swabs nasofaríngeos humanos, Roche SARS-CoV-2 rapid antigen test (Penzberg, Germany).	65,3%	ND	ND	99,9% / ND	1465 indivíduos foram testados, incluindo indivíduos que foram encaminhados por exposição a indivíduos infectados. 141 indivíduos testaram positivo de acordo com RT-PCR.	ND
Ciotti <i>et al.</i> / Teste imunocromatográfico para detecção rápida da nucleoproteína SARS CoV-2 em swabs nasofaríngeos, COVID-19 Ag Respi-Strip (Coris BioConcept).	30,77%	ND	ND	100% / 86,15%	50 amostras foram testadas, 39 confirmadas por RT-PCR em tempo real.	ND
Kanaujia <i>et al.</i> / Teste imunocromatográfico para detecção rápida de SARS CoV-2 em swabs nasofaríngeos, COVID-19 Ag Respi-Strip (Coris BioConcept).	71,96%	ND	ND	99,32% / 88,64%	825 pacientes sintomáticos e seus contatos foram incluídos no estudo; RT-PCR e detecção de antígenos foram realizados simultaneamente para 484 amostras para determinar a sensibilidade e especificidade do teste.	ND
Strömer <i>et al.</i> / Imunoensaio cromatográfico de fluxo lateral para detecção rápida da nucleoproteína SARS-CoV-2 em swab nasofaríngeo, ADAL ® COVID-19 Ag (nal von minden GmbH).	73,1% no geral	ND	ND	99,3% / ND	Foram utilizadas 134 amostras de swab do trato respiratório superior. 124 eram amostras positivas e 10 eram amostras negativas confirmadas por RT-PCR triplex	ND

do gene N.						
Thakur <i>et al.</i> / Ensaio de fluxo lateral imunocromatográfico para a determinação rápida do antígeno SARS-Cov-2 em swabs nasofaríngeos fabricados por PathoCatch/ACCUCARE, (Lab Care Diagnostics Private Ltd.).	34,5%	ND	ND	99,8% / 91,7%	677 pacientes foram testados incluem pacientes assintomáticos. 55 amostras que testaram positivo por RT-qPCR.	ND
Chaimayo <i>et al.</i> / Imunoensaio cromatográfico para detecção rápida do nucleocapsídeo SARS-CoV-2 em amostras respiratórias (principalmente swabs nasofaríngeos e de garganta), Standard™ Q COVID-19 Ag kit (SD Biosensor®).	98,33%	ND	ND	98,73% / ND	Foram avaliadas 454 amostras respiratórias com suspeita de COVID-19. 60 foram positivos e 394 foram negativos por ensaio de RT-PCR em tempo real.	ND
Amer <i>et al.</i> / Imunoensaio cromatográfico para detecção rápida do nucleocapsídeo SARS-CoV-2 em swabs orofaríngeos e nasofaríngeos, Standard™ Q COVID-19 Ag kit (SD Biosensor®).	78,2%	ND	ND	64,2% / 75,9%	83 swabs orofaríngeos e nasofaríngeos foram avaliados de participantes com suspeita de infecção por COVID-19. 54 foram positivos por RT-qPCR.	ND
Diao <i>et al.</i> / Ensaio imunocromatográfico de fluorescência (FIC) para detecção rápida do nucleocapsídeo SARS-CoV-2 em swabs nasofaríngeos, fabricado pelos autores.	75,6%	ND	ND	100% / 80,5%	251 participantes com suspeita de sintomas de COVID-19. O valor Ct 40 é o ponto de corte do teste RT-PCR. 201 teve um valor de Ct ≤40.	ND
Mboumba-Bouassa <i>et al.</i> / Imunoensaio cromatográfico para detecção rápida do nucleocapsídeo SARS-CoV-2 em swabs nasofaríngeos, Ag-RDT SIENNA™ COVID-19 Antigen Rapid Test Cassette (Nasopharyngeal Swab)(SIENNA™).	90%	ND	ND	100% / 90%	100 swabs de RNA positivos e 50 negativos de SARS-CoV-2 por referência multiplex rtRT-PCR.	ND
Tinker <i>et al.</i> / Imunoensaio de fluxo lateral para detecção rápida do nucleocapsídeo SARS-CoV-2 em swabs nasais anteriores diretos (narinas), BinaxNOW COVID-19 Ag Card (BinaxNOW; Abbott Laboratories).	20%	ND	ND	100% / ND	1.540 casos assintomáticos foram testados. 40 positivos confirmados com RT PCR.	Nenhuma amostra apresentou resultado positivo para vírus Influenza A ou B.
Orsi <i>et al.</i> / Imunoensaio de fluorescência qualitativo (FIA) para detecção rápida do nucleocapsídeo SARS-CoV-2 em swabs nasofaríngeos, FRIEND™ COVID-19 Ag assay (NanoEntek, South Korea).	93,3%	86,7%	ND	100% / ND	110 amostras nasofaríngeas de pa-pacientes com sintomas atribuíveis à infecção por SARS-CoV-2. 60 dos swabs testaram positivo por RT-qPCR.	ND
Cassuto <i>et al.</i> / Ensaio imunocromatográfico de fluxo lateral para detecção rápida do nucleocapsídeo SARS-CoV-2 em uma	96,88%	ND	ND	100% / ND	234 pacientes com sintomas leves a moderados com duração inferior a 7 dias e	ND

amostra nasal, COVID-VIRO® (AAZ-LMB).					sem necessidade de internação imediata. RT-PCR confirmou 32 amostras positivas e 202 negativas.	
Rastawicki, <i>et al.</i> / Imunoensaio fluorescente (FIA), PCL COVID-19 Ag (SD BIOSENSOR, Korea).	38,9%	ND	ND	83,3% / ND	167 swabs nasofaríngeos.	ND
Bianco <i>et al.</i> / Ensaio de imunofluorescência microfluídica para detecção da proteína do nucleocapsídeo de SARS-CoV-2 in nasal, LumiraDx™ (LumiraDx GmbH, Colônia, Alemanha).	90,3% no geral	ND	ND	92,1% no geral / ND	Foram avaliados 907 pacientes, incluindo participantes assintomáticos. Como resultado, 298 participantes foram positivos para SARS-CoV-2 confirmados por RT-PCR.	ND
Krüger <i>et al.</i> / Ensaio de imunofluorescência microfluídica para detectar a proteína nucleocapsídeo de SARS-CoV-2 em auto-swab nasal mid-turbinate (NMT) fabricado pela LumiraDx™ (LumiraDx™, London, United Kingdom).	82,2%	ND	ND	99,3% / ND	Foram avaliadas 761 amostras, sendo 146 positivas para RT-PCR e 615 negativas.	As amostras de swab respiratórios continham quatro corona-vírus sazonais, <i>Adenovirus</i> , <i>Bocavirus</i> , <i>Influenza virus</i> , <i>Metapneumovirus</i> , <i>Parainfluenza virus</i> , <i>Respiratory syncytial virus</i> , <i>Rhinovirus</i> ou <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Streptococcus sp.</i> Nenhuma reatividade cruzada foi detectada.
Drain <i>et al.</i> / Ensaio de imunofluorescência microfluídica para detectar a proteína nucleocapsídeo do SARS-CoV-2 em swab nasal e nasofaríngeo (NP) fabricado pela LumiraDx™ (LumiraDx™, Reino Unido).	ND	Até 12 dias: 97,6% (cotonete nasal) 97,5% (cotonete NP)	ND	96,6% (swab nasal) / ND 97,7% (NP swab) / ND	512 participantes, de 0 a 90 anos.	ND
Liu <i>et al.</i> / Teste de papel de quimioluminescência Nanozyme para detecção rápida e sensível do antígeno SARS-CoV-2, fabricado pelos autores.	ND	ND	ND	ND / ND	As amostras virais eram proteínas de pico recombinantes (título de $2 \times 10^4$ TCID50/mL) e 98% de pureza confirmada por SDS-PAGE.	Outros coronavírus humanos (SARS-CoV, MERS-CoV, HCoV-HKU1 e HCoV-OC43) foram testados para validar a especificidade. Não houve reação cruzada com outros coronavírus ou subtipos de influenza

						A.
Egerer <i>et al.</i> / Amplificação isotérmica mediada por transcriptase reversa (RT-LAMP) para detecção rápida de genes SARS-CoV-2 N e ORF8 na orofaringe, eazyplex® SARS-CoV-2 (Amplex Diagnostics, Gars Bahnhof, Germany).	Ct ≤28: 97,4%	ND	ND	100% / ND	150 swabs orofaríngeos e nasais foram avaliados e confirmados por RT-PCR.	ND
Wang <i>et al.</i> / Biochip de micropoços RT-LAMP multiplexado para detecção rápida do gene SARS-CoV-2 ORF1ab em swab de garganta, fabricado pelos autores.	95,4%	ND	ND	95,35% / ND	87 amostras de pacientes PCR-positivos e 43 PCR-negativos.	ND
Xun <i>et al.</i> / Scalable and Portable Testing (SPOT) assay comprise a one-pot RT-LAMP followed by PfAgo-based target sequence detection (detecting the N gene and E gene in a multiplexed reaction) in clinical saliva samples.	93,3%	ND	ND	98,6% / ND	104 in total saliva samples, confirmed by qRT-PCR.	Samples of saliva were spiked with or without SARS-CoV-2, three other genomic RNA from human coronaviruses (OC43, 229E, and NL63), SARS, and MERS viruses ( $\gamma$ -irradiated), and Influenza. Among these samples, SARS-CoV-2 genes were only detected in the positive control.
de Oliveira Coelho <i>et al.</i> / Amplificação isotérmica mediada por loop de transcrição reversa (RT-LAMP) para a determinação rápida de cópias de SARS-CoV-2 em amostras de swabs de rayon nasais e orais, fabricadas pelos autores.	93,8 %	ND	ND	90,4% / ND	Foram avaliadas 466 amostras. 250 foram negativos e 216 foram positivos por RT-qPCR.	ND
Wei <i>et al.</i> / Amplificação isotérmica mediada por loop de alto desempenho (HP-LAMP) para a determinação rápida de cópias de SARS-CoV-2 em amostras de saliva.	> 96%	ND	ND	> 96% / ND	Foram avaliadas 120 amostras.	O teste úmido foi realizado para avaliar a potencial reatividade cruzada do ensaio com outros organismos usando o Painel de Verificação Respiratória NATrol da ZeptoMetrix Corporation (ZeptoMetrix, NATRVP-IDI), incluindo 19 patógenos respiratórios, NATrol Coronavirus-SARS Stock, NATrol MERS-CoV Stock e NATrol Controle de execução externa de coronavírus 2 relacionado a SARS. Nenhuma reatividade

									cruzada foi detectada.
Lee <i>et al.</i> / CRISPR Detecção óptica de anisotropia para detecção rápida de cópias de SARS-CoV-2 em swabs ou escarro nasofaríngeo ou orofaríngeo, fabricado pelos autores.	ND	ND	ND	ND / ND	20 amostras clínicas de esfregaços nasofaríngeos e orofaríngeos e escarro de indivíduos com suspeita de COVID-19. 10 amostras positivas para COVID-19 e 10 amostras negativas foram confirmadas por qRT-PCR.				ND
Li, F., <i>et al.</i> / amplificação auxiliada por recombinase de transcrição reversa (RT-RAA) para detecção rápida de SARS-CoV-2 em swab de garganta.	Ct (22,1 a 32,8): 98% Ct (33,2 a 36,4): 33%	ND	ND	100% / ND	80 amostras de swab de garganta foram coletadas dos pacientes infecciosos suspeitos de SARS-CoV-2, confirmados por qRT-PCR.				Foram testados 8 vírus respiratórios de RNA, incluindo vírus Influenza A (H3N2, H7N9, H5N1, H1N1) e vírus Influenza B (linhagens Victoria e Yamagata), que foram isolados de humanos ou aves e adenovírus (AdV3 da cepa IVCAS16(A).00027 e AdV7 da cepa IVCAS 16(A).00028). Os genomas de RNA não direcionados geraram linhas de base semelhantes ao controle negativo (água).
Margulis <i>et al.</i> / Biossensor de modulação magnética (MMB) para detecção rápida de SARS-CoV-2 em swabs nasofaríngeos.	97,8%	ND	ND	100% / ND	Foram testadas 309 amostras clínicas de pacientes positivos para SARS-CoV-2 e negativos para SARS-CoV-2 com uma ampla gama de cargas virais iniciais (CT ≤ 42).				30 amostras de swab nasofaríngeo coletadas em 2019 de pacientes com diferentes doenças respiratórias virais, como influenza A (13 amostras), influenza B (10 amostras) e vírus sincicial respiratório (7 amostras), foram testadas para avaliar a especificidade do ensaio mais. Todas as amostras de SARS-CoV-2 foram identificadas como negativas.
Torres <i>et al.</i> / RAPID 1.0 (protótipo de detecção impedimétrica portátil precisa em tempo real 1.0) em saliva, swabs nasofaríngeos e orofaríngeos, fabricados pelos autores.	NP/ OP: 83,5% Saliva: 100%	ND	ND	NP/OP: 100% / 87,1%  Saliva: 86,5% / 90%	Um total de 151 swabs de saliva e (NP/OP) foram avaliados, confirmados por RT-PCR.				Realizou ensaios de especificidade com três coronavírus (MHV - <i>Murine hepatitis virus</i> , HCoV-OC43 – coronavirus humano OC43 e coronavirus humano 229E) e quatro cepas virais não-coronavírus (H1N1 - A / California / 2009, H3N2 - A /



Nicaragua, Influenza B - B / Colorado, HSV2 - *Herpes simplex virus-2*). Nenhuma reatividade cruzada foi detectada.

**Tabela 2.** Testes sorológicos POC e RDT para detecção de anticorpos contra SARS-CoV-2.


Autor / Métodos usados	Sensibilidade			Especificidade / Acurácia	N	Reação cruzada
	Dia após o início dos sintomas					
	01 – 07	01 – 07	01 – 07			
Kumar <i>et al.</i> / A plataforma eletroquímica de ELISA detecta anticorpos IgM e IgG contra a glicoproteína de pico SARS-CoV-2 (S1) em amostras clínicas de sangue total e soro.anuPath™ Electrochemical ELISA Analyzer.	ND	ND	100%	100% / 100%	Foram avaliadas 450 amostras, das quais 252 eram amostras de sangue total EDTA e 198 eram amostras de soro.	ND
Munck <i>et al.</i> / COVID-19 IgG/IgM Duo é um imunoenensaio de fluxo lateral fluorescente que detecta anticorpos IgM e IgG contra a proteína do nucleocapsídeo (N) SARS-CoV-2 separadamente em amostras de soro.NanoEntec.	46,2%	93,8%	100%	IgM: 87,5% IgG: 91,7% IgG/IgM: 95,8% / ND	Foram avaliadas 105 amostras de soro, confirmadas por PCR.	Resultados falso-positivos foram encontrados em duas amostras com anticorpos para outros vírus corona (NL63 e HKU1) e uma amostra com IgG de capsídeo viral de Epstein Barr.
Peng <i>et al.</i> / Teste de imunoenensaio de fluxo lateral para detecção rápida de anticorpos IgM e IgG específicos contra o nucleocapsídeo e proteína S-RBD recombinante de SARS-CoV-2 em amostras de soro, fabricado pelos autores,	Anti-N IgG: 96,6% Anti-N igM: 96,6% Anti-S-RBD-IgG: 95,9% Anti-S-RBD-IgM: 96,6%	ND	ND	Anti-N IgG: 94,1% / ND Anti-N igM: 100% / ND Anti-S-RBD-IgG: 96,1% / ND Anti-S-RBD-IgM: 100% / ND	108 amostras de soro foram testadas, 82 positivos de 83 confirmados com CLIA	ND
Kiziloglu <i>et al.</i> / Imunocromatografia de ouro para a detecção	57,5%	ND	ND	85,5% / ND	181 casos foram testados: 71	ND

rápida de anti-SARS-CoV-2-IgG e IgM fabricado pela Bioeasy COVID-19 Coronavirus IgG/IgM GICA Rapid Test Kit ©,						positivos foram confirmados clinicamente (teste RT-PCR),	
Plebani <i>et al.</i> / Ensaio imunocromatográfico que detecta anticorpos IgM e IgG contra a proteína spike SARS-CoV-2 (S1) e a proteína do nucleocapsídeo em uma amostra de soro ou plasma, COVID19SEROSpeed-IgM-IgG (BioSpeedia),	ND	ND	92,5%	98,1% / ND		710 amostras, Para análise de especificidade, foram analisadas 215 amostras de soro pré-pandemia, Para análise de sensibilidade, as amostras foram positivas por qRT-PCR,	Quatro amostras falso-positivas testaram positivo para IgG em três delas e IgM em uma delas; dois desses quatro pacientes apresentaram IgM direcionada para <i>Mycoplasma pneumoniae</i> e <i>Toxoplasma gondii</i> , respectivamente,
Villarreal <i>et al.</i> / Imunocromatografia de ouro para a detecção rápida de anticorpos IgM e IgG específicos contra a proteína nucleocapsídeo (N) SARS-CoV-2 em amostras de soro, fabricada pelo grupo do Dr, Chong Li do Instituto de Biofísica da Academia Chinesa de Ciências,	36,4% for IgM e IgG	76,2% (IgM) e 71,4% (IgG)	87,0% for IgM e IgG	95,0% / ND		810 amostras de soro, confirmadas por qRT-PCR e um conjunto de amostras de painel pré-pandemia,	A reação cruzada foi testada em amostras pré-pandemia de pacientes com dengue, tuberculose pulmonar e infecção latente por tuberculose, Apenas um paciente que testou positivo para Dengue apresentou IgM positivo,
Scotta <i>et al.</i> / Fluxo lateral para detecção rápida de anticorpos IgM e IgG específicos contra a proteína spike SARS-CoV-2 na amostra de sangue, fabricado pela Wondfo Biotech,	ND	60,0%	73,2%	96,8% no geral / ND		Foram avaliadas 175 amostras de sangue total de pacientes pediátricos, confirmadas por qRT-PCR,	ND
Fauziah <i>et al.</i> / Imunoensaio qualitativo de fluxo lateral para detecção rápida de anticorpos IgM e IgG específicos contra SARS-CoV-2 em amostras de soro e sangue capilar, fabricado pela Guangzhou Wondfo Biotech Co., Ltd,	Soro: 63%, Sangue capilar: 41,2%	ND	ND	Soro: 95% / 78,7% Sangue capilar: 100% / 50%		Da amostra de 47, 27 pacientes tiveram um resultado de rRT-PCR positivo,	A reação cruzada foi testada em amostras de soro de um paciente com Dengue ou febre tifoide, Nenhuma reatividade cruzada foi observada,
Pallett <i>et al.</i> / Imunoensaio de fluxo lateral para detecção rápida de anticorpos IgM e IgG específicos contra SARS-CoV-2 em amostras de sangue, OrientGene COVID-19 split IgG / IgM (OrientGene),	74%	86%	100%	96% / ND		200 amostras, 50 negativas e 130 positivas das 150 positivas foram confirmadas com RT PCR,	ND
Prendecki <i>et al.</i> / Imunoensaio de fluxo lateral para detectar rapidamente anticorpos IgG específicos contra a proteína spike SARS-CoV-2 em amostras de sangue, soro e plasma, fabricado	ND	ND	96,6%	97,7% / 97,3%		Sessenta amostras foram coletadas de pacientes em hemodiálise de manutenção e receptores de	ND


pela Biomedomics Inc,						transplante renal. Todos os pacientes foram submetidos ao teste de RT-PCR, E 88 amostras de plasma eram pré-pandemia,
Zhang <i>et al.</i> / Ensaio de plataforma de imuno-PCR magnetofluídico para detecção de imunoglobulina G (IgG) anti-SARS-CoV-2 usando um instrumento magnetofluídico, fabricado pelos autores,	ND	ND	93,8% no geral	98,3% / ND		Foram testadas 108 amostras, das quais 34 eram 34 amostras de plasma convalescentes de pacientes com SARS-CoV-2 confirmadas com o teste Roche ECLIA (Elecys® Anti-SARS-CoV-2), 14 amostras de soro convalescentes confirmadas por uma sorologia personalizada teste baseado em esferas e 40 amostras de soro e 20 amostras de plasma como controles negativos,
Elledge <i>et al.</i> / Sensor de anticorpo Split luciferase (spLUC) para a detecção rápida de anticorpos específicos contra o nucleocapsídeo e a proteína S-RBD recombinante do SARS-CoV-2 em amostras de soro, plasma, sangue total e saliva, fabricado pelos autores,	ND	ND	Anticorpo anti-proteína S: 89% Anticorpo anti-proteína N: 98%	Anticorpo anti-proteína S: 100% Anticorpo anti-proteína N: 99% / ND	Teste de mais de 150 amostras de soro/plasma de pacientes,	Eles foram testados para amostras sazonais de pacientes com coronavírus e 20 amostras de vacinas contra influenza pré e pós-vacinação, Esses controles geraram sinais luminescentes significativamente mais baixos do que as amostras de soro de pacientes com COVID-19,
Li, K., <i>et al.</i> / Teste de ensaio de fluxo lateral para a detecção rápida de anticorpos IgA, IgM e IgG específicos contra a proteína N recombinante e proteína S1 recombinante do SARS-CoV-2 em amostras de soro e plasma fabricadas pelos autores,	ND	ND	88,56%	88,56% / ND	O kit foi usado para testar o soro de 43 pacientes com suspeita de COVID-19, 97 pacientes com COVID-19 e 88 com febre geral ou pacientes com infecção pulmonar,	Reatividade cruzada em pacientes infectados por <i>M. pneumoniae</i> e infecção do trato respiratório,

## APÊNDICE II

### Artigos científicos publicados que deram origem à parte desse trabalho.





International Journal of  
*Translational Medicine*



Review


### Update on Rapid Diagnostics for COVID-19: A Systematic Review

Bruna de Paula Dias<sup>1</sup>, Ricardo Lemes Gonçalves<sup>1</sup>, Cyntia Silva Ferreira<sup>1</sup>, Camila Cavadas Barbosa<sup>1</sup>, Orlando Alfredo Pineda Arrieta<sup>1</sup>, Samara Mayra Soares Alves dos Santos<sup>1</sup>, Wellington Carvalho Malta<sup>1</sup>, Mariela Alves e Silva<sup>1</sup>, Maria Laura Maximiano Dias Gomes<sup>1</sup>, Adriana Gíbara Guimarães<sup>2</sup>, Lysandro Pinto Borges<sup>2,\*</sup> and Breno de Mello Silva<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biological Sciences, Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto 35400-000, Brazil; bdiacmt@gmail.com (B.d.P.D.); ricardolemesg@gmail.com (R.L.G.); csf.ferreira@gmail.com (C.S.F.); camilacavadas@yahoo.com.br (C.C.B.); oapar1995@gmail.com (O.A.P.A.); samara1mayra@gmail.com (S.M.S.A.d.S.); wellington.malta@aluno.ufop.edu.br (W.C.M.); marielaees@gmail.com (M.A.e.S.); malauidiasg@yahoo.com.br (M.L.M.D.G.)  
<sup>2</sup> Department of Pharmacy, Federal University of Sergipe, São Cristóvão 9100-000, Brazil; adrianagibara@hotmail.com  
\* Correspondence: lysandro.borges@gmail.com (L.P.B.); breno@ufop.edu.br (B.d.M.S.)

---

International Immunopharmacology 101 (2021) 106144




ELSEVIER


Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

### International Immunopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/intimp](https://www.elsevier.com/locate/intimp)




### Artigo científico publicado como primeira autora



Assuntos Gerais

<http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170743> *Quim. Nova*, Vol. 44, No. 8, 1084-1092, 2021


### A NANOTECNOLOGIA NO BRASIL E O DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Bruna de Paula Dias<sup>a</sup>, Erica Milena de Castro Ribeiro<sup>a</sup>, Ricardo Lemes Gonçalves<sup>a</sup>, Diego Santos Oliveira<sup>a</sup>, Tiago Hilário Ferreira<sup>b</sup> e Breno de Mello Silva<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, 35400-000 Ouro Preto – MG, Brasil  
<sup>b</sup>INNOMA – Innovative Materials, 31270-150 Belo Horizonte – MG, Brasil


Recebido em 13/09/2020; aceito em 02/03/2021; publicado na web em 24/03/2021

## Artigo científico publicado como coautora



### Journal of Biomolecular Structure and Dynamics

ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/tbsd20>




## SARS-CoV-2 mutations and where to find them: an *in silico* perspective of structural changes and antigenicity of the spike protein

Ricardo Lemes Gonçalves , Túlio César Rodrigues Leite , Bruna de Paula Dias , Camila Carla da Silva Caetano , Ana Clara Gomes de Souza , Ubiratan da Silva Batista , Camila Cavadas Barbosa , Arturo Reyes-Sandoval , Luiz Felipe Leomil Coelho & Breno de Mello Silva

To cite this article: Ricardo Lemes Gonçalves , Túlio César Rodrigues Leite , Bruna de Paula Dias , Camila Carla da Silva Caetano , Ana Clara Gomes de Souza , Ubiratan da Silva Batista , Camila Cavadas Barbosa , Arturo Reyes-Sandoval , Luiz Felipe Leomil Coelho & Breno de Mello Silva (2020): SARS-CoV-2 mutations and where to find them: an *in silico* perspective of structural changes and antigenicity of the spike protein, Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, DOI: [10.1080/07391102.2020.1844052](https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1844052)

## Capítulo de livro publicado como coautora



### DECLARAÇÃO DE ACEITE

A Atena Editora, especializada na publicação de livros e coletâneas de artigos científicos em todas as áreas do conhecimento, com sede na cidade de Ponta Grossa-PR, declara que após avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta editora, o artigo intitulado "NOVOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE FLAVIVÍRUS COM NANOPARTÍCULAS DE OURO" de autoria de "BRENO DE MELLO SILVA, CYNTHIA SILVA FERREIRA, TÚLIO CÉSAR RODRIGUES LEITE, BRUNA DE PAULA DIAS, RICARDO LEMES GONÇALVES, SAMARA MAYRA SOARES ALVES DOS SANTOS , CAMILA CAVADAS BARBOSA, ERICA MILENA DE CASTRO RIBEIRO", foi aprovado e encontra-se no prelo para publicação no livro eletrônico "Virologia: Molecular e Clínica" a ser divulgado em julho de 2021.

Agradeço a escolha pela Atena Editora como meio de transmitir ao público científico e acadêmico o trabalho e parabeno os autores pelo aceite de publicação.

Reitero protestos de mais elevada estima e consideração.

PONTA GROSSA, 27 de maio de 2021.