

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Lívia Mara Silva

**Desenvolvimento de Reagente para Extração Rápida de Ácidos Nucleicos e Kit
Multiplex para Detecção de Variantes do SARS-CoV-2 por RT-qPCR**

Juiz de Fora

2025

Livia Mara Silva

**Desenvolvimento de Reagente para Extração Rápida de Ácidos Nucleicos
e Kit Multiplex para Detecção de Variantes do SARS-CoV-2 por RT-qPCR**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Pittella Silva

Coorientador: Prof. Dr. Olavo dos Santos Pereira Junior

Juiz de Fora

2025

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Mara Silva, Livia .

Desenvolvimento de Reagente para Extração Rápida de Ácidos Nucleicos e Kit Multiplex para Detecção de Variantes do SARS-CoV-2 por RT-qPCR / Livia Mara Silva. -- 2025.

161 f. : il.

Orientador: Frederico Pittella Silva

Coorientador: Olavo dos Santos Pereira Junior

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2025.

1. SARS-CoV-2. 2. Extração de ácidos nucleicos. 3. RT-qPCR. I. Pittella Silva, Frederico , orient. II. dos Santos Pereira Junior, Olavo , coorient. III. Título.

Livia Mara Silva

Desenvolvimento de Reagente para Extração Rápida de Ácidos Nucleicos e Kit Multiplex para Detecção de Variantes do SARS-CoV-2 por RT-qPCR

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos.

Aprovada em 27 de junho de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Frederico Pittella Silva - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Olavo dos Santos Pereira Júnior - Coorientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Camila Siqueira Silva

U. S. FDA - National Center for Toxicological Research

Dr. Jaime Henrique Amorim Santos

Universidade Federal do Oeste da Bahia

Dr. Aripuanã Sakurada Aranha Watanabe

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Thiago César Nascimento

Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 05/06/2025.



Documento assinado eletronicamente por **Frederico Pittella Silva, Professor(a)**, em 30/06/2025, às 13:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Camila Siqueira Silva, Usuário Externo**, em 30/06/2025, às 13:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jaime Henrique Amorim Santos, Usuário Externo**, em 30/06/2025, às 14:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Aripuana Sakurada Aranha Watanabe, Professor(a)**, em 30/06/2025, às 16:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Cesar Nascimento, Professor(a)**, em 30/06/2025, às 23:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Olavo dos Santos Pereira Junior, Professor(a)**, em 01/07/2025, às 08:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **2438706** e o código CRC **2F47F0A0**.

A todos os profissionais da linha de frente da pandemia, cuja coragem silenciosa,
dedicação incansável e humanidade generosa salvaram vidas e inspiraram
esperança mesmo nos dias mais sombrios.

AGRADECIMENTOS

O doutorado foi, para mim, um processo de profunda transformação. Um caminho muitas vezes solitário, em que cresci, me reinventei e precisei me escutar de verdade.

Agradeço a Deus, pela presença silenciosa e constante. Por cuidar de mim com tanta delicadeza, especialmente nos momentos em que o silêncio do mundo parecia ensurdecedor.

Agradeço ao meu orientador, Fred, por acreditar neste trabalho e em mim, mesmo quando eu duvidava. Por respeitar meu tempo, minha forma de pensar e de sentir a ciência. Obrigada pela escuta e confiança.

Ao professor Olavo, meu coorientador, agradeço pela generosidade, pela prática e pelas contribuições sempre precisas. Suas intervenções foram fundamentais em momentos decisivos da pesquisa.

Ao Biomol e seus participantes e a UFJF, meu refúgio e minha segunda casa durante esses anos. Foi nele que eu vivi intensamente, chorei, ri, errei, aprendi, me superei. Foi nesse espaço que tudo aconteceu: as descobertas científicas, os tropeços, as ideias mirabolantes, os silêncios compartilhados, e principalmente, o nascimento do que hoje se tornou esta tese.

À minha família, minha base desde sempre, meu amor mais antigo. Obrigada por me ensinarem a ter coragem, a ser persistente e a não desistir. Agradeço por celebrarem comigo cada conquista, por compreenderem minha ausência em tantos momentos e por nunca deixarem de torcer por mim.

Agradeço, com todo o meu coração, a quem me deu tanto amor nesse tempo e sempre me curou de toda loucura. Foi no olhar, nas palavras trocadas no tempo certo, na conexão que atravessa qualquer tempo, que encontrei inspirações nos dias mais escuros. Obrigada por ser guia que caminhou ao meu lado em todos os momentos.

Ao Yoshinho, meu *little boy*, que sentiu mais do que ninguém a minha ausência — e, ao mesmo tempo, foi quem mais esteve presente durante todo o processo de escrita. Obrigada pela paciência silenciosa, pelos olhos atentos, pelo fucinho gelado encostado ao lado da cadeira, sempre trazendo o maior carinho do mundo... enquanto eu pensava que era eu quem estava cuidando de você.

Aos amigos mais próximos, obrigada por me lembrarem de que há vida fora do laboratório. Por me arrancarem sorrisos, pelos cafés, vinhos, cervejas, comidas afetivas, conversas e distrações necessárias. Cada pausa ao lado de vocês foi um respiro que me manteve firme.

Agradeço, também, a quem me incentivou mesmo sem entender direito o que eu fazia. Aos que me escutaram desabafar sobre experimentos e cansaço sem nunca reclamar.

E aos que estiveram comigo no começo dessa jornada, mas que hoje já não estão mais presentes, física ou emocionalmente, meu agradecimento profundo. Vocês foram parte essencial do primeiro passo, e isso nunca será esquecido.

A todos vocês, minha gratidão.

"Como não tens experiência nas coisas do mundo, todas as coisas que têm algo de dificuldade te parecem impossíveis. Confia no tempo, que costuma dar doces saídas a muitas amargas dificuldades." (*Dom Quixote de La Mancha*, Miguel de Cervantes)

RESUMO

Desde o início de 2020, a humanidade enfrentou os desafios impostos pela pandemia de COVID-19, uma doença respiratória causada pelo vírus SARS-CoV-2. A resposta global para conter essa pandemia concentrou-se, entre outras ações, no desenvolvimento de diagnósticos precisos, vacinas eficazes e busca de medicamentos adequados. No entanto, obstáculos significativos foram enfrentados no campo de diagnóstico, devido à escassez de materiais para coleta, processamento e análise de amostras por meio da RT-qPCR, técnica fundamental na detecção do vírus. Um dos principais desafios encontrados foi a demora e o alto custo dos procedimentos de extração de ácidos nucleicos, dificultando a realização de diagnósticos eficientes. Além disso, os complexos procedimentos de preparo de amostras aumentaram o risco de contaminação e atrasavam o processo diagnóstico. Associado a isso, o surgimento de novas variantes do vírus evidenciou a necessidade de vigilância epidemiológica para conter novas ondas e a importância de kits de detecção capazes de auxiliar ações de monitoramento. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver um reagente de extração rápida de ácidos nucleicos, visando agilizar e tornar mais acessível o diagnóstico por RT-qPCR. Além disso, o estudo propôs o desenvolvimento de um kit multiplex para detecção de variantes do SARS-CoV-2 por meio dessa técnica. Os resultados obtidos demonstraram que o reagente desenvolvido possibilitou análises confiáveis por PCR qualitativa. Esse reagente não apenas apresentou eficácia, mas também se mostrou vantajoso na redução de custos com insumos laboratoriais e materiais plásticos, além de minimizar o risco de contaminação. O kit multiplex para detecção de variantes do SARS-CoV-2 demonstrou eficácia na diferenciação entre variantes, evidenciando que a RT-qPCR pode ser uma ferramenta essencial no monitoramento da evolução do vírus. Com a implementação bem-sucedida desse reagente e do kit multiplex, espera-se agilizar o processo diagnóstico de muitas enfermidades e um acompanhamento melhor do surgimento de novas variantes. Esse avanço tecnológico representa um marco na luta contra a pandemia, oferecendo uma solução viável e eficiente para a detecção rápida e confiável do vírus. Além disso, sua aplicação pode contribuir significativamente para o controle da disseminação da doença e para o fortalecimento da saúde pública global.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; extração de ácidos nucleicos; RT-qPCR; multiplex.

ABSTRACT

Since the beginning of 2020, humanity has faced the challenges imposed by the COVID-19 pandemic, a respiratory disease caused by the SARS-CoV-2 virus. The global response to contain this pandemic focused, among other actions, on the development of accurate diagnostics, effective vaccines, and the search for appropriate medications. However, significant obstacles were encountered in the field of diagnostics due to the shortage of materials for sample collection, processing, and analysis through RT-qPCR, a key technique in virus detection. One of the main challenges faced was the delay and high cost of nucleic acid extraction procedures, which hindered efficient diagnostic efforts. Furthermore, the complex procedures involved in sample preparation increased the risk of contamination and delayed the diagnostic process. In addition, the emergence of new virus variants highlighted the need for epidemiological surveillance to contain new waves and the importance of detection kits capable of supporting monitoring actions.

In this context, the present work aimed to develop a rapid nucleic acid extraction reagent to speed up and make RT-qPCR diagnosis more accessible. Moreover, the study proposed the development of a multiplex kit for the detection of SARS-CoV-2 variants using this technique. The results obtained demonstrated that the developed reagent enabled reliable analyses through qualitative PCR. This reagent not only proved to be effective but also advantageous in reducing costs associated with laboratory supplies and plastic materials, in addition to minimizing the risk of contamination. The multiplex kit for the detection of SARS-CoV-2 variants showed efficacy in differentiating between variants, demonstrating that RT-qPCR can be an essential tool in monitoring the virus's evolution.

With the successful implementation of this reagent and the multiplex kit, it is expected that the diagnostic process for many diseases will be expedited and that the emergence of new variants will be better tracked. This technological advancement represents a milestone in the fight against the pandemic, offering a viable and efficient solution for the rapid and reliable detection of the virus. Furthermore, its application may significantly contribute to controlling the spread of the disease and strengthening global public health.

Keywords: SARS-CoV-2; nucleic acid extraction; RT-qPCR; multiplex.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Etapas da PCR.....	24
Figura 2	Curva de amplificação ideal de uma PCR em tempo real.....	26
Figura 3	Etapas da RT-qPCR.....	26
Figura 4	Esquema representativo de RT-qPCR em uma etapa <i>versus</i> RT-qPCR de duas etapas.....	27
Figura 5	Esquema representativo da extração de RNA por compostos fenólicos.....	30
Figura 6	Esquema representativo da extração de ácidos nucleicos com coluna de sílica.....	32
Figura 7	Esquema representativo da extração de ácidos nucleicos com beads magnéticas.....	33
Figura 8	Elementos estruturais e genoma do SARS-CoV-2.....	42
Figura 9	Principais mutações no gene spike entre as variantes Alfa, Beta, Gama e Delta do SARS-CoV-2.....	45
Figura 10	Principais mutações no gene spike entre as subvariantes Ômicron do vírus SARS-CoV-2.....	48
Figura 11	Caminho evolutivo do SARS-CoV-2.....	49
Figura 12	Esquema representativo da extração rápida de ácidos nucleicos.....	55
Figura 13	Fluxograma de desenvolvimento dos primers e sondas.....	63
Figura 14	Frequência de circulação das variantes de SARS-CoV-2 no país por período de amostragem.....	68
Figura 15	Produto de extração rápida de ácidos nucleicos desenvolvido...	72
Figura 16	Comparativo de extração entre reagente de extração rápida de ácidos nucleicos e métodos convencionais de extração.....	74
Figura 17	Curva para determinação de quantitativo de amostra no mix reacional, com análise do gene N, com kit Allplex (Seegene).....	75
Figura 18	Valores de CT obtidos para os genes N, E e RdRp em ensaio multiplex de RT-qPCR após extração com o reagente desenvolvido, QuickExtract e coluna.....	80

Figura 19	Valores de CT obtidos para os genes N1, N2 e RNaseP em ensaio singleplex de RT-qPCR após extração com o reagente desenvolvido, QuickExtract e coluna.....	83
Figura 20	Eletrograma de RNA oriundo de amostras de swab nasal extraídas com kit de coluna.....	84
Figura 21	Eletrograma de RNA oriundo de amostras de swab nasal extraídas com reagente desenvolvido.....	85
Figura 22	Amostra de sangue total após extração de ácidos nucleicos, utilizando o reagente desenvolvido na proporção de 1:1,5.....	86
Figura 23	Curva de detecção de RNaseP, com diferentes concentrações de amostra (5 a 20%) no mix reacional, após extração utilizando o reagente desenvolvido na proporção de 1:1,5.....	87
Figura 24	Curva de amplificação de amostra de plasma, com detecção do gene DYS14 (sexo masculino).....	92
Figura 25	Curva de amplificação de amostras de sementes e folhas de soja, após extração com reagente desenvolvido.....	94
Figura 26	Imagem do gel de eletroforese após a PCR, utilizando primers para o gene MecA, após extração em bactérias <i>S. aureus</i> com o reagente de extração rápida desenvolvido.....	96
Figura 27	Valores de CT dos genes N, E e RdRp de uma amostra de SARS-CoV-2 com provável carga viral baixa, após extração com reagente desenvolvido em diferentes condições de armazenamento.....	99
Figura 28	Valores de CT dos genes N, E e RdRp de uma amostra de SARS-CoV-2, com provável carga viral alta, após extração com reagente desenvolvido em diferentes condições de armazenamento.....	100
Figura 29	Detecção do Gene N, de uma amostra de SARS-CoV-2 após extração com reagente desenvolvido armazenado em temperatura ambiente.....	101
Figura 30	Avaliação da quantidade de amostra nas reações de PCR com os primers desenvolvidos.....	109

Figura 31	Curvas de amplificação e curvas de <i>melting</i> de diferentes concentrações de primers desenvolvidos.....	112
Figura 32	Curvas de amplificação e curvas de <i>melting</i> de diferentes concentrações dos primers dos alvos Delta e Ômicron desenvolvidos.....	114
Figura 33	Ensaio de especificidade dos primers e sonda desenvolvidos para a variante Delta.....	120
Figura 34	Ensaio de especificidade dos primers e sonda desenvolvidos para a variante Gama.....	121
Figura 35	Ensaio de especificidade dos primers e sonda desenvolvidos para a variante Ômicron.....	122
Figura 36	Curva padrão e curvas de amplificação obtidas com controle positivo 2019-ncov_n_positive control.....	128
Figura 37	Ensaio de limite de detecção do alvo Delta.....	128
Figura 38	Ensaio de limite de detecção do alvo RdRp.....	129
Figura 39	Ensaio de limite de detecção do alvo Ômicron.....	130
Figura 40	Ensaio de limite de detecção do alvo Gama.....	131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Formulação do reagente de extração rápida de ácidos nucleicos.....	54
Tabela 2	Parâmetros de validação de sangue total e hemoderivados....	58
Tabela 3	Resultados de RT-qPCR de reações realizadas com kit Allplex após extração com reagente desenvolvido, QuickExtract e coluna de sílica.....	76
Tabela 4	Resultados de RT-qPCR de reações realizadas com kit singleplex após extração com reagente desenvolvido, QuickExtract e coluna de sílica.....	82
Tabela 5	Resultados de RT-qPCR de reações realizadas com kit ZDC Biomol após extração com reagente desenvolvido, para detecção de arboviroses.....	89
Tabela 6	Resultados de qPCR para detecção do gene DYS14 (cromossomo Y) e sexagem fetal em amostra de plasma, extraídas com reagente de extração rápida desenvolvido.....	92
Tabela 7	Valores de CTs obtidos para amostras de SARS-CoV-2, extraídas com reagente desenvolvido ou com QuickExtract (QE) armazenado em diferentes condições.....	98
Tabela 8	Características dos primers e sondas desenvolvidos para elaboração do kit multiplex de RT-qPCR.....	104
Tabela 9	Análise <i>in silico</i> da formação de <i>hairpins</i> para as sequências de primers e sondas propostas.....	105
Tabela 10	Análise <i>in silico</i> da formação de autodímeros e heterodímeros entre as sequências de primers e sondas propostas.....	106
Tabela 11	Valores de CT obtidos na determinação da concentração ideal de amostra para reação com os primers desenvolvidos...	110
Tabela 12	Valores de CT obtidos no ensaio de otimização na concentração de primers.....	113
Tabela 13	Valores de CT obtidos na determinação da melhor proporção de concentração de primer:sonda para cada alvo.....	117
Tabela 14	Valores de CT obtidos no sistema duplex RdRp e Delta.....	124

Tabela 15	Valores de CT obtidos no sistema triplex RdRp, Delta e Ômicron.....	125
Tabela 16	Valores de CT obtidos no sistema quadriplex RdRp, Delta, Ômicron e Gama.....	126
Tabela 17	Valores de CT obtidos nos ensaios de determinação de limite de detecção dos primers e sondas desenvolvidos.....	134

LISTA DE ABREVIATURAS

ACE2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
cDNA	DNA complementar
COVID-19	Coronavirus Disease 2019
CT	<i>Threshold Cycle</i>
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
mRNA	RNA mensageiro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
qPCR	PCR em tempo real
RT-PCR	PCR de Transcriptase Reversa
RT-qPCR	PCR de Transcriptase Reversa em tempo real
SARS	Síndrome Respiratória Aguda Grave
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
VOC	Variantes de preocupação
VOI	Variantes de interesse
VUM	Variantes de sob monitoração

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	21
2.1.1	Descoberta da PCR.....	21
2.1.2	Componentes e etapas da PCR.....	22
2.1.3	Variações da técnica de PCR.....	25
2.1.4	Vantagens e desvantagens da PCR.....	27
2.2	EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	28
2.2.1	Extração de ácidos nucleicos.....	28
2.2.1.1	<i>Extração e purificação de ácidos nucleicos por compostos fenólicos.....</i>	<i>29</i>
2.2.1.2	<i>Extração e purificação de ácidos nucleicos em fase sólida.....</i>	<i>31</i>
2.2.1.3	<i>Extração rápida de ácidos nucleicos.....</i>	<i>33</i>
2.2.1.4	<i>Avaliação da integridade do RNA extraído.....</i>	<i>34</i>
2.3	MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR.....	34
2.4	COVID-19 (<i>Coronavirus Disease 2019</i>).....	37
2.4.1	SARS-COV-2.....	41
3	OBJETIVOS.....	50
3.1	OBJETIVO GERAL.....	50
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.1	INSTRUMENTOS.....	51
4.2	MATERIAL QUÍMICO E BIOLÓGICO UTILIZADO.....	52
4.3	COMITÊ DE ÉTICA.....	53
4.4	DESENVOLVIMENTO DE REAGENTE DE EXTRAÇÃO RÁPIDA DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	54
4.4.1	Formulação do reagente de extração rápida de ácidos nucleicos...	54
4.4.2	Desenvolvimento e validação de protocolo de extração para amostras de SARS-CoV-2.....	54
4.4.2.1	<i>Avaliação da integridade do RNA extraído.....</i>	<i>56</i>
4.4.3	Desenvolvimento e validação de protocolo de extração para sangue e hemoderivados.....	56

4.4.4	Desenvolvimento de protocolo de extração para amostras vegetais.....	60
4.4.5	Desenvolvimento de protocolo de extração para bactérias.....	61
4.4.6	Estudo de estabilidade.....	62
4.5	DESENVOLVIMENTO DE KIT DE DETECÇÃO MULTIPLEX DE VARIANTES DE SARS-CoV-2 POR RT-Q-PCR.....	62
4.5.1	Desenvolvimento de primers e sondas.....	63
4.5.2	Otimização do sistema PCR.....	65
<i>4.5.2.1</i>	<i>Determinação da quantidade de amostra em ensaio de PCR.....</i>	<i>65</i>
<i>4.5.2.2</i>	<i>Otimização da concentração de primers na PCR.....</i>	<i>66</i>
<i>4.5.2.3</i>	<i>Otimização da relação primer – sonda.....</i>	<i>66</i>
<i>4.5.2.4</i>	<i>Determinação da especificidade dos primers e sondas desenvolvidos.....</i>	<i>67</i>
4.5.3	Multiplexação do sistema PCR.....	69
<i>4.5.3.1</i>	<i>Determinação do limite de detecção.....</i>	<i>70</i>
4.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	71
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
5.1	DESENVOLVIMENTO DE REAGENTE DE EXTRAÇÃO RÁPIDA DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	72
5.1.1	Formulação do reagente de extração rápida de ácidos nucleicos...	72
5.1.2	Desenvolvimento e validação de protocolo para extração com reagente de extração rápida.....	72
<i>5.1.2.1</i>	<i>Desenvolvimento e validação de protocolo para amostras de SARS-CoV-2.....</i>	<i>73</i>
<i>5.1.2.2</i>	<i>Análise da integridade do RNA extraído utilizando o reagente desenvolvido.....</i>	<i>84</i>
<i>5.1.2.3</i>	<i>Desenvolvimento de protocolo de extração para amostras de sangue total.....</i>	<i>86</i>
<i>5.1.2.4</i>	<i>Desenvolvimento e validação de protocolo de extração para amostras de soro.....</i>	<i>88</i>
<i>5.1.2.5</i>	<i>Desenvolvimento e validação de protocolo de extração para amostras de plasma.....</i>	<i>90</i>
<i>5.1.2.6</i>	<i>Desenvolvimento de protocolo de extração para amostras vegetais.....</i>	<i>93</i>

5.1.2.7	<i>Desenvolvimento de protocolo de extração para bactérias gram-positivas.....</i>	95
5.1.3	Estudo de estabilidade.....	96
5.1.4	Transferência de Tecnologia.....	102
5.2	DESENVOLVIMENTO DE KIT DE DETECÇÃO MULTIPLEX DE VARIANTES DE SARS-CoV-2 POR RT-Q-PCR.....	102
5.2.1	Desenvolvimento de primers e sondas.....	102
5.2.2	Otimização do sistema PCR.....	108
5.2.2.1	<i>Determinação da quantidade de amostra em ensaio de PCR.....</i>	108
5.2.2.2	<i>Otimização da concentração de primers na PCR.....</i>	111
5.2.2.3	<i>Otimização da relação primer – sonda.....</i>	115
5.2.2.4	<i>Determinação da especificidade dos primers e sondas desenvolvidos.....</i>	119
5.2.3	Multiplexação do sistema PCR.....	122
5.2.3.1	<i>Determinação do limite de detecção.....</i>	127
6	CONCLUSÃO.....	136
	REFERÊNCIAS.....	138
	ANEXO A - Artigo publicado no periódico Diagnostics, com resultados obtidos para a validação de extração com reagente desenvolvido para amostras de SARS-CoV-2.....	156
	ANEXO B – Artigo publicado no periódico Viruses, com resultados obtidos para a avaliação do reagente desenvolvido para amostras de diferentes variantes de SARS-CoV-2.....	157
	ANEXO C - Publicação do D.O.U, nº 184, de 01 de outubro de 2021, com extrato de contrato de transferência de tecnologia do reagente desenvolvido.....	158

1 INTRODUÇÃO

No cenário em constante evolução da pesquisa científica e da medicina, o diagnóstico preciso de doenças infecciosas desempenha um papel fundamental na proteção da saúde pública global. Nesse contexto, a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) emergiu como uma ferramenta pioneira, permitindo a detecção sensível e específica de material genético e, conseqüentemente, a identificação de agentes patogênicos. Embora seja uma técnica altamente sensível, a técnica de PCR exige equipamentos complexos e de alto custo, mão de obra especializada, reagentes caros, e específicos.

A eficácia da PCR depende não apenas de suas nuances, mas também da qualidade do material genético isolado para análise, e por isso, possui significativa relevância das técnicas de extração de ácidos nucleicos que precedem a amplificação por PCR. Desde as tradicionais colunas de sílica até os modernos métodos de extração rápida, cada abordagem oferece um equilíbrio delicado entre eficiência, pureza e custo. As técnicas tradicionais (como colunas de sílica e solventes fenólicos), quando realizadas em escala manual, podem ser fonte de contaminação, gerar grande quantidade de resíduo químico e material plástico, além de exigirem quantidade de tempo de operação considerável e elevado custo. Já os reagentes de extração rápida permitem obtenção de material não purificado, ideal para análises qualitativas, com custo reduzido, menor chance de contaminação entre amostras e menor geração de resíduos químicos e plásticos. Essas técnicas desempenham um papel essencial na preparação de amostras para análise subsequente, demonstrando a complexidade inerente ao campo da biologia molecular.

A pandemia de COVID-19, decretada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2020, desencadeou uma transformação sem precedentes na sociedade global, desafiando os sistemas de saúde, a economia e os padrões de vida. O vírus causador, o SARS-CoV-2, se espalhou rapidamente por todo o mundo, levando a uma crise de saúde pública de proporções históricas. A propagação acelerada do vírus foi impulsionada pela crescente interconexão global, evidenciando como um surto local pode se transformar em uma crise global em questão de semanas. Além disso, a rápida evolução do vírus e o surgimento de variantes mais transmissíveis e possivelmente mais letais adicionaram uma camada adicional de complexidade à gestão da pandemia.

Assim, a pesquisa científica emergiu como uma ferramenta vital para entender, combater e controlar a doença, desencadeando uma demanda urgente por métodos de diagnóstico eficientes e ágeis e por ferramentas mais simples para extração de ácidos nucleicos. Associado a isso, o surgimento de novas variantes revelou a necessidade de monitorização epidemiológica para acompanhamento da evolução viral. Contudo, os ensaios de monitorização envolvem o sequenciamento genético, uma técnica complexa e de elevado custo.

Diante da situação da pandemia, esse trabalho se volta para o desenvolvimento de reagentes de extração rápida de ácidos nucleicos e kit de diagnóstico de variantes de SARS-CoV-2 por PCR em tempo real (RT-qPCR). O objetivo principal é criar ferramentas que simplifiquem e otimizem as etapas desde a extração do material genético até a amplificação e detecção de algumas variantes do vírus.

O desenvolvimento de um reagente de extração rápida de ácidos nucleicos proposto neste trabalho, visa superar as barreiras da etapa preparatória de amostras, permitindo uma análise mais rápida e eficiente. A validação abrangente desse reagente em diversas matrizes biológicas foi crucial para garantir a universalidade e robustez do método. Além disso, a pesquisa incluiu um ensaio de estabilidade do reagente, explorando suas propriedades ao longo do tempo e em diferentes condições de armazenamento.

Em relação a abordagem da COVID-19 em um nível molecular, o trabalho envolve não apenas na detecção do vírus em si, mas também na compreensão de algumas de suas variações genéticas e de suas ramificações clínicas. O desenho de iniciadores (primers) e sondas específicos para a detecção de variantes do SARS-CoV-2 por RT-qPCR representa uma resposta proativa à evolução constante do vírus, garantindo que as técnicas de diagnóstico permaneçam precisas. O desenvolvimento de um kit multiplex de RT-qPCR para detecção de variantes de SARS-CoV-2, proposto nesse trabalho, tem o potencial de fornecer dados sobre a prevalência e a disseminação das variantes do vírus, possibilitando a gestão de estratégias de saúde pública e intervenção.

O desenvolvimento de métodos de diagnóstico precisos e eficazes, como os baseados em técnicas de PCR abordados neste trabalho, desempenhou um papel crucial na resposta global à pandemia, permitindo a detecção precoce, o rastreamento de casos e a implementação de estratégias de mitigação. A pandemia de COVID-19 trouxe à tona não apenas os desafios de saúde imediatos, mas também a importância

da colaboração internacional, da pesquisa científica ágil e do avanço tecnológico para enfrentar as ameaças emergentes à saúde global.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) é uma técnica revolucionária na biologia molecular que permite amplificar regiões específicas do DNA. A técnica foi descoberta na década de 1980 e gerou um impacto significativo nas áreas de pesquisa científica, diagnóstico médico e forense (Bartlett; Stirling, 2003).

2.1.1 Descoberta da PCR

A descoberta da PCR é atribuída historicamente a Kary Banks Mullis, um cientista que trabalhava em uma empresa de biotecnologia chamada Cetus Corporation, localizada na Califórnia. Em 1983, o cientista idealizou uma técnica para replicar o DNA a partir de ciclos de temperatura, porém esta só foi conhecida pelo público em 1985 quando foi utilizada para fazer cópias de DNA de uma amostra escassa na área forense (Bartlett; Stirling, 2003).

Após a concepção inicial, Mullis e sua equipe trabalharam para transformar a ideia em uma técnica viável. A primeira versão da PCR exigia a adição manual de enzimas a cada ciclo de amplificação, o que tornava o processo demorado e propenso a erros, em especial pela adição repetida da polimerase que degradava a cada ciclo (Mullis *et al.*, 1986).

Posteriormente, outros cientistas auxiliaram o desenvolvimento da técnica, como o canadense Michael Smith, que aplicou a automatização à reação utilizando uma máquina que poderia realizar ciclos de temperatura controlados e adicionar automaticamente os componentes necessários (Rabinow, 1996). Em 1993, essa descoberta rendeu o Prêmio Nobel de Química a Mullis e a Smith (Khorana *et al.*, 1976; Rabinow, 1996).

Com o aprimoramento da reação de PCR, o seu uso foi expandido, se tornando uma técnica essencial em diversas áreas. Na área da saúde, por exemplo, é utilizada para o diagnóstico de doenças genéticas, infecções virais, bacterianas e fúngicas (Bustin; Mueller, 2005). A PCR também é fundamental na pesquisa em biologia molecular, genética e evolução, permitindo a análise de sequências de DNA, a

identificação de genes responsáveis por características específicas e a compreensão de padrões de expressão gênica (Erlich, 1989). Além disso, a PCR desempenha um papel crucial em aplicações forenses, como a identificação de suspeitos com base em evidências de DNA.

2.1.2 Componentes e etapas da PCR

A PCR baseia-se no processo natural de replicação do DNA que ocorre nas células vivas, em que o DNA é duplicado através da atuação da enzima DNA polimerase. A técnica de PCR tradicional desenvolvida utiliza um DNA alvo, uma enzima termoestável chamada Taq polimerase, iniciadores específicos de DNA (primers) e nucleotídeos (dNTPs - desoxinucleotídeos trifosfatos) para amplificar seletivamente um segmento desejado do DNA (Rahman *et al.*, 2013). Além dos componentes listados acima, a reação também necessita de um ambiente controlado por um tampão para fornecer as condições ideais de pH e concentração de íons, além de cofatores, como o magnésio, que são necessários para a atividade da Taq polimerase (Rahman *et al.*, 2013).

No processo de PCR, a enzima DNA polimerase permite a replicação do DNA por polimerizar os nucleotídeos. Atualmente, o mais comum é a utilização de DNA polimerase purificada ou clonada de uma bactéria extremófila, *Thermus aquaticus*, que vive em fontes termais e resiste a temperaturas elevadas, a qual é chamada de Taq polimerase (Kadri, 2020). A Taq Polimerase foi descoberta em 1969, quando Thomas D. Brock a isolou pela primeira vez (Brock; Freeze, 1969). A grande vantagem de usar essa polimerase é que ela é capaz de suportar temperaturas que costumam ser suficientes para desnaturar a maioria das proteínas, permitindo ciclos repetidos de reação, sem necessidade de reposição enzimática, encurtando o processo de PCR (Singh *et al.*, 2014). A bactéria *Thermus aquaticus* encontra sua temperatura de conforto em 72°C, temperatura ótima para a atividade de sua polimerase (Lawyer *et al.*, 1989).

Durante a síntese de novas fitas de DNA, catalisada pela enzima DNA polimerase, ocorre uma reação de polimerização envolvendo a formação de ligações fosfodiéster. Essa ligação ocorre entre o grupo hidroxila (–OH) do carbono 3' da desoxirribose da cadeia em crescimento e o grupo fosfato do nucleotídeo trifosfatado complementar ao molde. A energia necessária para essa reação é fornecida pela

quebra das ligações entre os três fosfatos do dNTP, com liberação de um pirofosfato inorgânico, e não de água, como ocorre em reações de condensação clássicas (Rahman *et al.*, 2013).

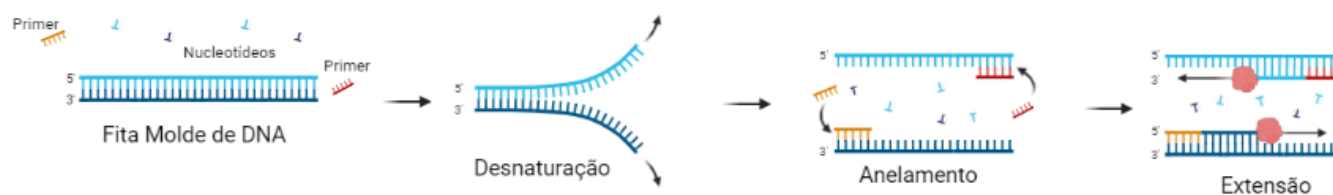
Esse processo é altamente específico, pois a adição de cada novo nucleotídeo depende do pareamento complementar com a fita molde (A com T, G com C). A correta orientação e pareamento das bases garantem que a polimerase alinhe adequadamente o novo dNTP ao grupo 3'-OH da cadeia em crescimento. A ligação fosfodiéster resultante promove o avanço da síntese da fita de DNA, com extensão contínua na direção 5' para 3', obedecendo às exigências estruturais da enzima. Por isso, costuma-se dizer que a cadeia de DNA é sintetizada no sentido 5' → 3' (Bartlett; Stirling, 2020). Geralmente 1 a 1,5 U de Taq polimerase é necessária em 50µL de mistura de reação, podendo variar dependendo da quantidade de inibidores presentes na mistura reacional (Singh *et al.*, 2014).

Os primers são responsáveis por definir qual fragmento do DNA deve ser amplificado. Em geral, são sequências curtas de 18 a 25 pares de bases, que se complementam no início e fim do fragmento de DNA a ser amplificado (Chuang; Cheng; Yang, 2013). São chamados de *forward* e *reverse*, que se ligam ao DNA molde na sequência 5'-3' e 3'-5', respectivamente. Após se ligarem ao molde de DNA nos pontos iniciais e finais, a polimerase se liga e começa a síntese de novo DNA, adicionando nucleotídeos disponíveis no meio reacional (Rahman *et al.*, 2013). Os primers garantem a especificidade da reação e, por isso, não devem se autocomplementar ou complementar a qualquer outro primer na mistura de reação, de modo a evitar a formação de dímeros (Vallone; Butler, 2004).

Em geral, os demais itens da mistura reacional devem ser ajustados de forma a fornecer as melhores condições de atividade para a polimerase. Contudo, a maioria dos kits comerciais fornecem uma mistura reacional de tampão Tris-HCl 100 mM, pH 9,0; MgCl₂ a 15 mM, KCl a 500 mM (NCBI, 2023). O tampão Tris-HCl é responsável pela manutenção do pH ótimo de atividade da polimerase e o Mg²⁺ é responsável por quelar cargas negativas do dNTP, facilitando o ataque nucleofílico da polimerase e a formação de ligações fosfodiéster. Além disso, os íons metálicos Mg²⁺ atuam como cofator para a DNA polimerase em PCR (Singh *et al.*, 2014).

Fornecidas todas as condições, o ciclo de PCR é composto por três etapas principais: desnaturação, anelamento e extensão (**Figura 1**).

Figura 1 - Etapas da PCR.



Fonte: elaborado pela autora (2023) – BioRender.

Na etapa de desnaturação, a mistura reacional é aquecida a 94 °C – 96 °C para separar as duas fitas de DNA uma da outra. As cadeias duplas se transformam em cadeias simples devido ao rompimento das ligações de hidrogênio em altas temperaturas. Com a finalidade de estabelecer maior separação das cadeias, é recomendado a manutenção da temperatura por 1 a 9 minutos, podendo variar de acordo com a proporção dos componentes reacionais (Higuchi *et al.*, 1992).

A desnaturação inicial é seguida por ciclos repetidos (30 a 45) de desnaturação, anelamento e extensão. A segunda desnaturação, assim como na primeira, envolve o aquecimento à 95 °C da molécula de DNA alvo de fita dupla por 30-55 segundos (Singh *et al.*, 2014).

Em seguida, ocorre o anelamento dos primers às sequências específicas do DNA alvo, permitindo que a Taq polimerase inicie a replicação. Para que esta etapa ocorra, a mistura reacional é resfriada a 40 °C – 70 °C (dependendo da temperatura de hibridização do primer), por 10 a 60 segundos, favorecendo a formação de ligações de hidrogênio entre as sequências (Higuchi *et al.*, 1992; Kadri, 2020).

Por fim, ocorre a extensão, na qual a Taq polimerase sintetiza novas fitas de DNA complementares a partir dos primers, gerando assim múltiplas cópias do segmento de interesse. A faixa de temperatura ideal para esta etapa é 72 °C a 80 °C, quando ocorre a ativação da polimerase e construção de uma nova fita. Assim, a polimerase adiciona bases nitrogenadas na direção 5' → 3'. No próximo ciclo, os fragmentos sintetizados no ciclo anterior são, por sua vez, matrizes para novas fitas, de forma que a cada ciclo dobr-se a quantidade de DNA presente no ciclo anterior (Kadri, 2020; Pelt-Verkuil; Belkum; Jonh, 2008).

2.1.3 Variações da técnica de PCR

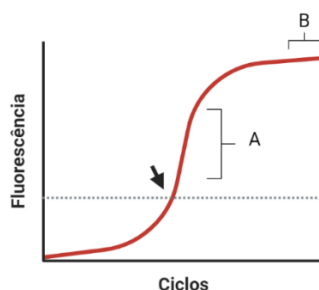
Além da PCR convencional, outras variações da PCR foram desenvolvidas, ampliando as aplicações da técnica. Entre as variações mais importantes, pode-se citar a PCR em tempo real (qPCR) e a PCR de transcriptase reversa (RT-PCR).

A PCR em tempo real é a principal evolução da técnica de PCR e que ampliou as aplicações da PCR para pesquisadores em todo o mundo. A PCR em tempo real permitiu a detecção e quantificação do DNA durante o processo de amplificação, proporcionando uma análise mais precisa (Valasek; Repa, 2005). Enquanto na PCR convencional, após a conclusão de todos os ciclos de amplificação, os produtos de amplificação são analisados separadamente em géis de agarose ou por métodos de detecção, como coloração com brometo de etídio, para determinar a presença, ausência ou quantificar o DNA amplificado, na PCR em tempo real, a técnica é acoplada ao acompanhamento “em tempo real” dos produtos de PCR à medida que são gerados (Rebrikov; Trofimov, 2006). Assim, é possível monitorar a amplificação do DNA durante cada ciclo de temperatura em tempo real, enquanto ela ocorre. Além dos componentes reacionais convencionais, são necessários fluoróforos que emitem fluorescência quando se ligam ao DNA amplificado. Durante a amplificação, um detector de fluorescência registra a intensidade de fluorescência emitida a cada ciclo de temperatura, permitindo a quantificação em tempo real do DNA amplificado (Valasek; Repa, 2005).

A curva de amplificação ideal de uma PCR em tempo real (**Figura 2**), quando plotada como intensidade de fluorescência em relação ao número do ciclo, é uma curva de crescimento sigmoidal (Heid *et al.*, 1996). A amplificação inicial não é visualizada porque o sinal de detecção é indistinguível do resíduo. No entanto, quando há material amplificado suficiente, o progresso exponencial pode ser monitorado à medida que a taxa de amplificação entra em uma fase log-linear. A cada ciclo reacional, a quantidade de produto é dobrada (Rahman *et al.*, 2013). À medida que os primers e a enzima se tornam limitantes e os produtos inibidores da PCR se acumulam, a reação diminui, entrando em uma fase de transição, eventualmente atingindo a fase de platô, no qual há a exaustão de reagentes e enzimas (Heid *et al.*, 1996; Mackay; Arden; Nitsche, 2002). O ponto em que a fluorescência passa de níveis insignificantes para níveis claramente detectáveis é chamado de *Threshold*. A partir do *Threshold* é possível definir o ponto de ciclagem em que os níveis são detectados,

sendo chamado de ciclo limiar (CT - *threshold cycle*). O valor do CT é então usado no cálculo de quantificação de material genético durante a PCR quantitativa em tempo real.

Figura 2 - Curva de amplificação ideal de uma PCR em tempo real.

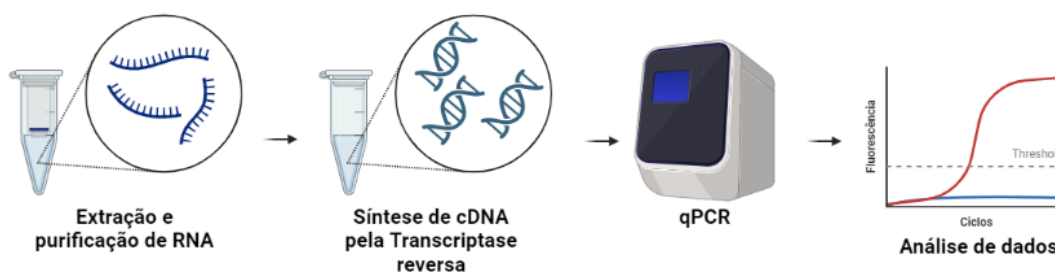


Onde, A: representa a fase log-linear; B: representa o platô; Seta: CT - *threshold cycle*.

Fonte: Elaborado pela autora (2023) – BioRender.

Já a RT-qPCR significa reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa e é utilizada quando o material de partida é o RNA. Neste caso, a enzima transcriptase reversa tem papel chave para transcrever o RNA em DNA. Dessa forma, o RNA é primeiro transcrito em DNA complementar (cDNA) pela transcriptase reversa, partindo do RNA total ou do RNA mensageiro (mRNA) (**Figura 3**). O cDNA obtido é então usado como modelo para a PCR (Kadri, 2020).

Figura 3 - Etapas da RT-qPCR.

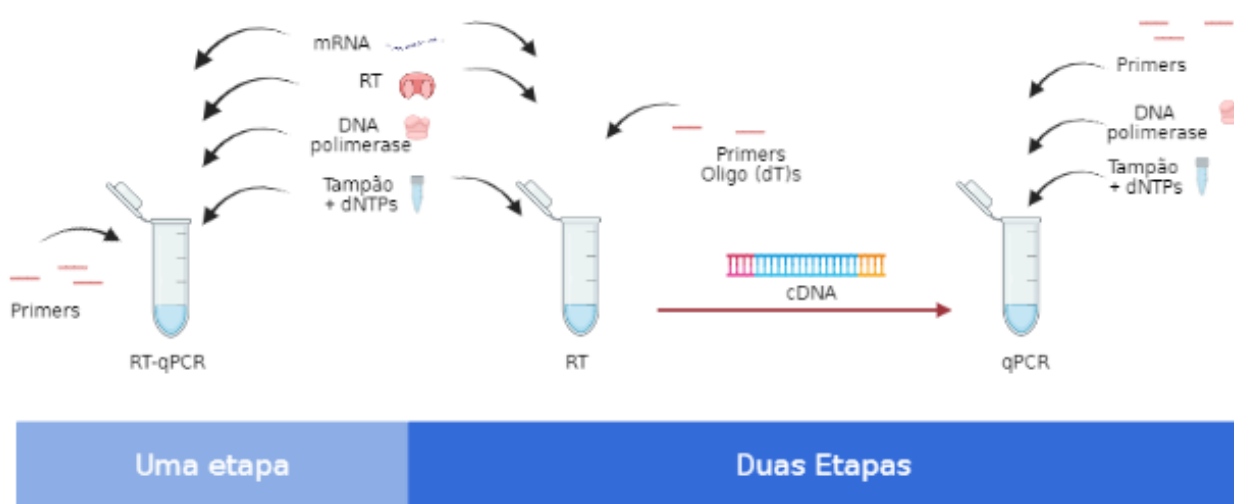


Fonte: Elaborado pela autora (2023) – BioRender.

Posteriormente, o acomplamento da reação de transcrição reversa com a técnica de PCR em tempo real (RT-qPCR), como mostrado na **Figura 3**, permitiu nova ampliação nas áreas de aplicação da PCR, pois possibilitou, por exemplo, a detecção

de expressão gênica e o diagnóstico de infecções por vírus de RNA. A RT-qPCR pode ser realizada em um ensaio de uma ou duas etapas (**Figura 4**). Os ensaios de uma etapa combinam transcrição reversa e PCR em um único tubo e tampão, usando uma transcriptase reversa junto com uma polimerase de DNA. A RT-qPCR de uma etapa utiliza primers específicos de sequência tanto para a transcrição reversa do RNA em DNA complementar (cDNA) quanto para a amplificação subsequente por PCR. Nos ensaios de duas etapas, as etapas de transcrição reversa e PCR são realizadas em tubos separados, com diferentes tampões otimizados e condições de reação (Bustin, 2004).

Figura 4 - Esquema representativo de RT-qPCR em uma etapa *versus* RT-qPCR de duas etapas.



Fonte: Elaborado pela autora (2023) – BioRender.

2.1.4 Vantagens e desvantagens da PCR

A grande vantagem dos ensaios de PCR é que a técnica apresenta uma sensibilidade muito maior do que outras técnicas, possibilitando a detecção segura de diferenças de expressões gênicas, mesmo que mínimas (Wong; Medrano, 2005). Além disso, é um método rápido para amplificar sequências de DNA, fornecendo resultados em questão de horas, sendo bastante versátil, uma vez que pode ser aplicada a uma ampla gama de amostras biológicas, incluindo DNA genômico, RNA mensageiro (mRNA) e DNA complementar (cDNA), provenientes de diferentes fontes.

A principal desvantagem da PCR em tempo real é que ela requer equipamentos, reagentes caros, além de mão de obra especializada. Devido à sua sensibilidade extremamente alta, o risco de contaminação cruzada pode acarretar resultados falsos positivos, sendo necessária grande cautela em todos os passos que antecedem (coleta e extração de ácido nucleico) até os passos posteriores à PCR (análise de dados) (Silva *et al.*, 2022). Nesse sentido, a extração de ácidos nucleicos é um passo importante para a obtenção de DNA ou RNA com qualidade suficiente para garantir a segurança do ensaio de PCR.

2.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

2.2.1 Extração de ácidos nucleicos

Na técnica de PCR, a extração de ácidos nucleicos é uma etapa crucial para obter o material genético alvo a ser amplificado e fornecer dados para análise. Essa etapa é necessária para expor o DNA ou RNA de uma amostra biológica, como células, tecidos ou fluidos corporais. Consequentemente, a obtenção de quantidade suficiente de material genético permite sua amplificação por PCR (Ali *et al.*, 2017).

Contudo, é importante destacar que a extração de ácidos nucleicos é uma etapa crítica e sensível, pois a qualidade e a quantidade do material genético extraído podem afetar diretamente os resultados da amplificação por PCR (Tan; Yiap, 2009). Portanto, é fundamental seguir boas práticas de laboratório e utilizar métodos confiáveis e validados para garantir uma extração eficiente e de alta qualidade. No passado, o processo de extração e purificação de ácidos nucleicos costumava ser complicado, demorado, trabalhoso e limitado em termos de rendimento geral (Tan; Yiap, 2009). Embora atualmente existam inúmeros equipamentos para automação da extração de ácidos nucleicos, centros de pesquisa e laboratórios de pequeno e médio porte ainda utilizam técnicas manuais de extração (Silva *et al.*, 2022).

Para essas situações, existem várias técnicas de extração de ácidos nucleicos disponíveis e a escolha do método depende do tipo de amostra e do objetivo do estudo. As opções de técnicas de extração incluem kits de extração com solventes fenólicos a kits com colunas de sílica e tampões contendo PEG, que promovem a purificação dos ácidos nucleicos através de etapas de lavagem. Entre os métodos manuais mais utilizados, merecem destaque a extração convencional por compostos

fenólicos, a extração por colunas de sílica e a extração por beads magnéticos (Ali *et al.*, 2017).

Em geral, todas as técnicas convencionais envolvem quatro etapas, que podem ser moduladas dependendo da amostra: ruptura celular; remoção de lípidos de membrana, proteínas e constituintes celulares; purificação dos ácidos nucleicos; e concentração dos ácidos nucleicos (Goldberg, 2015).

2.2.1.1 Extração e purificação de ácidos nucleicos por compostos fenólicos

A extração de ácidos nucleicos utilizando componentes fenólicos foi, durante muito tempo, conhecida como método de referência para extração de RNA e DNA. Em fato, essa extração envolve a participação de três agentes químicos: tiocianato de guanidina, fenol e clorofórmio. Atualmente, existem reagentes disponíveis comercialmente constituídos pela mistura desses reagentes prontos para uso, como o caso do TRIzol (Thermo Fisher Scientific Brand) e Brazol (LGC Biotecnologia). Ambos os reagentes são usados para extrair RNA ou DNA, dependendo do protocolo utilizado (Simms; Chomczynski, 1993).

A extração de ácidos nucleicos com compostos fenólicos, segue os seguintes passos (**Figura 5**) (Nova Biotecnologia, 2022; Thermofischer, 2016):

- **Lise Celular:** A mistura de tiocianato de guanidina e fenol é adicionada à amostra contendo as células. A guanidina presente no reagente desativa as ribonucleases (enzimas que degradam o RNA e DNA) e rompe as membranas celulares, liberando o material genético.
- **Separação de Fases:** Após a lise, é adicionado um agente desproteinizante, como o clorofórmio. Isso resulta na formação de uma mistura tripartida com uma fase aquosa, uma fase orgânica (geralmente fenol/clorofórmio) contendo proteínas e lipídios, e uma interface, que contém uma pequena quantidade de material genético. O RNA permanece exclusivamente na fase aquosa, o DNA pode ser encontrado na interface entre a fase orgânica e a fase aquosa e as proteínas exclusivamente na fase orgânica.
- **Precipitação do RNA/DNA:** A fase aquosa e a interface são separadas cuidadosamente das outras fases por centrifugação. Em seguida, é adicionado álcool (geralmente isopropanol, para RNA, ou etanol para DNA)

para precipitar o RNA/DNA. Essa etapa permite a separação do material genético das proteínas e outros contaminantes.

- **Lavagem e Purificação:** O precipitado é lavado com etanol para remover resíduos e contaminantes. Em seguida, o precipitado é ressuspenso em uma solução adequada, como água livre de ribonucleases ou tampão de eluição, para purificar o RNA/DNA e obter uma concentração final adequada para análises subsequentes.

Figura 5 - Esquema representativo da extração de RNA por compostos fenólicos.



Fonte: Elaborado pela autora (2023) – BioRender.

O método de extração de ácidos nucleicos por compostos fenólicos permite obter material com alta pureza e rendimento, porém é importante mencionar que tiocianato de guanidina, fenol e clorofórmio são produtos químicos perigosos e tóxicos (Chomczynski; Sacchi, 1987). Outro fator impactante do uso desse método de extração é a quantidade de material plástico (ponteiras e microtubos) utilizado, gerando grande quantidade de resíduos (Silva *et al.*, 2022). Além disso, o tempo e a temperatura de incubação, bem como as proporções entre os reagentes, podem variar dependendo do tipo de amostra e das especificações do protocolo utilizado. Ainda,

nem toda amostra forma *pellet* visível a olho nu, podendo ocasionar erros e perda do material durante a execução da técnica.

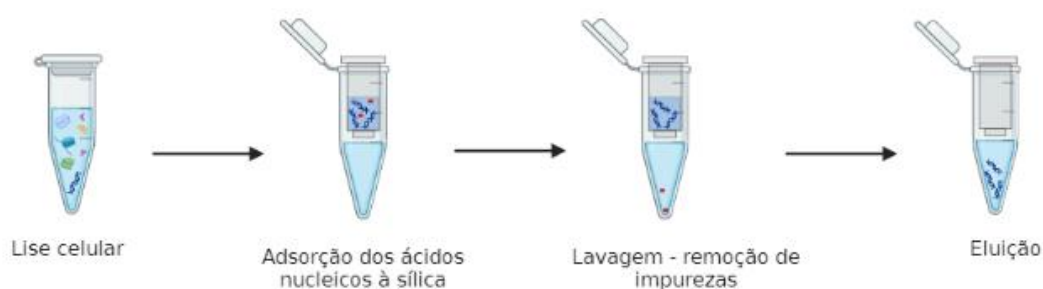
2.2.1.2 Extração e purificação de ácidos nucleicos em fase sólida

A extração de ácidos nucleicos em fase sólida utiliza colunas de sílica e é um método amplamente utilizado, disponível comercialmente, mais eficaz e rápido que o método de extração por solventes fenólicos (Tan; Yiap, 2009).

O fundamento dessa técnica é a capacidade da sílica de adsorver ácidos nucleicos em presença de altas concentrações de sais e etanol. Nesta técnica, os íons de sódio são responsáveis por atrair o oxigênio carregado negativamente presente no grupo fosfato do ácido nucléico, mantendo o ácido nucleico insolúvel devido ao fenômeno conhecido como “*salting out*” na presença de condições de alto teor de sal e pH ácido (Ali *et al.*, 2017). Quatro etapas principais envolvidas na extração em fase sólida são lise celular, adsorção de ácidos nucleicos, lavagem e eluição (**Figura 6**). Após a lise celular, a amostra contendo os ácidos nucleicos é aplicada na coluna de sílica e, em seguida, são adicionados agentes desnaturantes, como sais e etanol, que ajudam a promover a adsorção dos ácidos nucleicos na matriz. Em seguida, a coluna é lavada para remover impurezas e, finalmente, os ácidos nucleicos são eluídos da coluna em um volume reduzido, geralmente utilizando um tampão específico ou água livre de nuclease (Esser; Marx; Lisowsky, 2005). Normalmente, é necessária centrifugação rápida, filtração a vácuo ou separação de coluna durante as etapas de lavagem e eluição do processo de purificação.

A utilização de colunas de sílica para extração de ácidos nucleicos apresenta diversas vantagens, sendo a principal a obtenção de material altamente puros, livres de contaminantes e inibidores que podem interferir em aplicações subsequentes, como PCR e sequenciamento. Porém, embora disponíveis comercialmente em ampla escala, as colunas de sílica podem ser relativamente caras, especialmente quando são necessárias muitas extrações em larga escala. Além disso, o processo de extração por colunas de sílica pode ser demorado, pois envolve várias etapas de lavagem e eluição, o que pode limitar a escalabilidade em termos de processamento de muitas amostras. É importante notar que esta é uma técnica susceptível à contaminação (Ali *et al.*, 2017).

Figura 6 - Esquema representativo da extração de ácidos nucleicos com coluna de sílica.



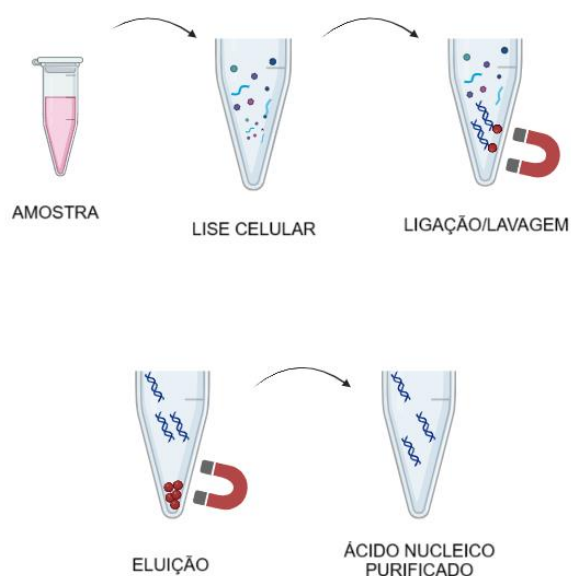
Fonte: Elaborado pela autora (2023) – BioRender.

Outra importante técnica de extração em fases sólidas é a separação magnética. Para o processo de purificação são utilizados carreadores magnéticos com ligantes de afinidade imobilizados ou preparados a partir de biopolímeros que apresentem afinidade com o ácido nucleico alvo (Berensmeier, 2006).

Entre as tecnologias mais utilizadas na extração magnética, a mais comum é a utilização de esferas magnéticas (*beads* magnéticos), acopladas a sistemas tampões adequados para um procedimento de extração rápido e eficiente. Para purificar, um ímã é aplicado no tubo contendo a amostra misturada com os grânulos magnéticos funcionalizados (ARCHER *et al.*, 2006). Em geral, a utilização de *beads* magnéticos envolve extratores automatizados. A obtenção de ácidos nucleicos purificados por essa técnica também envolve uma etapa inicial de lise celular, ligação do ácido nucleico às *beads* magnéticas, separação dos contaminantes por separação magnética, lavagem e eluição do ácido nucleico com água ou tampão de eluição (**Figura 7**) (Berensmeier, 2006.)

Entre as vantagens da técnica, pode-se citar facilidade de executar, alto rendimento, alta processabilidade de amostras e obtenção de material mais íntegro. A principal desvantagem é que os reagentes necessários para a extração por *beads* magnéticos podem ser mais caros do que outros métodos de extração e é uma técnica susceptível a contaminação (Ali *et al.*, 2017).

Figura 7 - Esquema representativo da extração de ácidos nucleicos com *beads* magnéticas.



Fonte: Elaborado pela autora (2025) – BioRender.

2.2.1.3 Extração rápida de ácidos nucleicos

Os reagentes de extração rápida de ácidos nucleicos oferecem uma abordagem rápida e eficiente para a extração de DNA ou RNA a partir de uma variedade de amostras biológicas. Os reagentes são compostos por uma mistura de enzimas e tampões otimizados para lise celular, inativação de enzimas endógenas e preservação do material genético (Silva *et al.*, 2022).

Geralmente, esses reagentes permitem a extração direta do DNA ou RNA através de lise térmica, o que simplifica o processo de extração e economiza tempo. O procedimento, em geral, envolve a adição de uma pequena quantidade da amostra biológica (por exemplo, células, tecidos ou fluidos biológicos) a um microtubo contendo o reagente. A mistura é aquecida a uma temperatura específica, geralmente entre 65°C e 98°C, por um curto período. Esse aquecimento promove a lise térmica das membranas e liberam o DNA/RNA da amostra, além de ativar as enzimas contidas no reagente para inativação de nucleases e proteção do material extraído. Após a lise, o tubo é resfriado e o extrato contendo o DNA ou RNA está pronto para uso em aplicações subsequentes, como PCR, eletroforese, entre outros (Ladha *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2022).

2.2.1.4 Avaliação da integridade do RNA extraído

A avaliação da integridade do RNA é uma etapa essencial nos experimentos de biologia molecular, especialmente naqueles que envolvem análise de expressão gênica, como RT-qPCR, microarrays e sequenciamento de RNA (RNA-Seq). O RNA é uma molécula altamente suscetível à degradação por ribonucleases (RNases), o que pode comprometer seriamente a fidelidade dos resultados. A integridade inadequada do RNA pode levar à perda de fragmentos específicos, prejudicando a detecção de transcritos e comprometendo a reprodutibilidade dos dados obtidos (Fleige; Pfaffl, 2006; Schroeder *et al.*, 2006).

Diversos estudos demonstram que a qualidade do RNA afeta diretamente a precisão das análises. Fleige e Pfaffl (2006) demonstraram que a degradação do RNA pode levar a erros significativos na quantificação por RT-qPCR, influenciando a interpretação da expressão gênica mesmo quando os controles internos são utilizados corretamente.

Assim é importante a avaliação prévia da integridade do RNA por meio de tecnologias baseadas em eletroforese capilar, como o Bioanalyzer (Agilent Technologies). Esse equipamento permite calcular o RNA Integrity Number (RIN), uma métrica padronizada que varia de 1 (RNA totalmente degradado) a 10 (RNA intacto), com base no perfil eletroforético das subunidades ribossomais. Segundo Schroeder e colaboradores (2006), o uso do RIN permite comparar diferentes amostras de forma objetiva e automatizada, promovendo maior confiabilidade nos resultados experimentais.

2.3 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR

Após a extração dos ácidos nucleicos, o material pode ser utilizado nos ensaios de PCR, utilizando diferentes kits de detecção disponíveis no mercado. Os equipamentos de detecção geralmente quantificam o material amplificado a partir da intensidade de fluorescência emitida por algum fluoróforo que se liga ao ácido nucléico. Algumas técnicas de ligação ao ácido nucleico e emissão de fluorescência merecem destaque, como os sistemas que utilizam o *SYBR Green* e os sistemas que utilizam sondas de hidrólise (singlex ou multiplex), tipo *TaqMan*.

Os sistemas de emissão de fluorescência por *SYBR Green* utilizam este como corante fluorescente que se liga inespecificamente ao DNA de fita dupla. Durante a qPCR, à medida que os produtos de amplificação de DNA são gerados, o *SYBR* se liga a eles emitindo fluorescência quando excitado por uma fonte de luz adequada. A detecção de PCR com *SYBR* é amplamente utilizada, pois é simples, versátil e não requer sondas ou primers marcados com fluoróforos específicos. Porém, o *SYBR* não diferencia entre o produto de amplificação específico e produtos inespecíficos, se presentes, ou seja, ele irá se ligar e emitir fluorescência para qualquer fita dupla presente na reação (Arya *et al.*, 2005; Morrison; Weis; Wittwer, 1998).

As sondas de hidrólise, como sondas do tipo *Taqman*, consistem em uma sequência oligonucleotídica marcada com um fluoróforo na extremidade 5' e um *quencher* (para estabilizar o fluoróforo) na extremidade 3'. O *quencher* tem o papel de inibir a fluorescência do fluoróforo, quando ambos estão próximos. A sonda é projetada de forma que sua sequência de hibridização seja complementar a uma região específica dentro do amplicon alvo, ou seja, entre os primers. Durante a fase de extensão da PCR, a sonda de hidrólise se liga especificamente ao amplicon alvo, mantendo o fluoróforo e o *quencher* próximos um do outro. A enzima DNA polimerase, durante a amplificação da PCR, inicia a síntese de uma nova fita de DNA complementar ao molde de DNA. Quando a enzima DNA polimerase alcança a sonda, ela reconhece a sequência complementar, que é clivada na posição correspondente ao local de hibridização. Isso libera o fluoróforo e separa o *quencher*, resultando em uma emissão de fluorescência detectável (Arya *et al.*, 2005; Bustin, 2000).

Diferentemente do sistema *SYBR Green*, uma das vantagens das sondas de hidrólise é que elas conferem alta especificidade ao método de detecção, pois a sonda deve se ligar exatamente à sequência complementar do amplicon alvo. No entanto, a utilização de sondas de hidrólise requer um design e otimização cuidadosos, incluindo a escolha das sequências de sondas e primers, bem como a seleção adequada de fluoróforos e *quenchers* compatíveis (Arya *et al.*, 2005; Bustin, 2000). Desta forma, quanto mais sequências amplificadas, mais sondas se ligam e são clivadas, produzindo maior intensidade de fluorescência.

Outros importantes sistemas, consistem nos sistemas de detecção por sondas de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) e sondas de Beacons de Hairpin. Os sistemas de detecção por sondas de FRET utilizam sondas que contêm dois fluoróforos próximos um do outro. Um fluoróforo é responsável pela excitação

(fluoróforo doador), enquanto o outro detecta a fluorescência emitida (fluoróforo aceitador). Durante a amplificação da PCR, a sonda hibridiza com o alvo específico e, quando ocorre a extensão da sonda pela enzima DNA polimerase, os fluoróforos ficam em proximidade suficiente para permitir a transferência de energia. Isso resulta em um sinal de fluorescência detectável apenas quando a sonda está ligada ao alvo específico (Jothikumar; Hill; Narayanan, 2009). Já os sistemas de detecção por sondas de Beacons de Hairpin utilizam sondas que se dobram em uma estrutura em forma de grampo de cabelo (*hairpin*) quando não estão ligadas ao alvo. A sonda contém um fluoróforo e um *quencher* próximos na forma de *hairpin*, o que suprime a fluorescência. No entanto, quando a sonda se liga ao alvo complementar, ocorre a abertura da estrutura *hairpin*, afastando o fluoróforo do *quencher*, resultando na emissão de fluorescência (Tyagi; Kramer, 1996).

As técnicas de emissão de fluorescência utilizando sondas permitem a identificação de um ou mais alvos por reação, em análises singleplex ou multiplex. Os sistemas singleplex são utilizados quando se deseja detectar e quantificar a amplificação de apenas um alvo específico em uma reação de RT-qPCR. Nesse sistema, cada alvo é amplificado e detectado individualmente em reações separadas. Já os sistemas de detecção multiplex permitem a detecção e quantificação simultânea de múltiplos alvos em uma única reação de RT-qPCR. Isso é alcançado utilizando sondas ou fluoróforos distintos, cada um específico para um alvo diferente, mas todos incluídos no mesmo tubo de reação. Para isso, são utilizados fluoróforos com emissões de fluorescência em diferentes comprimentos de onda, que são detectados em canais separados durante a PCR em tempo real. Cada alvo é detectado por uma sonda ou fluoróforo específico que se liga apenas a ele. Os sistemas de detecção multiplex são particularmente úteis quando é necessário analisar a expressão de múltiplos genes simultaneamente, economizando tempo, amostras e recursos financeiros (Markoulatos; Siafakas; Moncany, 2002).

A utilização de kits comerciais multiplex é muito ampla no diagnóstico rápido e preciso de inúmeras enfermidades. A técnica de PCR ganhou grande destaque recentemente, durante a pandemia de COVID-19, pois é considerada padrão ouro no diagnóstico da doença.

2.4 COVID-19 (*Coronavirus Disease 2019*)

A COVID-19, causada pelo vírus SARS-CoV-2, é uma doença que surgiu na cidade de Wuhan, na província de Hubei, na China, em dezembro de 2019 (Wu *et al.*, 2020). Os primeiros casos relatados estavam relacionados a um mercado de frutos do mar e animais vivos na cidade, sugerindo uma possível origem animal para o vírus. O vírus foi identificado como um novo coronavírus, posteriormente denominado SARS-CoV-2, devido à sua semelhança com o vírus SARS (causador da Síndrome Respiratória Aguda Grave), que surgiu na China em 2002 (Bassetti; Vena; Giacobbe, 2020; Wu *et al.*, 2020).

O SARS-CoV-2 provavelmente surgiu a partir de um processo de evolução natural e recombinação genética entre coronavírus presentes em animais hospedeiros, especialmente morcegos e, possivelmente, pangolins. Os Sarbecovírus, subgrupo ao qual o SARS-CoV-2 pertence, são amplamente encontrados em morcegos, sugerindo que esses animais podem ter sido o reservatório original do vírus. Acredita-se que a transmissão para humanos tenha ocorrido por meio de um hospedeiro intermediário em mercados de animais vivos, onde diferentes espécies entram em contato próximo, favorecendo a troca de material genético entre vírus e possibilitando a adaptação para infecção em humanos. Esse fenômeno já foi observado em surtos anteriores de coronavírus, como no caso da SARS e MERS, reforçando a importância da vigilância epidemiológica para prevenir novas pandemias (Bassetti; Vena; Giacobbe, 2020; Singh; Yi, 2021). No entanto, assim que o vírus começou a se espalhar entre as pessoas, a transmissão passou a ocorrer principalmente de pessoa para pessoa por meio de gotículas respiratórias expelidas quando uma pessoa infectada tosse, espirra, fala ou respira (Bassetti; Vena; Giacobbe, 2020).

O surto inicial em Wuhan foi seguido por uma rápida disseminação da doença para outras partes da China e, posteriormente, para outros países ao redor do mundo. A natureza altamente contagiosa do vírus, combinada com as viagens internacionais, contribuiu para a propagação global da COVID-19.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a COVID-19 como uma pandemia em 11 de março de 2020. A decisão de classificar a doença como uma pandemia foi baseada em vários fatores, em especial a rápida expansão da COVID-19 em diferentes países e continentes, afetando muitas pessoas e resultando em um

número crescente de casos graves e mortes. A propagação do SARS-CoV-2 e seus efeitos devastadores em escala global o colocaram entre as pandemias mais marcantes da história (Ganesh *et al.*, 2021).

Ao declarar a pandemia, a OMS buscou enfatizar a gravidade da situação e a importância de ações abrangentes e colaborativas para enfrentar a doença. A medida também serviu como um alerta para governos, organizações de saúde e a população em geral, para que tomassem medidas preventivas e adotassem estratégias de contenção para minimizar os efeitos da pandemia.

O primeiro caso confirmado de COVID-19 no Brasil foi registrado em 26 de fevereiro de 2020. Um homem de 61 anos, residente em São Paulo, retornou de uma viagem à Itália e apresentou sintomas da doença. Após o primeiro caso, houve um aumento rápido no número de casos confirmados em diferentes partes do Brasil. O vírus se espalhou para outros estados e comunidades, levando ao surgimento de surtos em várias regiões. O Brasil enfrentou diferentes fases da pandemia, com momentos de aumento acentuado de casos e óbitos em algumas ocasiões (Marson; Ortega, 2020; The Lancet, 2020).

Até março de 2025, a doença já havia afetado mais de 777.637.340 pessoas em todos os países do mundo, provocando mais de 7.090.480 mortes (WHO, 2025). No Brasil, até o março de 2025, a doença afetou mais de 39.232.810 pessoas e provocou a morte de mais de 715.610 pessoas (Coronavirus Brasil, 2025).

Os sintomas mais comuns da COVID-19 incluem febre, tosse seca, fadiga, falta de ar, dor de garganta e perda do olfato e paladar. No entanto, a doença pode variar em gravidade, desde casos assintomáticos até quadros graves que requerem internação hospitalar e suporte respiratório. Os casos graves, em geral, incluem pneumonia grave, síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e falência de múltiplos órgãos. Pessoas idosas e com condições médicas pré-existentes, como diabetes, hipertensão e doenças cardíacas, têm maior risco de desenvolver formas mais graves da doença (Haque *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020).

O diagnóstico preciso da COVID-19 é essencial para o controle da propagação do vírus SARS-CoV-2 e o tratamento adequado dos pacientes. O padrão ouro na detecção de SARS-CoV-2 é o teste de RT-qPCR, que detecta material genético do vírus presente em amostras respiratórias coletadas através de swabs nasofaríngeos ou orofaríngeos. Os testes de PCR são altamente sensíveis e específicos, permitindo a detecção mesmo em estágios iniciais da infecção (Bei *et al.*, 2021).

Outra forma de diagnóstico disponível são os testes de detecção de antígeno detectam proteínas do vírus presentes nas amostras respiratórias coletadas por swabs. Eles são de execução rápida em comparação com os testes de PCR, geralmente levando cerca de 15 a 30 minutos. No entanto, podem apresentar sensibilidade menor, especialmente em pacientes com baixa carga viral (Green *et al.*, 2020).

Outra opção para o diagnóstico da COVID-19 são os testes de anticorpos, também conhecidos como testes sorológicos. Estes testes não são utilizados para diagnóstico precoce da infecção, pois levam tempo para o sistema imunológico produzir anticorpos em resposta à infecção, e são mais úteis para identificar se uma pessoa foi exposta ao vírus no passado. Os testes detectam anticorpos específicos contra o SARS-CoV-2 em amostras de sangue. Assim como na detecção de antígeno, as técnicas mais utilizadas são tipo fluxo lateral (teste rápido) e ensaios do tipo imunossorvente ligado a enzima (ELISA) (Jacofsky; Jacofsky; Jacofsky, 2020).

Após o surgimento da pandemia, uma grande busca por tratamentos possíveis e vacinas eficazes foi iniciada pelos centros de pesquisa no mundo. Os melhores resultados para o tratamento envolvem terapias antivirais e tratamentos de suporte.

Em relação às terapias antivirais, diversos medicamentos foram testados em ensaios clínicos para verificar sua eficácia no combate ao SARS-CoV-2. Entre os mais promissores estão o Remdesivir e o Favipiravir, que têm como objetivo inibir a replicação viral e reduzir a gravidade da doença. Além disso, a administração de anticorpos monoclonais tem sido utilizada para neutralizar o vírus em pacientes de alto risco e aqueles com infecções iniciais (Coopersmith *et al.*, 2021).

Os tratamentos de suporte visam controlar a resposta inflamatória exacerbada observada em casos graves de COVID-19 com o uso de corticosteroides, como a dexametasona. Além disso, a oxigenoterapia e o suporte ventilatório têm sido essenciais para manter a função respiratória em pacientes graves (Gandhi; Lynch; Del Rio, 2020).

Em termos de prevenção, a rápida criação e aprovação de vacinas seguras e eficazes foi uma conquista notável na luta contra a COVID-19. Várias vacinas foram desenvolvidas e distribuídas em todo o mundo para proteger as pessoas contra o coronavírus. As vacinas com molécula de RNA mensageiro (Pfizer-BioNTech e Moderna) fornecem instruções ao corpo sobre como produzir uma parte específica do vírus, geralmente a proteína spike do SARS-CoV-2. O sistema imunológico reconhece

essa proteína como estranha e desenvolve uma resposta imunológica, incluindo a produção de anticorpos, para combater o vírus (Baden *et al.*, 2021; Polack *et al.*, 2020). As vacinas de vetor viral (AstraZeneca-Oxford e Johnson & Johnson) utilizam um vírus diferente (vetor viral) para transportar um gene específico do SARS-CoV-2 para as células do corpo. O vetor viral não pode se replicar ou causar doença, mas fornece as informações para que as células do corpo desencadeiam uma resposta imunológica (Knoll; Wonodi, 2021; Sadoff *et al.*, 2021). As vacinas inativadas (CoronaVac – Sinovac) utilizam o SARS-CoV-2 inativado (ou seja, torna-se não infeccioso) para estimular uma resposta imunológica, incluindo a produção de anticorpos (Jin *et al.*, 2022).

A eficácia das vacinas monovalentes contra a variante Ômicron foi reduzida devido às mutações que permitiram ao vírus escapar parcialmente da resposta imune. Além disso, a imunidade conferida por essas vacinas, medida pelos níveis de anticorpos neutralizantes, mostrou um declínio progressivo ao longo do tempo, aumentando o risco de reinfecções. Com o surgimento de novas subvariantes da Ômicron, como BA.1, BA.4 e BA.5, tornou-se essencial o desenvolvimento de reforços vacinais atualizados e mais direcionados. Assim, surgiram as vacinas bivalentes, que combinam material genético da cepa original do SARS-CoV-2 com RNA de linhagens da Ômicron predominantes, proporcionando uma resposta imune mais abrangente. Essas vacinas utilizam uma proporção de 1:1 de mRNA da cepa de Wuhan e da cepa Ômicron BA.4/BA.5, visando melhorar a proteção contra variantes circulantes. As principais vacinas bivalentes disponíveis são baseadas na tecnologia de RNA mensageiro, incluindo Comirnaty Original/Ômicron BA.1 (Pfizer-BioNTech) e Spikevax Bivalente Original/Ômicron BA.1 (Moderna), ambas aprovadas para uso como dose de reforço em diversos países (Gupta; Jaiswal, 2022; Javierre Miranda; Herce; Marco, 2022; Rosenblum *et al.*, 2022).

Graças ao avanço da vacinação em massa, em maio de 2023, a OMS declarou o fim da Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional referente à COVID-19, mas manteve o status de pandemia, sugerindo que novas pesquisas e acompanhamentos da doença sejam permanentes no mundo (WHO, 2023).

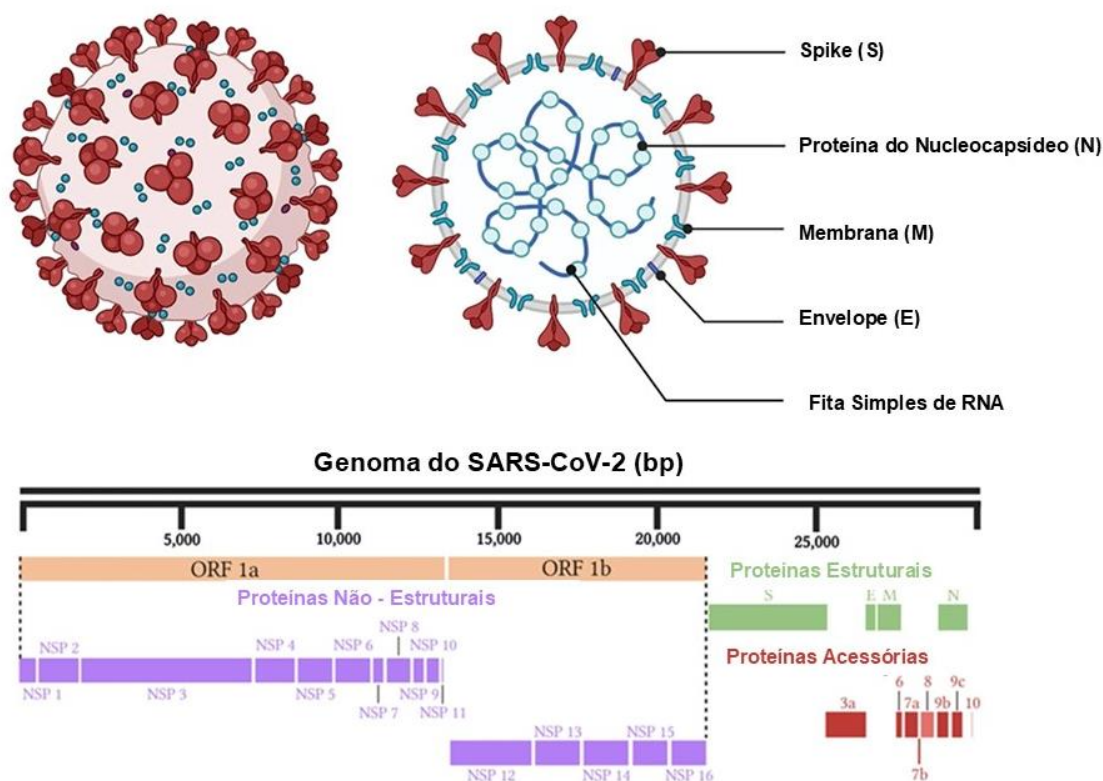
2.4.1 SARS-COV-2

O SARS-CoV-2 pertence à família dos coronavírus, um grupo de vírus de RNA de fita simples e sentido positivo. Isso significa que seu material genético pode ser diretamente traduzido em proteínas pelos ribossomos da célula hospedeira, diferentemente dos vírus de RNA de sentido negativo, que precisam primeiro sintetizar uma fita complementar antes da tradução. Os coronavírus estão amplamente distribuídos entre diferentes espécies animais, podendo causar doenças ou permanecer assintomáticos em seus hospedeiros. Com base em suas características genéticas e sorológicas, os coronavírus são classificados em quatro gêneros principais: Alphacoronavirus (Alpha-CoV), Betacoronavirus (Beta-CoV), Gammacoronavirus (Gamma-CoV) e Deltacoronavirus (Delta-CoV). Dentre eles, os Betacoronavírus incluem os vírus responsáveis por surtos epidêmicos e pandêmicos em humanos, como o SARS-CoV (causador da SARS), o MERS-CoV (causador da MERS) e o SARS-CoV-2 (responsável pela COVID-19). Especificamente, esses vírus pertencem a um subgrupo dentro dos Betacoronavírus denominado Sarbecovírus, conhecido por sua capacidade de infectar humanos e outros mamíferos (Lu *et al.*, 2020; Wertheim *et al.*, 2013).

Os coronavírus são vírus de RNA envelopados, com tamanho de genoma de 27-32 Kbp (Chen, 2020; Lai; Cavanagh, 1997). Sob um microscópio eletrônico, o vírus apresenta uma forma esférica ou oval, com projeções em sua superfície que se assemelham a uma coroa. Essas projeções são responsáveis pela ligação do vírus às células hospedeiras durante a infecção (Chen, 2020). O SARS-CoV-2 possui quatro proteínas estruturais principais, incluindo as proteínas spike (S), membrana (M), envelope (E) e nucleocapsídeo (N), que são necessárias para regular a função e a estrutura viral (**Figura 8**). Além disso, vários quadros de leitura abertos (ORFs) não estruturais também são codificados no genoma do SARS-CoV-2 (Kim, *et al.*, 2020; Singh; Yi, 2021).

As proteínas N e S são as mais importantes dessas quatro, sendo a N responsável pela formação do nucleocapsídeo e toda a estrutura viral (Siu *et al.*, 2008). As proteínas M e E desempenham papéis essenciais na montagem e liberação do vírus (Ali *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020).

Figura 8 - Elementos estruturais e genoma do SARS-CoV-2.



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

Já a proteína S ajuda o vírus a se ligar à célula hospedeira. Ela é formada por três partes, incluindo um grande domínio externo, uma âncora transmembranar de canal único e uma cauda intracelular curta. Essas três regiões podem ancorar com precisão à célula hospedeira. Nesses segmentos, o domínio externo contém duas subunidades, a subunidade de ligação ao receptor S1 e a subunidade de fusão de membrana S2. Essas subunidades se localizam na estrutura do cravo-trímero ou da coroa, razão pela qual é chamada de vírus corona (corona = coroa). A ligação do vírus com a célula hospedeira, ocorre devido a ligação ao receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) nas células humanas, permitindo a entrada do vírus nas células hospedeiras. Após a entrada nas células humanas, o SARS-CoV-2 replica-se rapidamente, infectando principalmente as células do trato respiratório, como os pneumócitos dos pulmões e células do trato respiratório superior (Hao *et al.*, 2020; Yan-Rong *et al.*, 2020). A infecção viral desencadeia uma resposta imune, resultando em inflamação local e sistêmica (Ali *et al.*, 2020; Walls *et al.*, 2020).

A rápida disseminação e o grande número de infectados, aumenta a possibilidade de mutações no genoma viral, gerando novas variantes da cepa

originária. Essas mutações podem alterar a transmissibilidade do vírus, sua capacidade de infectar células humanas, em alguns casos, a resposta imunológica induzida pelas vacinas.

As variantes do SARS-CoV-2 têm sido classificadas em três categorias principais, com base em sua importância para a saúde pública:

- Variantes de interesse (*variants of interest*, VOI): São variantes com mutações suspeitas de afetar características importantes do vírus, como transmissibilidade, gravidade da doença ou resposta imunológica. São monitoradas de perto pelas autoridades de saúde (WHO, 2021).
- Variantes de preocupação (*variants of concern*, VOC): São variantes que demonstraram causar impacto na saúde pública, como aumento da transmissibilidade, resistência parcial à imunidade pré-existente ou redução da eficácia das vacinas. Essas variantes são consideradas mais preocupantes (WHO, 2021).
- Variantes sob monitoração (*variants under monitoring*, VUM): São variantes que mostram mudanças importantes no vírus, como a capacidade de escapar completamente da resposta imunológica ou causar maior gravidade da doença (WHO, 2021).

Em relação ao SARS-CoV-2, algumas variantes de preocupação merecem destaque, pois são variantes que circularam mundialmente. A primeira delas é a variante Alfa (nomeada B.1.1.7), surgida no Reino Unido em setembro de 2020. A Alfa apresenta 17 alterações genéticas (**Figura 9**) (sendo 14 mutações pontuais não sinônimas e três deleções) no genoma viral. Dentre essas alterações, oito delas (deleção $\Delta 69-70$, deleção $\Delta 144$, N501Y, A570D, P681H, T716I, S982A e D1118H) ocorrem na proteína S. Duas dessas mutações, N501Y no RBD (domínio de ligação ao receptor) e P681H próximo ao local de clivagem da furina no pico viral, desempenham papéis cruciais na ligação do vírus ao receptor ACE2 nas células hospedeiras e na transmissão. É importante mencionar que a deleção H69/V70 na proteína S está associada ao escape do sistema imunológico e pode levar a falhas nos kits de testagem (Davies *et al.*, 2021; Meng *et al.*, 2021). Embora em um primeiro momento a *Public Health England*, por meio de um estudo de caso-controle pareado, não tenha relatado diferenças significativas no risco de hospitalização ou morte entre pessoas infectadas com a variante Alfa em comparação com outras variantes já existentes, uma análise posterior de coorte pareada conduzida pela PHE sugeriu a

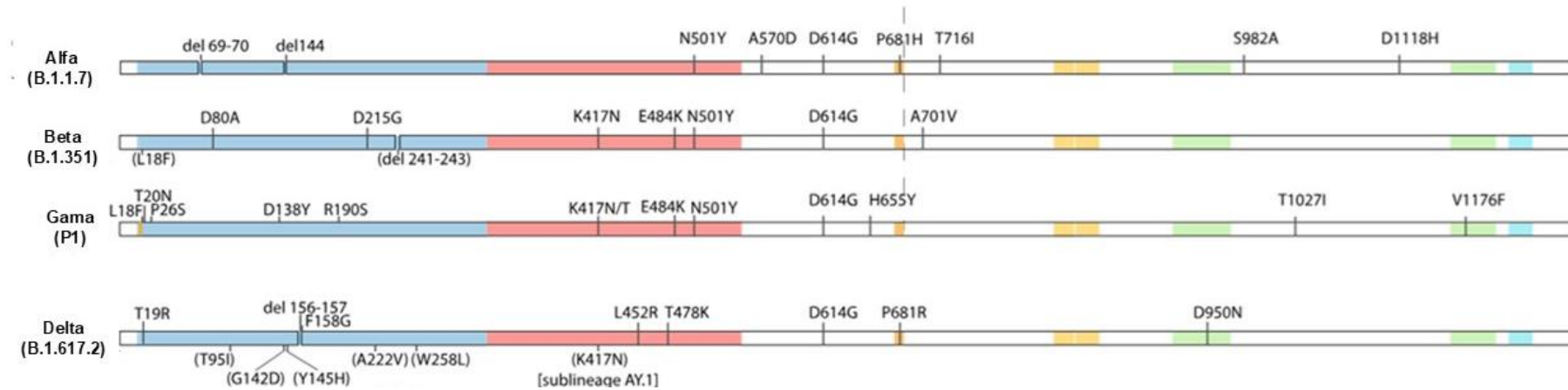
possibilidade de um maior risco de mortalidade em indivíduos infectados com a variante Alfa (Public Health England, 2020).

A segunda variante de preocupação relevante é a Beta, também conhecida como B.1.351, que foi identificada na África do Sul em dezembro de 2020. A variante Beta apresenta nove mutações (**Figura 9**) (L18F, D80A, D215G, R246I, K417N, E484K, N501Y, D614G e A701V) na proteína S do vírus. Dentre essas mutações, as substituições E484K e K417N contribuem para um aumento na afinidade de ligação à ACE2 humana. Além disso, a combinação das mutações N501Y, E484K e K417K resulta em uma ainda maior afinidade de ligação (Davies *et al.*, 2021).

Outra variante VOC foi a Gama (nomeada P.1), identificada no Brasil em janeiro de 2021. A Gama possui 10 mutações na proteína S (L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, H655Y, T1027I, V1176, K417T, E484K e N501Y). As mutações N501Y, K417N/T e E484K, que também são encontradas nas variantes Alfa e Beta (**Figura 9**), foram associadas ao aumento da afinidade de ligação ao ACE2 humano, bem como ao aumento da transmissibilidade (Faria *et al.*, 2021). Em relação à infecciosidade e gravidade da doença, foi observado um aumento abrupto no número de hospitalizações e mortes por COVID-19 em Manaus, Brasil, em janeiro de 2021, possivelmente devido à maior transmissibilidade da variante gama em comparação com linhagens pré-existentes (Sabino *et al.*, 2021).

Outra variante de preocupação que teve destaque no curso da pandemia foi a variante Delta (nomeada B.1.617.2), identificada na Índia em março de 2021. A grande diferença é que a variante Delta continha mutações E484Q e L452R na proteína S, que não correspondiam a nenhum dos VOC catalogados anteriormente (**Figura 9**). Além dessas, também foram observadas mutações comuns na proteína S (L452R, P681R e D614G). A mutação L452R pode estabilizar a interação entre a proteína spike e o receptor ACE2 da célula hospedeira e, assim, aumentar a infectividade. Embora o resíduo L452 não entre em contato direto com o receptor ACE2, ela pode causar alterações estruturais que promovem a interação entre a proteína spike e o receptor ACE2 (Chen *et al.*, 2020; Deng *et al.*, 2021).

Figura 9 - Principais mutações no gene spike entre as variantes Alfa, Beta, Gama e Delta do SARS-CoV-2.



Fonte: Adaptado de Viralzone (2025).

A variante Ômicron (nomeada B.1.1.529), identificada pela primeira vez em Botswana em novembro de 2021, e suas subvariantes é a variante circulante dominante. Os sintomas da infecção por Ômicron são menos perigosos do que os das outras variantes, mas é mais transmissível e menos suscetível às vacinas, embora a taxa de mortalidade seja menor. Estima-se que o Ômicron infecte 3 a 6 vezes mais pessoas em comparação com a Delta durante um determinado período (Callaway; Ledford, 2021). Devido a mutações na região genômica das variantes, vários subtipos surgiram ao longo do tempo, que são denominados subvariantes. A sublinhagem BA.1 foi a mais predominante em nível global. Com 35 mutações em sua proteína spike, essa variante demonstrou maior transmissibilidade e capacidade de evasão imunológica. No entanto, a BA.2 gradualmente substituiu a BA.1 em nível global, impulsionada por sua transmissibilidade aprimorada e mutações específicas, consolidando-se como a linhagem predominante durante a pandemia de COVID-19. Já a BA.3 apresentou uma transmissibilidade bastante limitada, resultando no menor número de casos registrados. Além disso, durante os meses de janeiro e fevereiro de 2022, foram identificadas na África do Sul outras duas novas linhagens: BA.4 e BA.5, que alteraram ainda mais a dinâmica da variante Ômicron, apresentando padrões mutacionais distintos que podem ter impacto na transmissão e no escape imunológico (Callaway; Ledford, 2021; Cao *et al.*, 2022; Kung *et al.*, 2024).

Linhagens recombinantes, identificadas pelo prefixo "X-", foram detectadas em diversas regiões do mundo. Entre elas, destaca-se a variante XE, originada da recombinação entre BA.1 e BA.2 na Inglaterra. No entanto, a linhagem que se mostrou mais adaptada e com maior capacidade de disseminação foi a XBB, derivada da recombinação entre BA.2.10.1.1 e BA.2.75. Essa variante possui elevada capacidade de escape imunológico. Além disso, estudos de imunogenicidade indicam uma redução significativa na resposta neutralizante contra XBB em soros de indivíduos (Arora *et al.*, 2023; Kung *et al.*, 2024). A subvariante EG.5, também conhecida como Eris, é uma descendente da linhagem XBB.1.9.2, e é uma VOI designada pela OMS desde agosto de 2023 (Arora *et al.*, 2023; Kung *et al.*, 2024). A subvariante BQ.1.1 é um dos descendentes da linhagem BQ.1, que, por sua vez, evoluiu a partir da BA.5, em novembro de 2022 (Arora *et al.*, 2023; Kung *et al.*, 2024; WHO, 2025).

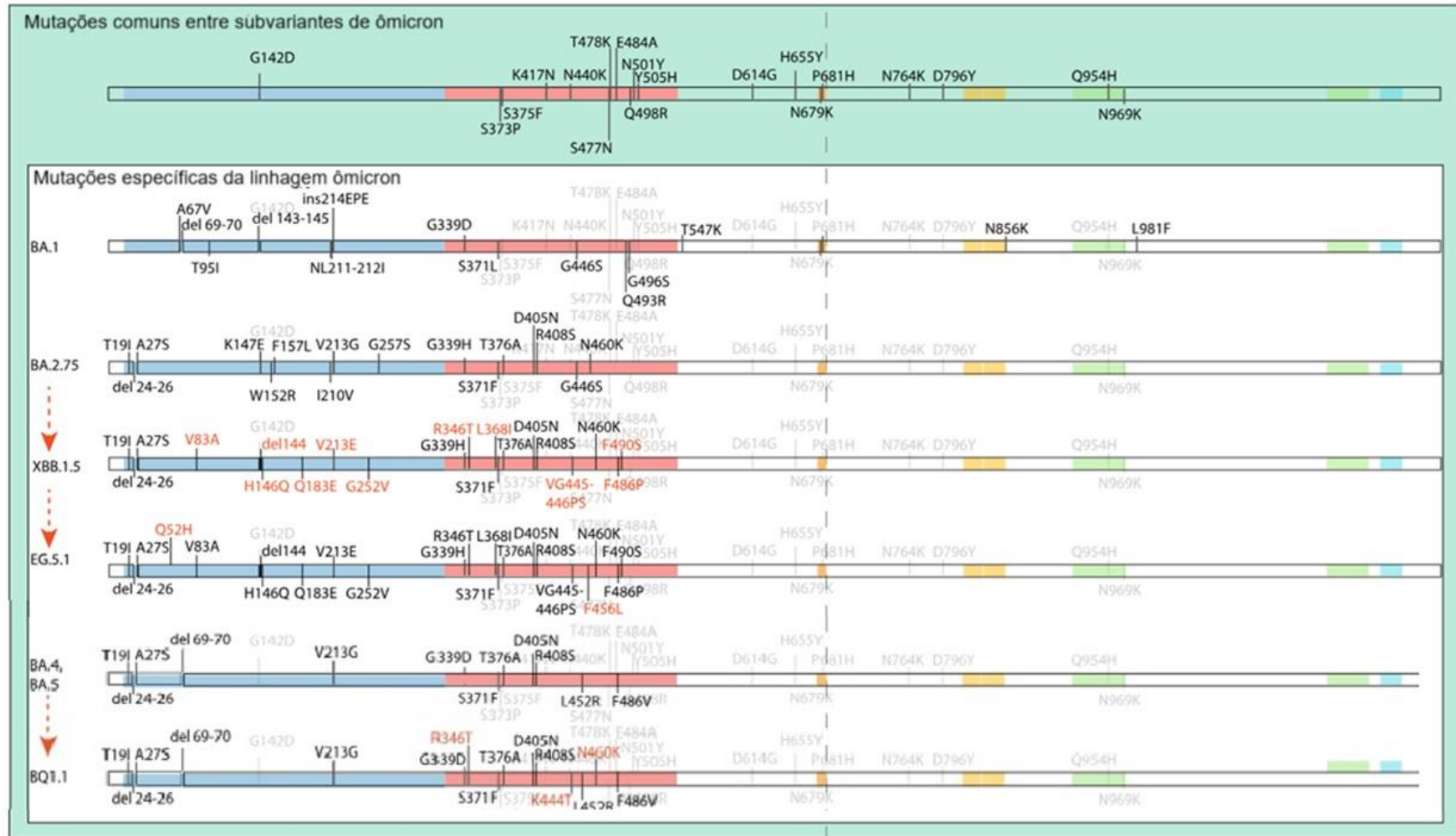
As análises das sequências genômicas da variante Ômicron revelaram um número significativamente elevado de mutações não sinônimas, incluindo várias no gene S, que foram comprovadamente associadas à transmissibilidade, gravidade da

doença e resistência imunológica. No total, mais de 60 substituições, exclusões e inserções foram identificadas na variante Ômicron, tornando-a a variante do SARS-CoV-2 com o maior número de mutações até o momento (**Figura 10**) (GISAID, 2021). Essas mutações estão distribuídas em diferentes partes do genoma viral, com grande concentração no gene S.

Na região ORF1a, a variante Ômicron apresenta seis importantes substituições (K856R, L2084I, A2710T, T3255I, P3395H e I3758V) e duas deleções, totalizando quatro aminoácidos (aminoácido 2083 e aminoácidos 3674-3676). No gene ORF1b, foram encontradas duas substituições (P314L e I1566V). Além disso, foram identificadas uma substituição P10S e uma deleção de três resíduos nas posições 27-29 no gene ORF9b. Nos genes das proteínas estruturais, foram observadas uma substituição (T9I) no gene do envelope (E), três substituições (D3G, Q19E e A63T) no gene da membrana (M) e três substituições, além de uma deleção de três resíduos, no gene das proteínas do nucleocapsídeo (N) (Berkhout; Herrera-Carrillo, 2022; Korber *et al.*, 2020).

A maioria das mutações (**Figura 10**) ocorre no gene da proteína spike, com 30 substituições, três exclusões (H69/V70, G142/V143/Y144 e N211) e uma inserção de três aminoácidos (EPE) na posição 214. Vale destacar que todas as VOCs incluem a mutação D614G no gene da proteína spike, que foi associada a cargas virais mais altas no trato respiratório superior e a uma maior frequência de infecção em indivíduos mais jovens. Além disso, a variante Ômicron compartilha a mutação N501Y com as variantes Alfa, Beta e Gama, o que se acredita aumentar a afinidade do spike com a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) e, consequentemente, aumentar sua transmissibilidade. A presença da exclusão H69/V70 pode aumentar ainda mais a transmissibilidade. Outras mutações próximas ao local de clivagem da furina, como N679K e P681H, podem facilitar a clivagem do spike em S1 e S2, potencialmente aumentando a fusão e a infecção viral (Berkhout; Herrera-Carrillo, 2022; He *et al.*, 2020; Ren *et al.*, 2022). As subvariantes de Ômicron apresentam um acúmulo de mutações diferentes entre si. Entre as principais mutações das subvariantes, podemos citar a mutação F486P, que aumenta a infecciosidade, e as mutações E180V e K478R, que aumentam o escape ao sistema imune. A subvariante EG.5, por exemplo, surgiu devido ao acúmulo de mutações na proteína spike, especialmente a mutação F456L, que contribui para um escape imunológico mais eficiente (Kung *et al.*, 2024). Já a subvariante BQ1.1 possui cinco novas substituições

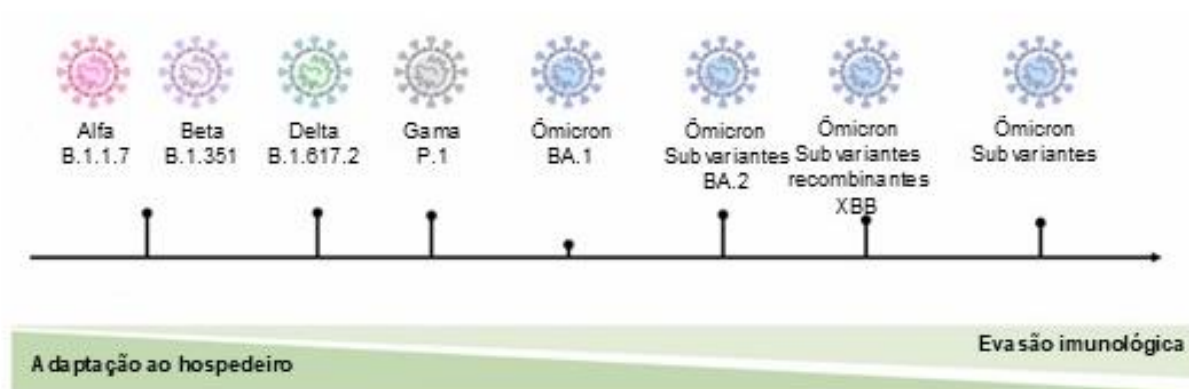
Figura 10 - Principais mutações no gene spike entre as subvariantes Ômicron do vírus SARS-CoV-2.



Fonte: Adaptado de Viralzone (2025).

de mutação convergente, a saber, R346T, K444T, L452R, N460K e F486V, o que confere um maior escape imunológico (Hattab *et al.*, 2024; Kung *et al.*, 2024). A variante Ômicron continua em constante transformação gerando inúmeras subvariantes, sendo que a cada surgimento também há variação da evasão ao sistema imune e adaptação ao hospedeiro (**Figura 11**) (Covariants, 2023).

Figura 11 - Caminho evolutivo do SARS-CoV-2.



Fonte: Adaptado de Kung *et al.* (2024).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral pretendido com esse trabalho foi o desenvolvimento de reagentes e kits de diagnóstico que possam auxiliar as etapas de detecção de SARS-CoV-2 por RT-qPCR.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um reagente de extração rápida de ácidos nucleicos, utilizando enzimas extraídas de plantas;
- Validar o reagente desenvolvido para extração rápida de ácidos nucleicos em diferentes matrizes biológicas, incluindo swab de nasofaringe, aspirado traqueal, sangue, amostras vegetais e bactérias;
- Realizar ensaio de estabilidade do reagente de extração rápida de ácidos nucleicos;
- Desenhar primers e sondas para detectar variantes de SARS-CoV2;
- Desenvolver e validar um kit de detecção de variantes de SARS-CoV-2 por análise multiplex de RT-qPCR.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 INSTRUMENTOS

Os procedimentos realizados neste trabalho foram desenvolvidos nos seguintes locais: Laboratório de Biologia Molecular, Laboratório Multiusuário de Bioprodutos e Bioprocessos (CentralBio) e Laboratório de Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados (LDNANO), na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora. Além disso, a análise da integridade de ácidos nucleicos foi realizada no laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite de Juiz de Fora. Foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Laboratório de Biologia Molecular:

- Equipamento RT-qPCR, 7500 Fast Real-Time PCR, marca Applied Biosystems - Thermo Scientific (Massachusetts, EUA);
- Equipamento RT-qPCR, QuantStudio 03 Real-Time PCR Systems, marca Applied Biosystems - Thermo Scientific (Massachusetts, EUA);
- Equipamento RT-qPCR, CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, marca Bio-rad (California, EUA);
- Banho – seco Thermo-Shaker Agimaxx, da marca Thermo Scientific (Massachusetts, EUA);
- Microcentrífuga refrigerada, modelo Fresco 21R, da marca Thermo Scientific (Massachusetts, EUA);
- Agitador tipo vortex, da marca Warmnest (São Paulo, Brasil);
- Cabines Biológicas Airstream, classe II B2, da marca ESCO Lifescience (Taiwan, China);
- Nanodrop 2000c, da marca Thermo Scientific (Massachusetts, EUA);
- Veriti Thermal Cycler, da marca Thermo Scientific (Massachusetts, EUA);
- Fonte eletroforese; da marca Locus (São Paulo, Brasil);

- Laboratório Central Bio:

- Equipamento Fotodocumentador Gel Doc XR+ Gel Documentation System, da marca Bio-rad (California, EUA);

- LDNANO:

- Balança digital AUY220, da marca Shimadzu (Quioto, Japão);
- pHmetro PG1800, da marca Gehaka (São Paulo, Brasil);
- Agitador magnético Mag-01H, da marca Marte Científica (Minas Gerais, Brasil);
- Vórtex, da marca Global Trade Technology (São Paulo, Brasil);
- Fluorômetro Qubit 3.0, da marca Thermo Fisher (Massachusetts, EUA);

- Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora):

- Sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (California, EUA).

4.2 MATERIAL QUÍMICO E BIOLÓGICO UTILIZADO

Para o desenvolvimento do reagente de extração rápida de ácidos nucleicos foram utilizados produtos químicos, a saber: tampão TRIS [Tris-(hidroximetil) aminometano] P.A da marca Synth (São Paulo, Brasil), o componente ativo de origem vegetal (protegido por transferência de tecnologia), ácido clorídrico de grau P.A., da marca Dinâmica Química Contemporânea (São Paulo, Brasil), e água livre de RNASE e DNASE, da marca LGC Biotecnologia (São Paulo, Brasil).

Além desses, foram utilizados dois kits de extração e purificação de ácidos nucleicos, sendo eles: Purelink RNA Mini Kit, da marca Invitrogen (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EUA) e o Pi-Clear RNA/DNA Viral, da marca Pi-Biotech Genética Avançada Ltda (Minas Gerais, Brasil). Além dos kits de extração em coluna, também foi utilizado o reagente QuickExtract™ RNA Extraction Solution, da marca Biosearch Technologies (Hoddesdon, Reino Unido) para comparação com o reagente desenvolvido.

Diferentes kits de diagnóstico foram utilizados conforme execução dos ensaios de validação em diferentes matrizes biológicas. Foram utilizados:

- Kit iTaq Universal Probes One-Step, da marca Bio-Rad Laboratories (California, EUA);
- Kit 2019-nCoV RUO kit, da marca Integrated DNA Technologies (Iowa, EUA);
- Kit Allplex™ SARS-CoV-2, da marca Seegene (Seul, Coreia do Sul);

- Kit Allplex™ Respiratory Panel 1, da marca Seegene (Seul, Coreia do Sul);
- Kit ZDC Biomol, da marca Instituto de Biologia Molecular do Paraná (Paraná, Brasil);
- Primer e sonda *Taqman* de lectina (LE2), número de catálogo 4351372, da marca ThermoFisher Scientific (Massachusetts, EUA);
- Kit EasyPlex Sexagem Fetal, da marca CBI Scientific (Florida, EUA);

Para avaliação da integridade do RNA, foi utilizado o kit RNA 6000 Nano Chip (California, EUA).

Para a realização de PCR convencional, foi utilizado o kit Master Mix – Conjunto para PCR, da marca Ludwig Biotecnologia. Para a realização de eletroforese, foi utilizada agarose da marca Ludwig Biotecnologia (Rio Grande do Sul, Brasil) e tampão TAE, 50X concentrado, da marca Nova Biotecnologia (São Paulo, Brasil) e ladder 100 pb, da marca Ludwig Biotecnologia (Rio Grande do Sul, Brasil). Além destes itens, também foi utilizado primer do gene *mecA*, desenvolvido e gentilmente cedido pelo professor Thiago Nascimento, da Faculdade de Enfermagem, da UFJF.

Para realização dos testes de performance e validação dos primers e sondas desenvolvidos e multiplex foram utilizados:

- Kit iTaq Universal Probes One-Step, da marca Bio-Rad Laboratories (California, EUA);
- Controle positivo IDT 2019-ncov_n_positive control (Iowa, EUA);
- Kit qPCR-SYBR-Green mix/ROX, da marca Ludwig Biotecnologia (Rio Grande do Sul, Brasil);

4.3 COMITÊ DE ÉTICA

O estudo foi submetido e aprovado pelo comitê de ética local (CEP UFJF-CAAE: 48021321.3.0000.5147; CEP UFJF CAAE: 86229925.3.0000.5147) e incluiu consentimento por escrito de todos os participantes.

4.4 DESENVOLVIMENTO DE REAGENTE DE EXTRAÇÃO RÁPIDA DE ÁCIDOS NUCLEICOS

4.4.1 Formulação do reagente de extração rápida de ácidos nucleicos

A formulação do reagente de extração rápida encontra-se protegida por transferência de tecnologia e, por isso, não pode ser publicada. A formulação contém um ativo protéico (A) e tampão TRIS-HCl em sua composição (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Formulação do reagente de extração rápida de ácidos nucleicos.

Formulação	Concentração Ativo A (em mg/mL)	Veículo
1	30,0	Tris-HCl 30 mM pH 4,6

O tampão Tris-HCl 30 mM foi preparado em água, sendo o pH corrigido para 4,6 com solução de HCl 1,0 M. Em seguida, o ativo A foi adicionado lentamente, mantendo homogeneização magnética da solução até completa solubilização dos pós.

4.4.2 Desenvolvimento e validação de protocolo de extração para amostras de SARS-CoV-2

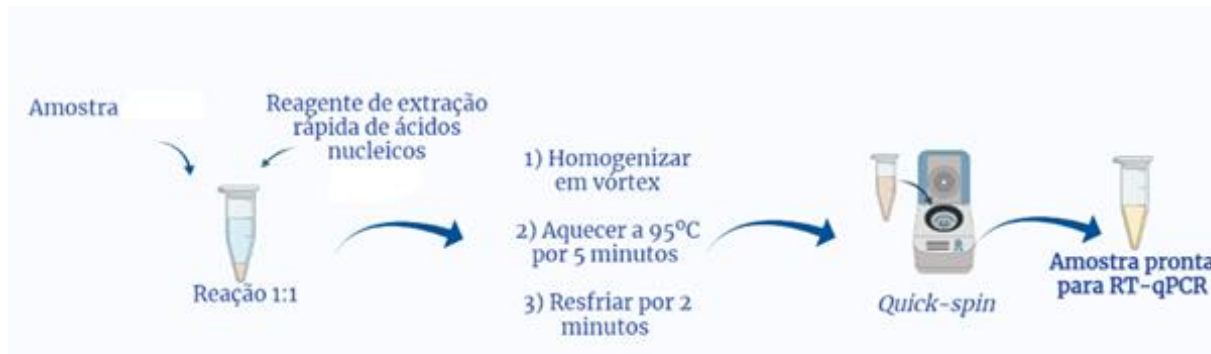
Para validar o reagente para amostra de SARS-CoV-2, foi utilizado o método de extração semelhante ao descrito por Ladha e colaboradores (2020).

As amostras coletadas de diferentes pacientes com suspeita de COVI-19, e que apresentaram diferentes valores de CT foram selecionadas, totalizando um *n* igual a 50 amostras, sendo 44 oriundas de swab de naso e orofaringe acondicionados em meio de transporte viral, 03 de oriundas de swab de naso e orofaringe acondicionados em salina e 03 oriundas de aspirado traqueal.

Uma quantidade de 40,0 µL de amostra foi misturada com 40 µL do reagente de extração rápida de ácidos nucleicos em um microtubo e homogeneizada em vórtex (**Figura 12**). Em seguida, a mistura foi aquecida a 95 °C por 5 minutos, e resfriada a -20 °C por 2 minutos. Após esse tempo, as amostras foram submetidas a uma rápida centrifugação (*quick spin*) para recuperar qualquer gotícula que tenha ficado nas paredes e tampa do microtubo. Após esse procedimento, a amostra foi submetida a técnica de RT-qPCR, utilizando sondas de hidrólise. Como controle e com a finalidade

de comparação, as mesmas amostras foram extraídas com o kit de coluna de sílica PureLink RNA mini Kit (Invitrogen) e com um reagente de extração rápida comercial, o QuickExtract DNA Extraction Solution (Biosearch Technologies).

Figura 12 - Esquema representativo da extração rápida de ácidos nucleicos.



Fonte: Elaborado pela autora (2023) – BioRender.

O material extraído com o reagente foi analisado por espectrofotometria, com o equipamento NanoDrop (Thermo Scientific), para avaliar a qualidade e a quantificação do RNA obtido. Com o objetivo de encontrar a melhor concentração de amostra nas misturas reacionais de RT-qPCR, foi realizada uma curva para determinar qual a porcentagem de amostra ideal para ser utilizada nos ensaios. Para isso, as amostras foram analisadas com kit multiplex, usando o Allplex™ SARS-CoV-2 (Seegene). O ensaio com Allplex™ SARS-CoV-2 Kit (Seegene) utilizou um volume reacional de 20 µL, contendo 5,0 µL de mix enzimático (EM8), 5,0 µL da mistura de oligo mix (MOM), a amostra extraída (1, 2, 3, 4, e 5,0 µL), e água livre de nucleases (suficiente para completar 20,0 µL). O ciclo térmico foi realizado com 55°C por 20 minutos para transcrição reversa, seguido de 95°C por 15 minutos, e então 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 58°C por 30 segundos (Seegene, 2020).

Após determinação da melhor concentração, as amostras foram avaliadas por kit multiplex, usando o mesmo kit Allplex™ SARS-CoV-2 (Seegene), nas mesmas condições descritas anteriormente.

Adicionalmente, as análises de RT-qPCR foram conduzidas usando o kit singleplex iTaq Universal Probes One-Step Kit (Bio-Rad Laboratories) e 2019-nCoV RUO (Integrated DNA Technologies), no equipamento QuantStudio 03 (Thermo Fisher Scientific). A ciclagem e condições consistiram em uma etapa de transcriptase reversa

a 50 °C por 15 minutos, desnaturação da transcriptase reversa a 95 °C por 3 minutos, em seguida 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e anelamento e extensão a 60 °C por 1 minuto. O volume final da mistura reacional foi de 20 µL, contendo 3,0 µL da amostra extraída, 0,5 µL de iScript enzyme, 10 µL de 2x iTaq PCR, e a combinação de primers/sondas e água (para N1 e RNaseP – Ribonuclease P: 0,8 µL de primers e sondas e 5,7 µL de água livre de nucleases; para N2: 0,47 µL de primers e sondas, e 6,03 µL de água livre de nucleases) (Jaeger *et al.*, 2021).

4.4.2.1 Avaliação da integridade do RNA extraído

Para determinar a integridade do RNA extraído com o reagente desenvolvido comparamos o material recém extraído com RNA purificado utilizando coluna de sílica do kit Pi-Clear DNA-RNA Viral (Pi-Biotech Genética Avançada), no sistema Bioanalyzer Agilent 2100. Foram selecionadas seis amostras biológicas, sendo três extraídas utilizando o reagente desenvolvido e três amostras extraídas utilizando a coluna de sílica Pi- Clear, conforme protocolo do fabricante.

Os resultados foram avaliados com base no RIN de cada amostra, variando de 1 (totalmente degradado) a 10 (totalmente íntegro) e pela intensidade do pico das subunidades 18S e 28S para avaliar a proporção entre as duas subunidades, um indicador adicional de integridade (Sodowich; Fadl; Burns, 2007).

4.4.3 Desenvolvimento e validação de protocolo de extração para sangue e hemoderivados

Para validar o reagente para amostras de sangue total e hemoderivados (plasma e soro), a extração de ácidos nucleicos foi realizada com o reagente de extração desenvolvido (**Tabela 2**), utilizando o mesmo protocolo de extração desenvolvido para amostras de SARS-CoV-2.

As amostras de sangue total foram avaliadas por RT-qPCR para detecção de um gene endógeno humano RNaseP, que está envolvido na biossíntese de tRNA para a tradução de proteínas e na regulação da estrutura e função da cromatina (Jarrous, 2017). Assim como para SARS-CoV-2, também foi feita uma curva para determinar qual o percentual de amostra ideal para o mix, de 5, 10, 15 e 20%, em triplicata.

As amostras de soro foram validadas utilizando RT-qPCR para detecção de arboviroses (Dengue, Zika, Chikungunya e Febre Amarela). Foram selecionadas 20 amostras de soro com diagnóstico conhecido para essas arboviroses.

Em relação ao plasma, as amostras foram validadas para o ensaio de Sexagem fetal, na qual é identificada a presença de fragmentos do gene Y circulante no sangue materno (Finning; Chitty, 2008). Nesse ensaio, foram utilizadas amostras de 11 pacientes, sexo feminino, gestantes de 25 a 39 semanas.

Tabela 2 – Parâmetros de validação de sangue total e hemoderivados.

Material	Extração	Gene Alvo	Kit de detecção utilizado	Mix reacional	Parâmetros de qPCR
Sangue Total	- Misturar 40 µL de sangue total + 60 µL de reagente de extração; - Homogeneizar e aquecer a 95°C por 5 minutos; - Resfriar por 02 minutos; - <i>Quick Spin</i>;	RNAseP	Kit singleplex iTaq Universal Probes One-Step Kit (Bio-Rad Laboratories) e primer CDC para RNAseP (Integrated DNA Technologies)	- Volume final: 20 µL; - Composição: 3,0 µL da amostra extraída, 0,5 µL de iScript enzyme, 10 µL de 2x iTaq PCR, 0,8 µL de primers e sondas e 5,7 µL de água livre de nucleases.	Transcriptase reversa: 50 °C por 15 minutos; Desnaturação: 95 °C por 3 minutos; Ciclos: 95 °C por 15 segundos e anelamento e extensão a 60 °C por 1 minuto (40 ciclos).
Soro	- Misturar 40 µL de soro + 40 µL de reagente de extração; - Homogeneizar e aquecer a 95°C por 5 minutos; - Resfriar por 02 minutos; - <i>Quick Spin</i>;	Zika, Dengue, Febre Amarela ou Chikungunya	Kit ZDC Biomol (IBMP)	- Volume final: 20 µL; - Composição: 3,0 µL da amostra extraída, 7,8 µL de mistura PCR, 2,3 µL de primers, 1,2 µL de sondas, 0,6 µL de enzima transcriptase reversa e 5,1 µL de água livre de nucleases.	Transcriptase reversa: 51 °C por 30 minutos; Desnaturação: 95 °C por 15 minutos; Ciclos: 95 °C por 15 segundos e anelamento e extensão a 60 °C por 1 minuto (40 ciclos).

Plasma	- Misturar 40 µL de plasma + 40 µL de reagente de extração; - Homogeneizar e aquecer a 95°C por 5 minutos; - Resfriar por 02 minutos; - <i>Quick Spin</i>;	Gene DYS14	Kit de EasyPlex Sexagem Fetal (CBI Scientific).	- Volume reacional: 10 µL; - Composição: 4,5 µL de reagente qPCR Master Mix, 0,5 µL da mistura de primers de sondas, 3,0 µL da amostra extraída e 2,0 µL de água livre de nucleases.	Desnaturação inicial: 95°C por 1 minuto; Ciclo: 95°C por 10 segundos e 45 ciclos de 60°C por 30 segundos (40 ciclos)
--------	---	------------	---	---	--

4.4.4 Desenvolvimento de protocolo de extração para amostras vegetais

No intuito de testar o reagente para a extração de ácidos nucleicos de amostras vegetais, foi desenvolvido método baseado no trabalho de Ladha e colaboradores (2020).

A espécie vegetal escolhida para o teste inicial em vegetais, foi a soja (*Glycine max* (L.) Merrill), por ser um cultivo de grande valor na agricultura brasileira (Costa *et al.*, 2019). Contudo, devido à complexidade de cada parte da planta, foram desenvolvidos protocolos diferentes para sementes e folhas.

Para as folhas, foi utilizado um círculo com diâmetro de uma tampa de microtubo de 2,0 mL (diâmetro igual a 1,0 cm), o mesmo foi picotado com auxílio de tesoura e adicionado a quantidade suficiente de reagente de extração (100 µL) para cobrir todo o conteúdo. Em seguida, a mistura foi homogeneizada, aquecida a 95 °C por 5 minutos, e resfriada a -20 °C por 2 minutos. Após esse tempo, as amostras foram submetidas a uma rápida centrifugação (*quick spin*) para recuperar qualquer gotícula que tenha ficado nas paredes e tampa do microtubo e para precipitar todo o material sólido presente no microtubo. Após esse procedimento, o sobrenadante obtido com a extração foi analisado por RT-qPCR (Freeman; Linz, 2019).

Para as sementes, o material foi triturado em gral de porcelana. Em seguida, 40,0 mg de pó foi misturado com quantidade suficiente de reagente de extração (200 µL) para cobrir todo o conteúdo sólido. Em seguida, a mistura foi homogeneizada, aquecida a 95 °C por 6 minutos, e resfriada a -20 °C por 2 minutos. Após esse tempo, as amostras foram submetidas a uma rápida centrifugação (*quick spin*) para recuperar qualquer gotícula que tenha ficado nas paredes e tampa do microtubo e para precipitar todo o material sólido presente no microtubo. Após esse procedimento, a amostra foi analisada por RT-qPCR (Freeman; Linz, 2019).

Amostras de folhas e sementes foram avaliadas utilizando o kit Primer e sonda *Taqman* de lectina (LE2) (ThermoFisher Scientific) e kit iTaq Universal Probes One-Step (Bio-Rad Laboratories). Com o objetivo de encontrar a melhor concentração de amostra nas misturas reacionais de PCR, foi realizada uma curva para determinar qual a porcentagem de amostra ideal para ser utilizada nos ensaios. Para isso, foi utilizado um volume reacional de 20 µL, contendo 0,5 µL de iScript enzyme, 10 µL de 2x iTaq PCR, 0,8 µL da mistura de primers e sondas, amostra extraída (1, 2, 3 e 5 µL), e água livre de nucleases para completar o volume. O ciclo térmico foi realizado com

50 °C por 15 minutos para transcrição reversa, seguido de 95 °C por 3 minutos, e então 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto (Jaeger *et al.*, 2021).

4.4.5 Desenvolvimento de protocolo de extração para bactérias

O reagente de extração rápida de ácidos nucleicos também foi validado para bactérias, utilizando método de extração semelhante ao descrito por Abbas e Ihn (2016). Uma suspensão de 0,5 mL com 10^8 UFC da bactéria *Staphylococcus aureus* foi centrifugada a 1.700 x g (5.000 rpm) em uma microcentrífuga por 3 minutos para peletizar as células. O sedimento celular bacteriano foi lavado uma vez com 0,5 mL de água estéril, e depois centrifugado novamente a 1.700 x g (5.000 rpm) por 3 min. Cuidadosamente, o sobrenadante foi removido e descartado. Em seguida, 100 µL do reagente extração rápida de ácidos nucleicos foi adicionada ao pellet celular. A mistura foi homogeneizada em vórtex, até completa solubilização do pellet. Em seguida, a mistura foi incubada a 95 °C por 5 minutos, em banho seco, e resfriada por, no mínimo, 2 minutos. Após esse tempo, as amostras foram submetidas a uma rápida centrifugação (*quick spin*) para recuperar qualquer gotícula que tenha ficado nas paredes e tampa do microtubo e para precipitar todo o material sólido presente no microtubo. Após esse procedimento, a amostra foi analisada por PCR convencional. Como comparação, as amostras foram extraídas com o kit comercial de extração por coluna Purelink RNA Mini Kit (Invitrogen).

O alvo analisado para o desenvolvimento de protocolo foi o Gene *mecA*, um gene relacionado a resistência em oxacilina (Coelho *et al.*, 2007). Foram utilizadas bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e ATCC 33591, gentilmente cedidas pelo Prof. Thiago Nascimento, da Faculdade de Enfermagem, da UFJF. Amostras extraídas foram avaliadas utilizando o kit Master Mix – Conjunto para PCR, da marca Ludwig Biotecnologia e primer desenvolvido *in house*, para o gene *mecA*. O volume reacional foi 20 µL, contendo 16,0 µL de do master mix, 1,0 µL de primers e 3,0 µL da amostra extraída. O ciclo térmico foi realizado com um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto para desnaturação, 55 °C por 1 minuto para anelamento, 72 °C por 1 minuto para extensão, e finalmente um ciclo de 72 °C por 5 minutos para extensão final (Ludwig, 2023). O produto foi aplicado em eletroforese em gel de agarose 1,5%, com corrida a 80 V, por 1 hora e meia. O gel foi corado com brometo de etídio (10 µL) para

visualização das bandas referentes ao amplicon, e foi utilizado 5,0 µL de padrão Ladder e 10,0 µL das amostras. A presença de fragmentos resultantes dos produtos de amplificação foi visualizada em transiluminador e fotografada.

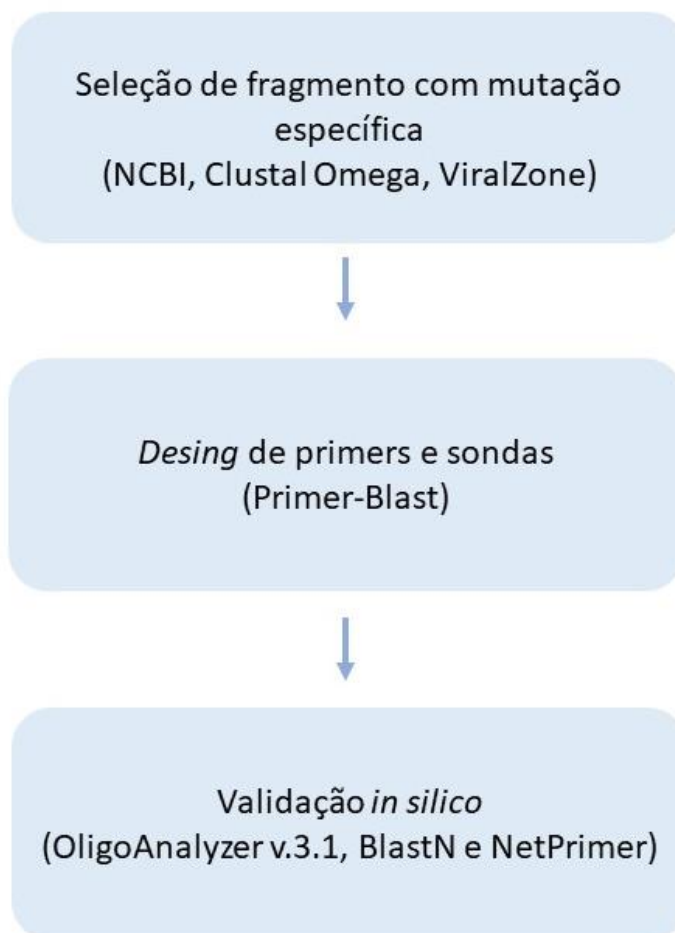
4.4.6 Estudo de estabilidade

Para determinar a estabilidade do reagente resfriado em geladeira (4-8 °C) ou congelado (-20 °C), duas amostras de SARS-CoV-2 foram selecionadas, uma com provável carga viral baixa (CT > 30,0) e outra com provável carga viral alta (CT < 30,0). As amostras foram extraídas com o reagente fresco (tempo 0), com o reagente armazenado em 1 semana em geladeira convencional e com reagente congelado a -20 °C, após 10, 30 e 50 ciclos de descongelamento/congelamento. Para comparação, as amostras foram extraídas com kit de extração rápida comercialmente disponível, o QuickExtract RNA Extraction Solution, que foi descongelado apenas 3 vezes, seguindo orientação disponível no manual do fabricante. Além disso, para determinar a estabilidade do reagente em temperatura ambiente, três amostras foram analisadas no tempo 0 (reagente recém descongelado), e com o reagente armazenado em temperatura ambiente por 7, 14, 21 e 28 dias. As amostras foram analisadas por RT-qPCR utilizando o kit Allplex SARS-CoV-2, da Seegene.

4.5 DESENVOLVIMENTO DE KIT DE DETECÇÃO MULTIPLEX DE VARIANTES DE SARS-CoV-2 POR RT-Q-PCR

Inicialmente, foi realizada a definição de quais variantes seriam abordadas no kit multiplex. Para isso, as taxas de circulação de variantes no Brasil foram analisadas, através do número de sequências genômicas depositadas no banco de dados do GenomaHCov (Fiocruz, 2023). Após definição das diferentes sequências de variantes para a confecção de kit multiplex, com diferenciação de variantes, foi iniciado o desenvolvimento dos diferentes conjuntos de primers e sondas (**Figura 13**).

Figura 13 - Fluxograma de desenvolvimento dos primers e sondas.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

4.5.1 Desenvolvimento de primers e sondas

As sequências genômicas das variantes selecionadas de SARS-CoV-19 foram obtidas no banco de dados da NCBI (National Center for Biotechnology Information) (NCBI, 2023).

Foram selecionados genomas certificados e os alvos nos genes do vírus foram ajustados da forma mais sensível, específica e precisa possível. Os genomas das variantes foram copiados e as análises comparativas por alinhamento das sequências em um nível básico foram feitas com auxílio dos programas de bioinformática como Clustal Omega (Brown *et al.*, 2017; Tombuloglu *et al.*, 2021). Em seguida, as regiões específicas selecionadas foram comparadas com as mutações descritas para as variantes de SARS-CoV-2 na base de dados ViralZone, para definir qual região

mutada poderia ser utilizada no desenho de primers e sondas, excluindo a possibilidade de interferência e inespecificidade (Viralzone, 2023).

Como as variantes contém grandes quantidades de mutações, a sonda foi definida como o fragmento que continha a mutação selecionada para aumentar a especificidade da reação. O segmento selecionado para o desenho dos primers considerou 160 pares de bases antes e após o aminoácido mutado da sonda, para evitar fragmentos grandes e outras mutações, coincidentes com outras variantes (Basu, 2015).

Em seguida, as sequências foram enviadas ao software online Primer-Blast para a confecção dos primers desejados (Sayers *et al.*, 2011). Alguns parâmetros foram definidos no software para elaboração dos primers e aumento da eficiência, como (Basu, 2015):

- Comprimento do amplicon: 170 pares de bases;
- Temperatura de fusão (T_m): 58 a 62 °C para primers e 50 a 62 °C para sondas;
- Comprimento do primer e da sonda: 20 a 30 pares de bases;
- Conteúdo GC: 40 a 80%;

A partir das sequências de primers e sondas obtidas, procedeu-se a verificação *in silico* quanto a formação de *hairpins* e formação de auto e heterodímeros utilizando os softwares OligoAnalyzer v.3.1 e NetPrimer (IDT, 2023a; NetPrimer, 2023).

Por fim, ainda nas análises *in silico*, as sequências definidas foram avaliadas quanto a sua capacidade de ligação com seres humanos e outras variantes de SARS-CoV-2, para garantir a sua especificidade para cada variante selecionada, através do software gratuito Blastn (Nucleotide Blast) (Blastn, 2023).

Em relação às sondas, foram selecionados fluoróforos e seus respectivos *quencher*s para a sonda de hidrólise de cada variante. Com o objetivo de permitir a complexação, cada sonda de hidrólise relativa a cada variante foi associada a um fluoróforo diferente, com menor quantidade de sobreposição espectral, na posição 5' e *quencher* na posição 3' (Zimmers *et al.*, 2019). A sonda da variante Delta foi associada ao fluoróforo FAM e *quencher* BHQ1; a sonda da variante Gama foi associada ao fluoróforo HEX e *quencher* BHQ1; a sonda da variante Ômicron foi associada ao fluoróforo Cy5 e *quencher* BHQ3; e a sonda do gene RdRp foi associado ao fluoróforo ROX e *quencher* BHQ1.

Primers e sondas foram sintetizados e purificados por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) pela Synbio Technologies através da empresa FastBio (São Paulo, Brasil) e dissolvidos em tampão TE (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) para preparar estoques de 100 µM.

4.5.2 Otimização do sistema PCR

4.5.2.1 Determinação da quantidade de amostra em ensaio de PCR

Inicialmente para determinar a concentração ideal da amostra na mistura reacional e avaliar a resposta dos primers desenvolvidos, foram realizados testes preliminares utilizando amostras previamente confirmadas como positivas para o SARS-CoV-2. Esse ensaio possibilitou verificar a eficiência dos primers diante de quantidade diferente de material genético e possíveis interferentes da reação de PCR (Schrader *et al.*, 2012).

A extração do RNA viral foi realizada utilizando o kit Pi-Clear DNA/RNA viral, seguindo protocolo do fabricante. O mastermix utilizado foi o qPCR-SYBR-Green mix/ROX, da marca Ludwig Biotecnologia. O volume reacional foi 20 µL, contendo 10,0 µL de do master mix, 1,5 µL (400nm) de primer e a amostra extraída variou de 3,0 µL (15 ng) a 5,0 µL (25 ng) da amostra extraída. O volume final foi completado com água disponível do kit. O ciclo térmico foi realizado com um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 1 minuto para desnaturação, 55 °C por 1 minuto para anelamento, 72 °C por 1 minuto para extensão, e finalmente um ciclo de 72 °C por 5 minutos para extensão final. A etapa de *melting* foi realizada a 95 °C por 15 segundos, seguida de 55 °C por um minuto e 95 °C por 15 segundos (dissociação), adaptado do manual do fabricante (LUDWIG, 2023). As amostras foram analisadas em triplicata para cada primer.

Os valores de CT foram comparados entre as diferentes proporções de amostra utilizadas na mistura reacional para determinar a condição ideal. A distribuição dos CT entre as triplicatas foi analisada para verificar a reprodutibilidade dos resultados. Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão e comparados estatisticamente para definir a concentração de amostra mais adequada para o desenvolvimento do kit multiplex.

4.5.2.2 Otimização da concentração de primers na PCR

Para a otimização da concentração de primers em ensaios de PCR, todos os pares de primers foram testados em PCRs singleplex para verificar a amplificação correta dos fragmentos desejados (Sint; Raso; Traugott, 2012). Foi realizada a análise dos primers únicos em concentrações de 100, 200, 400, 600 e 800 nM em sistema SYBR, enquanto a concentração dos demais componentes da reação, (como dNTPs, $MgCl_2$, tampão e enzima polimerase) foi mantida constante, permitindo avaliar a influência da concentração na eficiência de amplificação dos diferentes alvos (Bustin; Huggett, 2017). As reações de PCR foram conduzidas conforme descrito no item 4.4.2.1, com o kit qPCR-SYBR-Green mix/ROX (Ludwig, 2023). Para controle da especificidade e sensibilidade da reação, foram incluídos controles negativos e positivos.

A análise dos produtos amplificados foi realizada por meio das curvas de amplificação em qPCR e valores de CT. A avaliação dos resultados contemplou a verificação da intensidade e uniformidade das bandas ou dos sinais de fluorescência, além da identificação de amplificações inespecíficas e a presença de dímeros de primers, através da análise da curva de *melting*. Com base nos dados obtidos, selecionou-se a condição ótima, na qual todos os alvos amplificaram de maneira equilibrada, garantindo a robustez e a reprodutibilidade do ensaio singleplex.

4.5.2.3 Otimização da relação primer - sonda

Outro passo importante anterior a multiplexação de primers e sondas, é entender o funcionamento de cada par de primer e sua sonda complementar. Para a otimização da relação de primers e sondas em um ensaio de PCR utilizando sondas de hidrólise, do tipo TaqMan, inicialmente, padronizamos a concentração de ácido nucléico na amostra (15 ng). Em seguida, definiu-se um intervalo de concentrações a ser testado para os primers e sondas, variando entre 100 nM e 600 nM para os primers e entre 50 nM e 250 nM para as sondas, mantendo constante a concentração dos demais componentes da reação, como dNTPs, $MgCl_2$, tampão e enzima polimerase (Hulley et al., 2019; Rodríguez *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2024).

O delineamento experimental envolveu a montagem de reações em que as concentrações de primers e sondas foram testadas em diferentes combinações,

permitindo avaliar a relação entre eficiência de amplificação (Hulley *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2024).

Foram selecionadas três amostras correspondentes aos períodos de circulação de cada variante, que foram extraídas com o kit Pi-Clear DNA/RNA viral, conforme protocolo do fabricante. A PCR foi conduzida sob condições de ciclagem previamente estabelecidas no protocolo do Kit iTaq Universal Probes One-Step, incluindo controles negativos e positivos, assegurando a reprodutibilidade dos resultados. A ciclagem da PCR consistiu em uma etapa de transcriptase reversa a 50 °C por 15 minutos, desnaturação da transcriptase reversa a 95 °C por 3 minutos, em seguida 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e anelamento e extensão a 60 °C por 1 minuto. O volume final do mix reacional foi de 20 µL, contendo 3,0 µg de RNA extraído, 0,5 µL de iScript enzyme, 10 µL de 2x iTaq PCR, e a combinação de primers/sondas e água suficiente para completar o volume (Jaeger *et al.*, 2021).

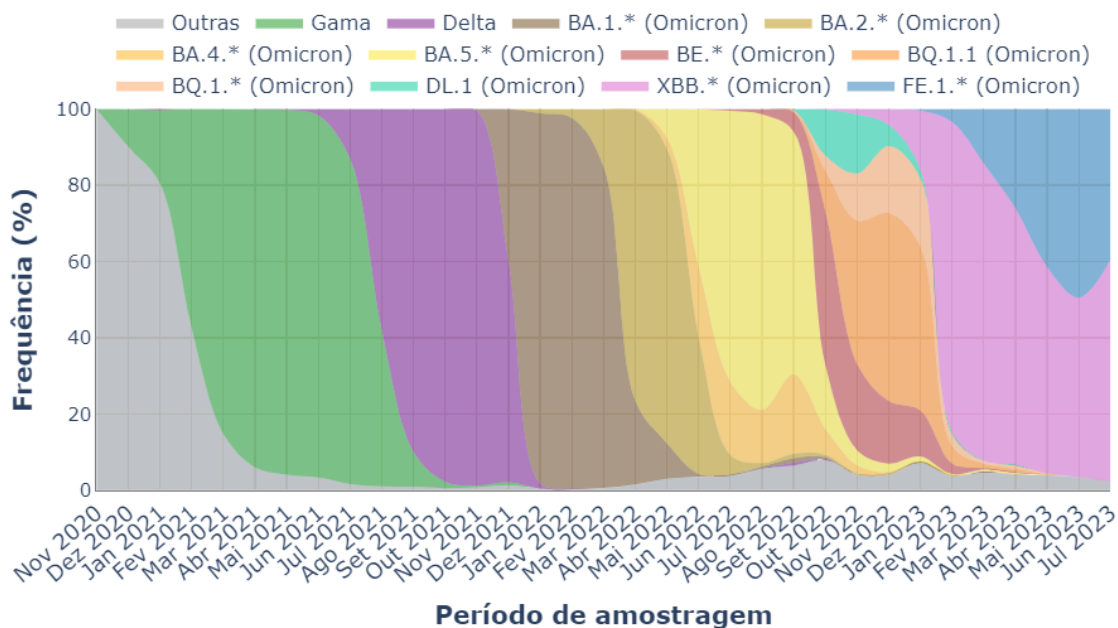
A análise dos dados foi realizada por RT-qPCR, avaliando os valores de CT para cada condição testada. A concentração ótima de primers e sondas foi definida com base na menor variação entre réplicas (triplicata), no menor valor de CT possível para cada alvo e na ausência de amplificação inespecífica.

Com base nos resultados obtidos, selecionou-se a melhor combinação de concentrações, garantindo que todos os alvos fossem amplificados de maneira eficiente e balanceada. Em seguida, foi realizada a multiplexação dos conjuntos de primers e sondas para alvos diferentes (Hulley *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2024).

4.5.2.4 Determinação da especificidade dos primers e sondas desenvolvidos

Para testar se os primers amplificam apenas com as variantes alvo e se eles não reagem de forma cruzada com material genético de outras variantes, verificou-se a especificidade dos primers frente a diferentes variantes do SARS-CoV-2 (Sint; Raso; Traugott, 2012). Foram selecionadas cinco amostras correspondentes a períodos de pico de circulação das respectivas variantes no Brasil. A seleção foi realizada com base em dados epidemiológicos, garantindo que cada variante estivesse representada por amostras de períodos de alta prevalência, conforme **Figura 14**. Sendo assim, foram selecionadas amostras de variante Gama em julho de 2021, amostras de variante Delta em dezembro de 2021 e amostras de variante Ômicron em janeiro de 2022.

Figura 14 – Frequência de circulação das variantes de SARS-CoV-2 no país por período de amostragem.



Fonte: Fiocruz, 2023.

As amostras foram submetidas a extração com o kit Pi-Clear DNA/RNA viral, conforme protocolo do fabricante. A PCR foi conduzida sob condições de ciclagem previamente estabelecidas no protocolo do Kit iTaq Universal Probes One-Step. A ciclagem da PCR consistiu em uma etapa de transcriptase reversa a 50 °C por 15 minutos, desnaturação da transcriptase reversa a 95 °C por 3 minutos, em seguida 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e anelamento e extensão a 60 °C por 1 minuto. O volume final do mix reacional foi de 20 µL, contendo 3,0 µg de RNA extraído, 0,5 µL de iScript enzyme, 10 µL de 2x iTaq PCR, a combinação de primers/sondas em modelo singleplex (nas concentrações determinadas no ensaio 4.4.2.3), e água suficiente para completar o volume (Jaeger *et al.*, 2021).

Foram utilizados controle negativos (água) em todas as reações. Foram selecionadas 3 amostras conhecidamente negativas para SARS-Cov-2 para verificar a sensibilidade dos primers. As curvas de amplificação foram analisadas para determinar a especificidade dos primers. A reatividade cruzada entre variantes foi avaliada, considerando-se ausência de amplificação como critério de especificidade adequada.

4.5.3 Multiplexação do sistema PCR

Para o desenvolvimento do ensaio multiplex para detecção de quatro alvos distintos (RdRp, Delta, Ômicron e Gama) utilizando PCR em tempo real com sondas de hidrólise, tipo TaqMan, foi adotada uma abordagem progressiva de multiplexação, permitindo a otimização individual e combinada dos alvos. Inicialmente, realizou-se a padronização da amplificação em sistema duplex, incluindo apenas os alvos RdRp e Delta.

A otimização iniciou-se com a utilização da melhor concentração de primers e sondas obtida no ensaio descrito no item 4.4.2.4, para o ensaio duplex contendo RdRp e Delta. Dessa forma, foi realizado um ajuste na concentração de primers e sondas para que o sistema funcionasse, com redução de 20% da concentração de primers e sondas pré-determinadas. Após a definição das melhores condições para essa configuração, procedeu-se à adição sequencial dos alvos Ômicron e, por fim, Gama, avaliando-se a eficiência e a robustez do ensaio em cada etapa.

Os testes foram realizados com 30 amostras clínicas conhecidamente positivas para SARS-CoV-2, sendo 10 selecionadas no período de pico de circulação da variante Delta, 10 da variante Gama e 10 da variante Ômicron. As amostras foram extraídas com o kit Pi-Clear DNA/RNA viral, seguindo protocolo do fabricante.

As análises de RT-qPCR foram conduzidas usando o kit iTaq Universal Probes One-Step Kit (Bio-Rad Laboratories) no equipamento CFX-96 (Bio-rad). A ciclagem e condições consistiram em uma etapa de transcriptase reversa a 50 °C por 15 minutos, desnaturação da transcriptase reversa a 95 °C por 3 minutos, em seguida 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e anelamento e extensão a 60 °C por 1 minuto. O volume final do mix reacional foi de 20 µL, contendo 3,0 µL da amostra extraída, 0,5 µL de iScript enzyme, 10 µL de 2x iTaq PCR, e a combinação de primers/sondas e água (para Delta: 480 nM da mistura de primers R e F e 160 nM de sonda; para RdRp: 80 nM da mistura de primers R e F e 40 nM de sonda; para Ômicron: 480 nM da mistura de primers R e F e 160 nM de sonda; para Gama: 160 nM da mistura de primers R e F e 200 nM de sonda) (Jaeger *et al.*, 2021).

A análise dos resultados foi realizada com base nos valores de CT obtidos para cada condição testada. O critério para seleção da melhor condição foi a obtenção dos menores valores de CT com amplificação entre as amostras clínicas e ausência de amplificação inespecífica.

4.5.3.1 Determinação do limite de detecção

Para avaliação do limite de detecção dos alvos específicos para as variantes do SARS-CoV-2, optou-se pela utilização de amostras clínicas reais, previamente confirmadas como positivas durante os períodos de circulação predominante das respectivas variantes (Delta, Gama e Ômicron). Essa escolha se justifica pelo fato de os primers e sondas utilizados serem altamente específicos para mutações presentes nessas linhagens, o que inviabiliza o uso de controles positivos genéricos ou sintéticos.

Inicialmente foi feita uma curva padrão a partir do controle positivo validado (2019-ncov_n_positive control, IDT) e do kit do Allplex™ SARS-CoV-2 (Seegene). O ensaio com Allplex™ SARS-CoV-2 Kit (Seegene) utilizou um volume reacional de 20 µL, contendo 5,0 µL de mix enzimático (EM8), 5,0 µL da mistura de oligo mix (MOM), o padrão diluído (2×10^5 a 2×10^0 cópias/µL) e água livre de nucleases (suficiente para completar 20,0 µL). O ciclo térmico foi realizado com 55°C por 20 minutos para transcrição reversa, seguido de 95°C por 15 minutos, e então 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 58°C por 30 segundos (Seegene, 2020). Com os valores de CT obtidos, foi gerada uma regressão linear, permitindo a interpolação da carga viral das amostras clínicas selecionadas com base nos respectivos CTs.

As amostras com concentrações de 10^4 cópias/µL foram selecionadas como base para a construção da curva padrão dos ensaios de limite de detecção dos alvos. A partir dessas amostras, realizaram-se diluições seriadas (10^4 a 10^{-10} cópias/µL), que foram então submetidas à análise por RT-qPCR, em triplicata, com o uso dos oligonucleotídeos específicos para cada variante. Controles negativos foram incluídos em todas as reações a fim de assegurar a especificidade e excluir possíveis contaminações (Hulley *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2024). Para a determinação dos limites de detecção dos primers e sondas desenvolvidos, foi utilizado o kit iTaq Universal Probes One-Step (Bio-Rad Laboratories). A ciclagem e condições consistiram em uma etapa de transcriptase reversa a 50 °C por 15 minutos, desnaturação da transcriptase reversa a 95 °C por 3 minutos, em seguida 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e anelamento e extensão a 60 °C por 1 minuto. O volume final do mix reacional foi de 20 µL, contendo 3,0 µL de RNA extraído (10^4 a 10^{-10} cópias/µL), 0,5 µL de iScript enzyme, 10 µL de 2x iTaq PCR, e a combinação de primers/sondas (definidas no item 4.4.3) e água para completar o volume (Jaeger *et al.*, 2021).

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente pelo software GraphPad InStat 7.0. A análise entre grupos foi realizada pela análise de quartis, de variância (ANOVA) e as diferenças entre dois tratamentos foram pelo teste T-Student. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão (DP).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESENVOLVIMENTO DE REAGENTE DE EXTRAÇÃO RÁPIDA DE ÁCIDOS NUCLEICOS

5.1.1 Formulação do reagente de extração rápida de ácidos nucleicos

Foi obtida uma formulação final, estável em pH 4,6, sem precipitação de materiais particulados, de coloração marrom (o que facilita a visualização no momento do uso), límpida (**Figura 15**).

Figura 15 - Produto de extração rápida de ácidos nucleicos desenvolvido.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

5.1.2 Desenvolvimento e validação de protocolo para extração com reagente de extração rápida

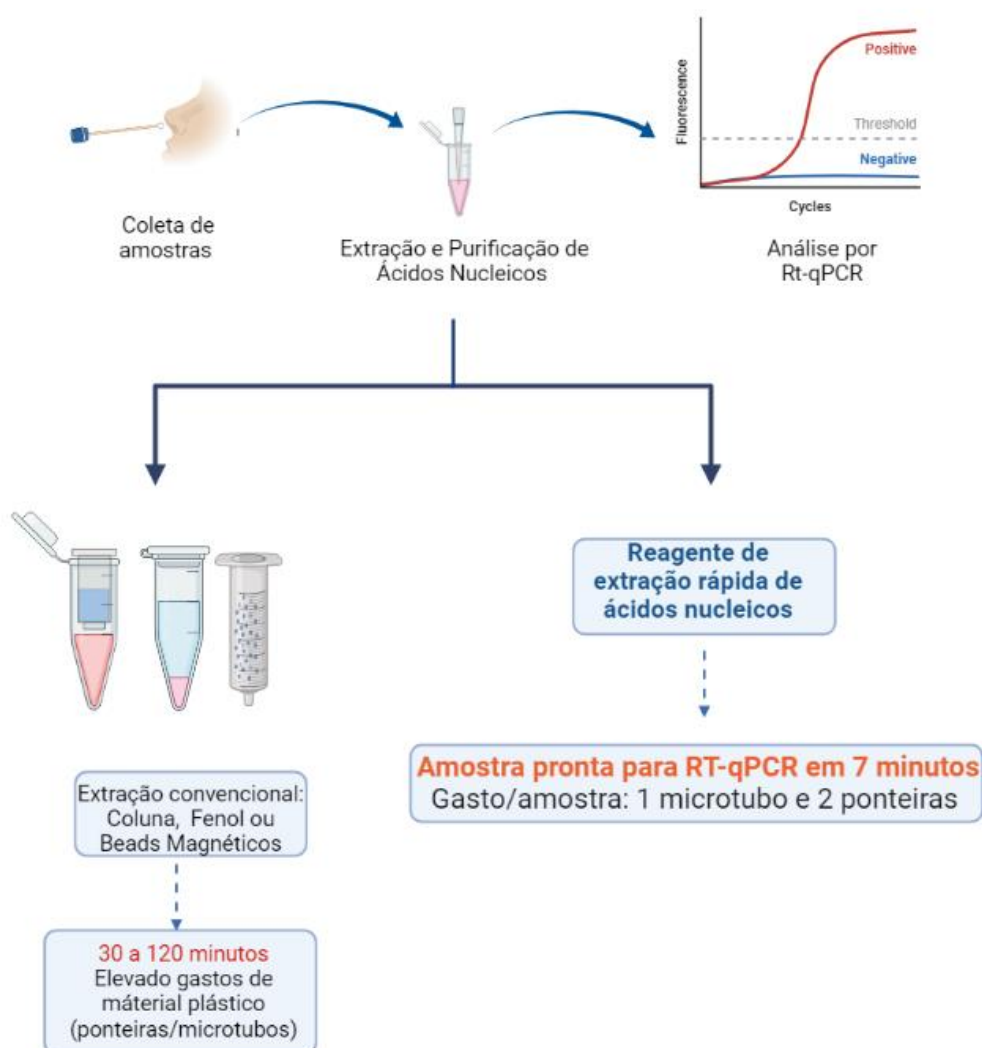
A detecção precoce, rápida e precisa de doenças é crucial para maximizar a eficiência do gerenciamento de crises, os resultados do tratamento e a estabilidade econômica. Dentre as etapas necessárias para a realização de

testes moleculares de diagnóstico, a extração de ácidos continua sendo um dos principais desafios. Em geral, é um processo demorado e de várias etapas, que requer laboratórios bem equipados e pessoal de laboratório qualificado. Outro fator agravante dessa etapa, é que o intenso fluxo de trabalho de extração pode ser um grande problema de desgaste operacional, em especial para ambientes com recursos limitados, que possuem a etapa de extração totalmente manual. Por isso, o desenvolvimento de técnicas de extração de ácido nucleico mais simples e que permitam melhorar a velocidade de testagem, são muito importantes (Chua *et al.*, 2015; Paul, Ostermann; Wei, 2020).

5.1.2.1 Desenvolvimento e validação de protocolo para amostras de SARS-CoV-2

A metodologia desenvolvida para a extração de ácidos nucleicos para amostras de SARS-CoV-2 promove a extração de ácidos nucleicos em apenas 7 minutos. Através da extração com o reagente, foi possível obter material extraído com grande economia de produtos plásticos (ponteiras e microtubos) e em curto tempo. Geralmente, técnicas convencionais de extração, como colunas de sílica e solventes fenólicos, necessitam de um grande tempo de operação das amostras (cerca de 30 a 120 minutos/amostra), ocasionando maiores chances de contaminação e degradação do material genético (Ali *et al.*, 2017; Dundas *et al.*, 2008). Além disso, essas técnicas geram grandes quantidades de resíduos químicos e plásticos. Assim, a obtenção de ácidos nucleicos em curto tempo e com menor gasto de material plástico é um grande ganho para a área da biologia molecular, uma vez que impacta em redução de custos, celeridade de resultados e maior segurança da qualidade das amostras, devido a sua menor manipulação. Para a extração de amostras de SARS-CoV-2, provenientes de swabs de nasofaringe, swabs de orofaringe, saliva ou aspirado traqueal, com a utilização do reagente de extração rápida de ácidos nucleicos, foram utilizados apenas 1 microtubo e 2 ponteiras por amostra (**Figura 16**).

Figura 16 - Comparativo de extração entre reagente de extração rápida de ácidos nucleicos e métodos convencionais de extração.

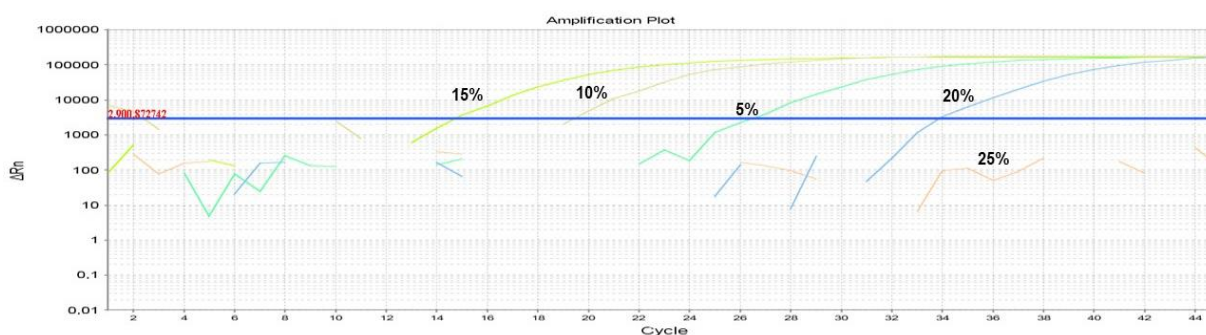


Fonte: Elaborado pela autora (2023) – BioRender.

Como a extração com o reagente desenvolvido não envolve etapas de purificação do material genético, a quantificação correta do RNA extraído utilizando espectrometria de luz torna-se inviável. Isto ocorre pois todos os constituintes do reagente e celulares da amostra continuam presentes na alíquota e podem interferir nos valores de absorção de luz UV, causando interpretações equivocadas sobre a quantidade e qualidade de material genético disponível (Ali *et al.*, 2017). Por isso, foi necessário realizar uma curva para determinar qual a quantidade de amostra poderia ser adicionada ao mix reacional, sem provocar inibição da reação. De acordo com Schrader e

colaboradores (2012), vários constituintes celulares e da amostra, como muco e carboidratos, além do excesso de material genético, que podem estar presentes na amostra analisada, podem afetar a sensibilidade do ensaio ou mesmo levar a resultados falso-negativos. Assim, para definir o percentual de amostra a ser utilizado no mix foi realizada curva de análise com 5 a 25 % de material extraído, em volume final de reação de 100% (**Figura 17**).

Figura 17 - Curva para determinação de quantitativo de amostra no mix reacional, com análise do gene N, com kit Allplex (Seegene).



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Conforme os resultados obtidos, foi determinado que o valor ótimo de amostra extraída no mix, seria de 15%, ou seja, 3,0 µL de amostra extraída em 20µL de mix total. Em valores abaixo de 15% também foi possível obter a detecção do Gene N, mas com CT um pouco maior. No caso de amostras com baixa carga viral, que possuem um CT elevado, característico de início ou final de infecção pelo SARS-CoV-2, a utilização de percentual menor de amostra extraída pode acarretar resultados falsos negativos. Já para valores acima de 15%, foi observado uma inibição da reação, aumentando ainda mais o CT e inviabilizando a análise. Desta forma, a otimização da reação é essencial para determinar a condição ótima de reação da PCR.

O desenvolvimento do protocolo de extração rápida para amostras de SARS-CoV-2 comparou o resultado obtido de 50 amostras extraídas com o reagente de extração desenvolvido, coluna de sílica (PureLink RNA mini Kit) e com o QuickExtract RNA Extraction Solution, detectados com kit multiplex Allplex SARS-CoV-2 (Seegene). Os resultados obtidos estão listados na **tabela 3**, e

mostraram 100% de compatibilidade com os resultados originais emitidos após a primeira análise para diagnóstico.

Tabela 3 - Resultados de RT-qPCR de reações realizadas com kit Allplex após extração com reagente desenvolvido, QuickExtract e coluna de sílica.

Amostra	Meio de transporte	Extração	CT Gene N	CT Gene E	CT Gene RdRp	Resultado
1	MTV	Reagente	22.8	21.7	26.9	Detectado
		QuickExtract	23.2	20.1	25.9	Detectado
		Coluna	22.2	19.3	20.8	Detectado
2	MTV	Reagente	26.2	28.5	28.4	Detectado
		QuickExtract	26.9	24.8	30.4	Detectado
		Coluna	27.9	24.6	26.7	Detectado
3	MTV	Reagente	24.9	23.5	27.6	Detectado
		QuickExtract	26.0	22.2	28.3	Detectado
		Coluna	26.0	24.0	26.0	Detectado
4	MTV	Reagente	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		QuickExtract	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		Coluna	N.D	N.D	N.D	Não detectado
5	MTV	Reagente	26.0	28.2	28.6	Detectado
		QuickExtract	27.3	25.0	31.6	Detectado
		Coluna	28.3	24.9	26.7	Detectado
6	MTV	Reagente	25.2	24.0	29.9	Detectado
		QuickExtract	25.9	23.0	29.1	Detectado
		Coluna	26.1	23.3	25.4	Detectado
7	MTV	Reagente	30.4	32.1	32.6	Detectado
		QuickExtract	31.8	29.4	39.0	Detectado
		Coluna	32.6	29.5	31.4	Detectado
8	MTV	Reagente	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		QuickExtract	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		Coluna	N.D	N.D	N.D	Não detectado
9	MTV	Reagente	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		QuickExtract	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		Coluna	N.D	N.D	N.D	Não detectado
10	MTV	Reagente	21.0	23.8	23.5	Detectado
		QuickExtract	20.9	19.9	25.3	Detectado
		Coluna	23.2	19.8	21.6	Detectado
11	MTV	Reagente	25.5	28.7	29.3	Detectado
		QuickExtract	26.0	24.6	30.4	Detectado
		Coluna	26.5	23.5	25.9	Detectado
12	MTV	Reagente	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		QuickExtract	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		Coluna	N.D	N.D	N.D	Não detectado
13	MTV	Reagente	24.7	28.4	29.6	Detectado
		QuickExtract	24.7	24.2	30.2	Detectado
		Coluna	26.4	24.2	26.7	Detectado

14	MTV	Reagente	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		QuickExtract	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		Coluna	N.D	N.D	N.D	Não detectado
15	MTV	Reagente	28.6	27.9	32.4	Detectado
		QuickExtract	29.6	25.7	33.0	Detectado
		Coluna	31.0	28.2	31.0	Detectado
16	MTV	Reagente	14.4	13.6	26.3	Detectado
		QuickExtract	20.0	13.3	25.7	Detectado
		Coluna	22.0	19.8	21.5	Detectado
17	MTV	Reagente	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		QuickExtract	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		Coluna	N.D	N.D	N.D	Não detectado
18	MTV	Reagente	29.1	32.4	33.7	Detectado
		QuickExtract	33.2	32.5	41.7	Detectado
		Coluna	30.5	28.3	30.6	Detectado
19	MTV	Reagente	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		QuickExtract	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		Coluna	N.D	N.D	N.D	Não detectado
20	MTV	Reagente	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		QuickExtract	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		Coluna	N.D	N.D	N.D	Não detectado
21	MTV	Reagente	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		QuickExtract	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		Coluna	N.D	N.D	N.D	Não detectado
22	MTV	Reagente	18.0	21.7	26.2	Detectado
		QuickExtract	20.6	19.9	26.2	Detectado
		Coluna	16.6	15.9	17.8	Detectado
23	MTV	Reagente	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		QuickExtract	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		Coluna	N.D	N.D	N.D	Não detectado
24	MTV	Reagente	24.0	26.2	27.2	Detectado
		QuickExtract	24.5	23.7	27.8	Detectado
		Coluna	27.5	24.8	26.8	Detectado
25	MTV	Reagente	27.4	29.6	30.1	Detectado
		QuickExtract	28.3	26.7	31.5	Detectado
		Coluna	30.4	27.2	29.1	Detectado
26	MTV	Reagente	28.5	30.8	31.4	Detectado
		QuickExtract	30.3	29.3	36.7	Detectado
		Coluna	32.6	19.4	31.4	Detectado
27	MTV	Reagente	21.6	22.2	22.5	Detectado
		QuickExtract	21.4	21.8	22.6	Detectado
		Coluna	24.1	20.7	22.7	Detectado
28	MTV	Reagente	22.6	25.3	25.5	Detectado
		QuickExtract	22.5	21.3	26.2	Detectado
		Coluna	24.3	20.8	22.3	Detectado
29	MTV	Reagente	22.9	23.9	26.2	Detectado
		QuickExtract	23.0	21.2	26.3	Detectado
		Coluna	24.0	21.8	23.5	Detectado

30	MTV	Reagente	19.7	21.1	22.1	Detectado
		QuickExtract	18.2	16.9	21.0	Detectado
		Coluna	22.4	21.1	22.2	Detectado
31	MTV	Reagente	24.0	29.2	23.8	Detectado
		QuickExtract	22.3	23.0	26.9	Detectado
		Coluna	23.2	19.5	21.3	Detectado
32	MTV	Reagente	21.2	25.9	19.5	Detectado
		QuickExtract	18.4	18.1	23.3	Detectado
		Coluna	19.1	16.1	17.1	Detectado
33	MTV	Reagente	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		QuickExtract	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		Coluna	N.D	N.D	N.D	Não detectado
34	MTV	Reagente	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		QuickExtract	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		Coluna	N.D	N.D	N.D	Não detectado
35	MTV	Reagente	23.5	28.5	22.5	Detectado
		QuickExtract	21.0	21.1	26.6	Detectado
		Coluna	21.4	19.0	20.0	Detectado
36	MTV	Reagente	28.2	28.8	31.2	Detectado
		QuickExtract	28.9	28.9	32.5	Detectado
		Coluna	30.6	28.2	30.0	Detectado
37	MTV	Reagente	31.6	34.0	36.2	Detectado
		QuickExtract	33.5	31.9	N.D	Detectado
		Coluna	39.0	38.6	N.D	Detectado
38	MTV	Reagente	29.9	34.5	33.4	Detectado
		QuickExtract	29.4	28.2	37.0	Detectado
		Coluna	29.8	26.7	28.8	Detectado
39	MTV	Reagente	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		QuickExtract	41.5	N.D	N.D	Não detectado
		Coluna	N.D	N.D	N.D	Não detectado
40	MTV	Reagente	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		QuickExtract	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		Coluna	N.D	N.D	N.D	Não detectado
41	MTV	Reagente	41.8	N.D	N.D	Não detectado
		QuickExtract	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		Coluna	N.D	N.D	N.D	Não detectado
42	MTV	Reagente	30.9	31.6	38.2	Detectado
		QuickExtract	30.8	27.9	40.5	Detectado
		Coluna	28.5	25.7	27.8	Detectado
43	MTV	Reagente	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		QuickExtract	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		Coluna	N.D	N.D	N.D	Não detectado
44	MTV	Reagente	23.7	23.4	28.1	Detectado
		QuickExtract	24.2	20.9	27.4	Detectado
		Coluna	22.4	21.1	22.2	Detectado
45	Salina	Reagente	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		QuickExtract	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		Coluna	N.D	N.D	N.D	Não detectado

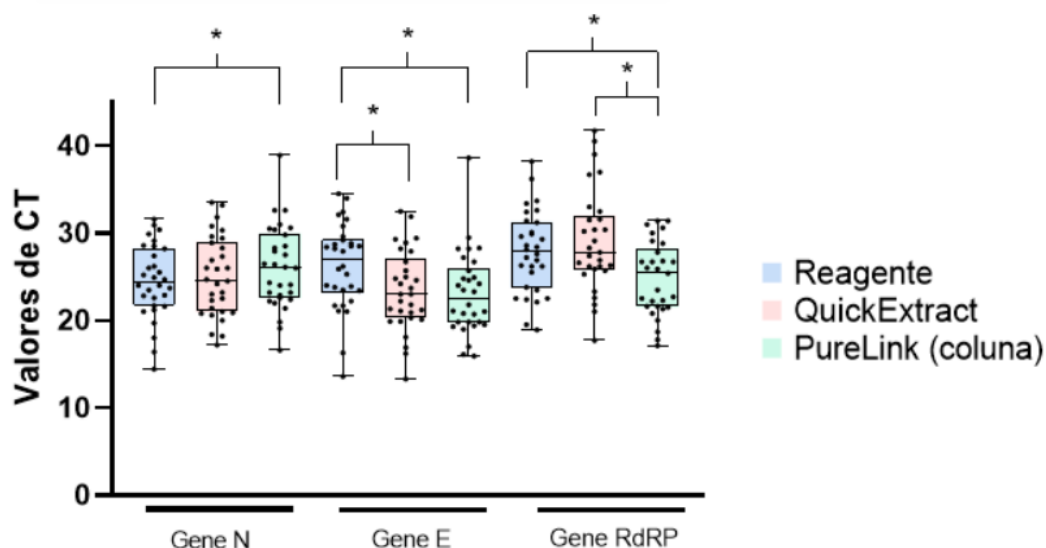
46	Salina	Reagente	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		QuickExtract	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		Coluna	N.D	N.D	N.D	Não detectado
47	Salina	Reagente	16.4	16.3	18.9	Detectado
		QuickExtract	17.2	16.2	17.7	Detectado
		Coluna	19.8	17.0	18.7	Detectado
48	Aspirado traqueal	Reagente	21.7	21.0	22.4	Detectado
		QuickExtract	20.8	20.3	21.8	Detectado
		Coluna	22.6	19.8	21.6	Detectado
49	Aspirado traqueal	Reagente	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		QuickExtract	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		Coluna	N.D	N.D	N.D	Não detectado
50	Aspirado traqueal	Reagente	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		QuickExtract	N.D	N.D	N.D	Não detectado
		Coluna	N.D	N.D	N.D	Não detectado

Onde, CT RT-qPCR = Cycle threshold; N. D. = Não Detectado. MTV = Meio de transporte viral

Os valores de CT para o gene N foram semelhantes na maioria das amostras, sem variações estatísticas entre a média dos valores entre os diferentes métodos de extração. Para a análise do gene E, QuickExtract apresentou valores de CT menores com diferença significativa ($p < 0,05$), quando comparado com o reagente desenvolvido. Para o gene RdRp, não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias CT valores obtidos com o reagente desenvolvido e QuickExtract (**Figura 18**). Os resultados obtidos mostraram que o reagente foi eficaz no fornecimento de ácido nucleico de amostras em diferentes meios testados. A detecção dos genes N, E e RdRp foi viável em amostras biológicas independentemente do meio de transporte utilizado (meio de transporte viral, solução salina e amostras clínicas de aspirado traqueal). A extração em matrizes salinas e aspirado traqueal mostra que o reagente é capaz de gerar resultados satisfatórios em matrizes simples e complexas.

Além disso, a análise individual das amostras, revelou que o reagente permitiu a detecção de amostras com CT alto e baixo, indicando que não interfere na detecção, mesmo de cargas virais baixas. Em um estudo de Komiazyk *et al.* (2021), a dificuldade em extrair RNA de amostras com baixa carga viral foi relatada, em especial, devido a dificuldades operacionais na extração convencional por coluna ou solventes orgânicos.

Figura 18 - Valores de CT obtidos para os genes N, E e RdRp em ensaio multiplex de RT-qPCR após extração com o reagente desenvolvido, QuickExtract e coluna.



Onde: O gráfico é apresentado como valores individuais de CT, a média e a dispersão (valores de CT mais altos e mais baixos). A análise estatística foi realizada para média, onde * indica $p < 0,05$. Equipamento utilizado: 7500 Fast Real-Time PCR (Thermo Scientific).

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

Com base nos valores de CT obtidos, o reagente de extração apresentou resultados semelhantes diferentes estatisticamente quando comparados com a coluna para todos os genes. Esse resultado condiz com o esperado, uma vez que é a comparação de técnicas de extração diferentes, além de amostras com pureza distintas. Em relação à comparação aos dois reagentes de extração rápida, houve diferença estatística somente para a análise do gene E, mas não houve diferença estatística para os genes N e RdRp.

O gene N faz parte do nucleocapsídeo viral e tem sido relatado como sequência gênica viral, altamente conservada. Além disso, estudos anteriores usando o gene N foram mais sensíveis do que aqueles usando outros genes (Li; Zhang; Li, 2020). Portanto, a semelhança nos valores obtidos demonstra que o reagente não interfere na reação enzimática com o gene N, validando o uso do reagente para os kits de detecção que compreendem o gene N, com base na reação de sondas de hidrólise.

Por outro lado, os resultados sugerem uma leve diminuição da sensibilidade na detecção do gene E quando se utiliza o reagente desenvolvido, em comparação com o QuickExtract. Os valores de CT para o gene E foram significativamente mais altos com o novo reagente, embora não tenham ocorrido falha na detecção em nenhuma das amostras analisadas. O gene E, que codifica a proteína do envelope viral, é menos conservado do que o gene N e pode apresentar maior variabilidade entre cepas (Ali *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020). Além disso, a região alvo utilizada nos ensaios de RT-qPCR pode ser mais suscetível a interferências na reação de transcrição reversa ou amplificação. A diferença observada nos CTs pode, portanto, estar relacionada à presença de componentes na formulação do reagente que promovem uma leve inibição enzimática ou à menor eficiência de extração para essa região específica do RNA viral. Ainda assim, como todas as amostras esperadas foram detectadas, a sensibilidade do reagente permanece adequada para fins diagnósticos.

Além da análise em multiplex, o reagente foi avaliado também na detecção de SARS-CoV-2 utilizando kits singleplex: iTaq Universal Probes One-Step Kit e 2019-nCoV. Os resultados (**Tabela 4**) mostram que não houve diferença significativa no resultado quando as amostras foram processadas com o reagente desenvolvido ou QuickExtract. Em comparação específica com o QuickExtract, um reagente comercial usado também para extração rápida, é possível observar que não houve diferença estatística nas médias de detecção de todos os genes testados, conforme mostra a **Figura 19**. O alvo do gene RNaseP apresentou média maior nos valores de CT quando comparado com os alvos do gene N, o que pode ser devido à diferença e dificuldade de coleta do material, uma vez o alvo corresponde a um gene endógeno humano.

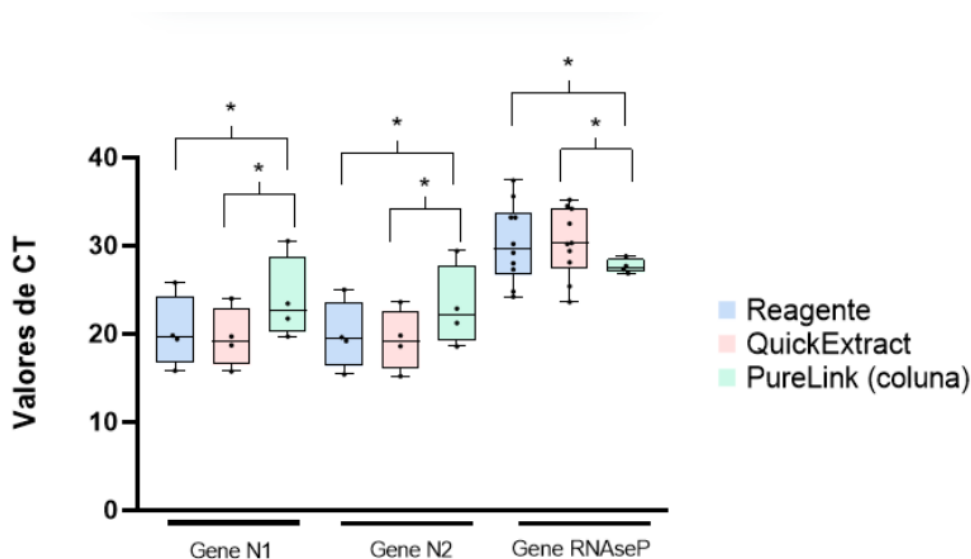
Os resultados indicam que o reagente desenvolvido foi eficaz para extrair ácidos nucleicos de diferentes meios. Nas reações singleplex, o painel de primers utilizado foi proveniente do CDC/US, que possui os genes N1 e N2, específicos para SARS-CoV-2 e o gene RNaseP, como controle endógeno (CDC, 2019). O SARS-CoV-2 foi identificado em 40% das amostras de diversas matrizes biológicas e foi 100% compatível com os resultados originais emitidos para diagnóstico.

Tabela 4 - Resultados de RT-qPCR de reações realizadas com kit singleplex após extração com reagente desenvolvido, QuickExtract e coluna de sílica.

Amostra	Médio de transporte	Extração	CT Gene N1	CT Gene N2	CT Gene RNaseP	Resultado
1	MTV	Reagente	19.4	19.2	35.6	Detectado
		QuickExtract	19.7	19.8	25.4	Detectado
		Coluna	23.5	22.9	26.9	Detectado
2	MTV	Reagente	25.8	25.0	37.4	Detectado
		QuickExtract	24.0	23.6	28.1	Detectado
		Coluna	30.6	29.4	28.8	Detectado
3	MTV	Reagente	N. D.	N. D.	27.3	Não Detectado
		QuickExtract	N. D.	N. D.	34.5	Não Detectado
		Coluna	N. D.	N. D.	28.6	Não Detectado
4	MTV	Reagente	N. D.	N. D.	28.0	Não Detectado
		QuickExtract	N. D.	N. D.	34.2	Não Detectado
		Coluna	N. D.	N. D.	28.8	Não Detectado
5	Salina	Reagente	N. D.	N. D.	30.2	Não Detectado
		QuickExtract	N. D.	N. D.	35.2	Não Detectado
		Coluna	N. D.	N. D.	28.4	Não Detectado
6	Salina	Reagente	N. D.	N. D.	29.2	Não Detectado
		QuickExtract	N. D.	N. D.	30.3	Não Detectado
		Coluna	N. D.	N. D.	28.7	Não Detectado
7	Salina	Reagente	15.8	15.4	33.2	Detectado
		QuickExtract	15.8	15.2	29.4	Detectado
		Coluna	19.7	18.6	27.7	Detectado
8	Aspirado Traqueal	Reagente	19.8	19.6	33.2	Detectado
		QuickExtract	18.7	18.6	23.6	Detectado
		Coluna	21.8	21.3	27.3	Detectado
9	Aspirado Traqueal	Reagente	N. D.	N. D.	24.8	Não Detectado
		QuickExtract	N. D.	N. D.	32.5	Não Detectado
		Coluna	N. D.	N. D.	26.8	Não Detectado
10	Aspirado Traqueal	Reagente	N. D.	N. D.	24.2	Não Detectado
		QuickExtract	N. D.	N. D.	30.2	Não Detectado
		Coluna	N. D.	N. D.	26.4	Não Detectado

Onde, CT RT-qPCR = Cycle threshold; N. D. = Não Detectado. MTV = Meio de transporte viral

Figura 19 - Valores de CT obtidos para os genes N1, N2 e RNaseP em ensaio singleplex de RT-qPCR após extração com o reagente desenvolvido, QuickExtract e coluna.



Onde: O gráfico é apresentado como valores individuais de CT, a média e a dispersão (valores de Ct mais altos e mais baixos). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os reagentes. Equipamento utilizado: QuantStudio 03 (Thermo Fisher Scientific).

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

Assim, o protocolo para uso do reagente de extração rápida foi validado para amostras de SARS-CoV-2, em diferentes matrizes biológicas, com diferentes kits de detecção e equipamentos. Os resultados obtidos demonstram que o reagente desenvolvido permite a extração de ácidos nucleicos de amostras para análise qualitativa por RT-qPCR, fornecendo resultados estatisticamente semelhantes aos obtidos com tecnologia de coluna de sílica, uma técnica com maior geração de resíduos, maior custo e mais demorada.

A comparação com o QuickExtract e validação do reagente para amostras de SARS-CoV-2 gerou a publicação de um artigo intitulado “*Comparison of Rapid Nucleic Acid Extraction Methods for SARS-CoV-2 Detection by RT-qPCR*”, publicado no periódico *Diagnostics*, volume 12, em 2022 (**Anexo A**). Posteriormente, o reagente também foi avaliado frente a diferentes variantes de SARS-CoV-2, gerando a publicação de artigo intitulado “*The Influence of the Omicron Variant on RNA Extraction and RT-qPCR Detection of SARS-CoV-2 in*

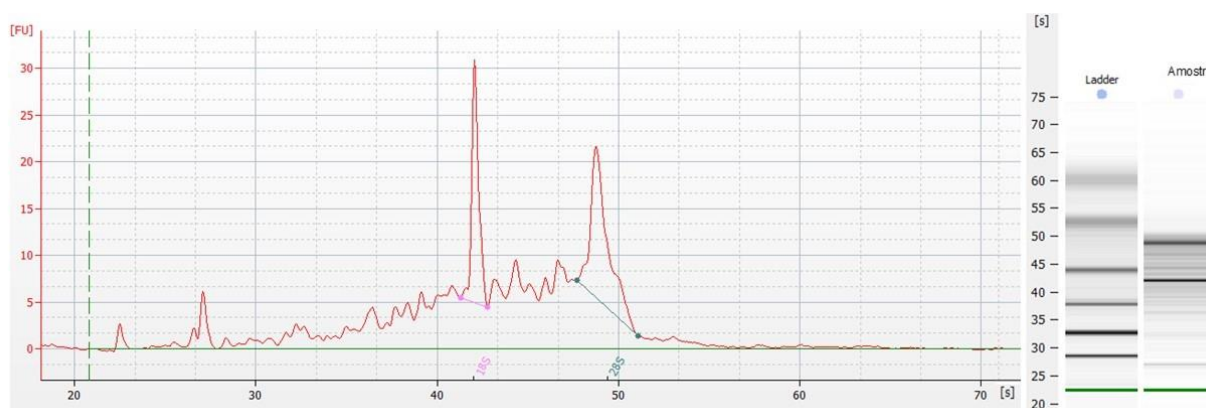
a *Laboratory in Brazil*", publicado no período Viruses, volume 15, em 2023 (Anexo B).

5.1.2.2 Análise da integridade do RNA extraído utilizando o reagente desenvolvido

A análise da integridade do RNA é uma etapa essencial para garantir a confiabilidade de testes moleculares, especialmente quando se utiliza material biológico de difícil manipulação, como o swab nasal. Neste estudo, avaliou-se a qualidade do RNA extraído de amostras de swab nasal por dois métodos distintos: um método de extração e purificação por coluna de sílica (kit Pi-Clear DNA/RNA Viral – Pi-Biotech Genética Avançada) e o reagente de extração rápida desenvolvido. A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese capilar no sistema Agilent Bioanalyzer.

As amostras extraídas com coluna de sílica apresentaram um RIN de 6,5, com presença de picos compatíveis com os RNAs ribossômicos 18S e 28S (**Figura 20**), ainda que com indícios de degradação parcial. Considerando-se a natureza da amostra (secreção nasal), onde é comum a presença de RNases e baixa quantidade de RNA total, esse valor é compatível com o esperado para amostras clínicas e considerado adequado para aplicações como RT-qPCR (Fleige; Pfaffl, 2006; Schroeder *et al.*, 2006).

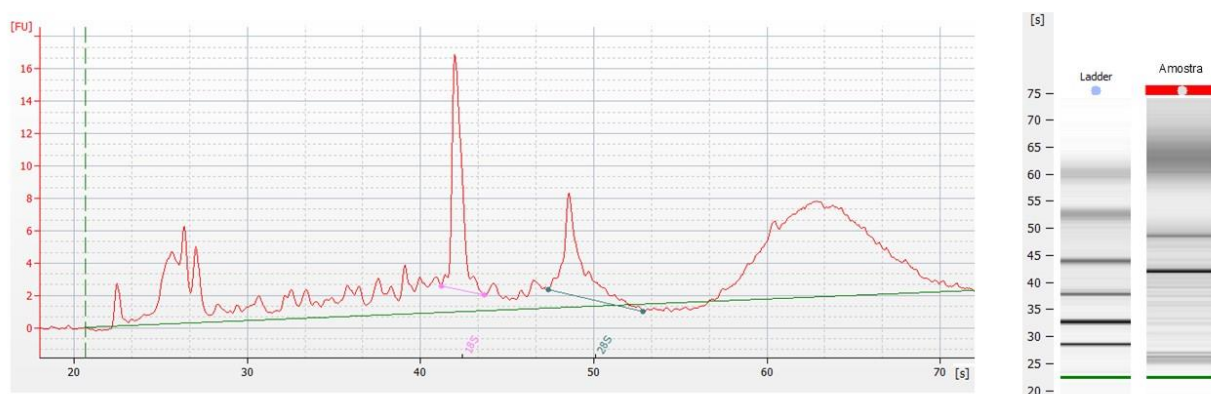
Figura 20 – Eletrograma de RNA oriundo de amostras de swab nasal extraídas com kit de coluna.



Fonte: Elaborado pela autora (2025). – Bioanalyzer 2100.

Já as amostras extraídas com o reagente desenvolvido apresentaram eletrogramas com boa definição dos picos ribossômicos. Contudo, o equipamento não conseguiu calcular automaticamente o RIN, o que pode ocorrer quando a concentração do RNA está abaixo do limite de detecção do Bioanalyzer, quando há ausência de rRNA eucarioto (como em casos de predominância de RNA viral), ou ainda por perfis atípicos de eletroforese (Agilent, 2016; Imbeaud *et al.*, 2005). De fato, o perfil de eletroforese observado indica a presença de banda com peso molecular alto, sugerindo presença de moléculas maiores. A extração rápida permite a exposição do material para análises subsequentes. No entanto, é sabido que o material não é purificado, contendo moléculas biológicas que podem interferir na análise como observado. Dessa forma, o perfil indica a presença de RNA 18S e 28S íntegro, sugerindo RNA com boa integridade (**Figura 21**).

Figura 21 – Eletrograma de RNA oriundo de amostras de swab nasal extraídas com reagente desenvolvido.



Fonte: Elaborado pela autora (2025). – Bioanalyzer 2100.

Alguns estudos mostram que, em amostras com baixa complexidade celular ou com alto risco de degradação, como secreções, o número de integridade do RNA (RIN) pode não ser um indicador confiável da qualidade do RNA. Nesses casos, a análise visual dos eletrogramas pode ser uma abordagem mais adequada para avaliar a integridade do RNA. Apesar da ausência do RIN automático, a análise visual dos eletrogramas indica que o RNA extraído com o

reagente apresenta integridade molecular e pequena degradação, sendo, portanto, funcional para aplicações como RT-qPCR viral (Al-Adsani *et al.*, 2022).

Assim, conclui-se que o reagente desenvolvido se mostrou eficaz na preservação do RNA extraído de swab nasal, fornecendo material de qualidade compatível com técnicas moleculares de diagnóstico, mesmo em condições desafiadoras de coleta e processamento.

5.1.2.3 Desenvolvimento de protocolo de extração para amostras de sangue total

A extração de ácidos nucleicos de amostras provenientes de sangue total com o reagente desenvolvido revelou pontos importantes, como a necessidade de ajuste na proporção reacional entre amostra biológica e reagente. Após a lise térmica, o sangue tornou-se marrom escuro devido à degradação da hemoglobina e oxidação do ferro (Sidstedt *et al.*, 2018). Assim, o material torna-se mais denso e gelatinoso, dificultando a pipetagem. Quando utilizado a razão de 1:1 para extração, o volume disponível para utilização foi pequeno devido a quantidade de material precipitado, podendo ocasionar dificuldades de operação. Por isso, foi realizada a lise com razão de 1:1,5 (amostra:reagente de extração) e foi obtido material suficiente para as análises de PCR (**Figura 22**). Outro fator importante é que, devido a quantidade de material sólido, o tempo do *quick spin* após resfriamento da amostra, deve ser suficiente para que todo material particulado precipite.

Figura 22 - Amostra de sangue total após extração de ácidos nucleicos, utilizando o reagente desenvolvido na proporção de 1:1,5.

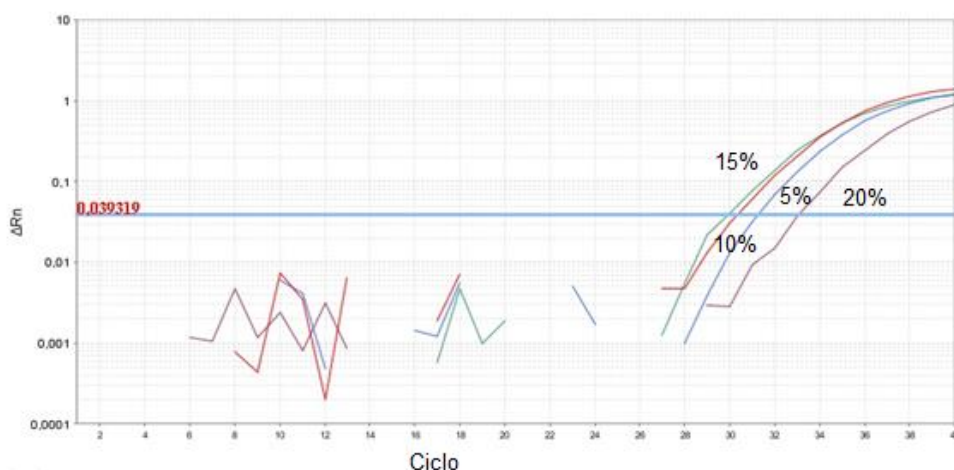


Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A RNaseP, cujo gene foi avaliado nesse experimento, é uma enzima endonuclease encontrada em células de todos os três reinos da vida, que catalisa a maturação da extremidade 5' dos RNAs de transferência (tRNA) e mantém a viabilidade celular. Portanto, é um gene muito comum e bem expresso nas células humanas (Lundblad; Altman, 2010). Na curva obtida (**Figura 23**) para determinação da quantidade de amostra permitida no mix reacional, revelou que a concentração de 15% (3,0 µL de amostra em 20,0 µL de mix) é a mais adequada para a análise de sangue total, no que se refere a detecção de genes endógenos.

A análise dos CTs obtidos na triplicata não revelou diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$), mas considerando que a cada ciclo a quantidade de cópias de DNA possui crescimento exponencial (2^n) (Rodríguez-Lázaro; Hernández, 2013), a diferença entre as análises deve ser avaliada. Para as amostras contendo 5% de amostra extraída, obteve-se valor médio de CT de $31,77 \pm 2,08$. Para 10%, 15% e 20%, os valores médios de CT foram $31,98 \pm 0,82$, $31,12 \pm 1,52$, e $33,92 \pm 1,63$, respectivamente.

Figura 23 - Curva de detecção de RNaseP, com diferentes concentrações de amostra (5 a 20%) no mix reacional, após extração utilizando o reagente desenvolvido na proporção de 1:1,5.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Com a adição de 20% de amostra extraída no mix reacional, é possível notar um aumento de 2 CT médios, indicando possível inibição parcial da reação.

Tal fato pode ocorrer devido a presença de constituintes inibidores da reação de PCR no material lisado, como a hemoglobina, presente em grande quantidade no sangue total (Schrader *et al.*, 2012). Essa pequena inibição poderia ser corrigida com uma etapa adicional de diluição prévia das amostras. Já para as análises contendo 5 a 15% de amostra extraída no mix reacional, não foi observada variação impactante em relação aos valores de CT. Contudo, observa-se um desvio maior nas análises contendo 5% de amostra extraída, que pode ser atribuído a desvios de técnica de pipetagem de volumes pequenos.

5.1.2.4 Desenvolvimento e validação de protocolo de extração para amostras de soro

Como as amostras de soro possuem menos células que o sangue total, foi possível realizar a extração com reagente desenvolvido mantendo a proporção de 1:1 (Amostra:Reagente). Após a lise térmica, observou-se a formação de precipitado na amostra de soro, que é facilmente separado na etapa de *quickspin* do protocolo de extração.

A capacidade de isolar, quantificar e analisar ácidos nucleicos presentes no soro, plasma e sangue leva à identificação de fragmentos específicos de ácidos nucleicos relacionados a distúrbios específicos, como diabetes, câncer, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral, além de infecções externas, permitindo o diagnóstico precoce. As doenças infecciosas possuem algumas peculiaridades que as distinguem de outras doenças humanas, como a transmissibilidade e sua estreita relação tanto com o meio ambiente quanto com o comportamento humano, e a capacidade de serem prevenidas e erradicadas. (Gahan; Swaminathan, 2008; Lima-Camara, 2016). Assim, o diagnóstico rápido de pacientes com doenças infecciosas pode auxiliar tanto na recuperação do paciente, como em ações de controle epidemiológico. Da mesma forma que as amostras de SARS-CoV-2, a extração com o reagente desenvolvido diminui o tempo de extração de amostras de soro consideravelmente, quando comparado com técnicas convencionais, podendo trazer um impacto significativo nas rotinas laboratoriais, além de significativa redução de custo.

Dentre as inúmeras infecções que podem ser detectadas por exames de RT-qPCR em amostras de soro, as arboviroses são as doenças de origem

zoonótica. No Brasil as principais são Dengues, Zika vírus, Chikungunya e Febre Amarela e que possuem, cada dia mais, o diagnóstico realizado por RT-qPCR, por ser uma técnica menos susceptível a reações cruzadas do que outros testes como ELISA (do inglês, *Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*) e imunocromatografia (Licínio; Ayres, 2021).

O desenvolvimento do protocolo para amostras de soro comparou o resultado obtido de 20 amostras extraídas com o reagente de extração desenvolvido com o resultado oficial em laudo obtido com material extraído com coluna de sílica, com o kit ZDC Biomol (IBMP). Os resultados obtidos estão listados na **tabela 5** e mostraram 100% de compatibilidade com os resultados originais emitidos após a primeira análise para diagnóstico.

Tabela 5 - Resultados de RT-qPCR de reações realizadas com kit ZDC Biomol após extração com reagente desenvolvido, para detecção de arboviroses.

Amostra	Valor do CT (Reagente)	Resultado obtido (Reagente)	Resultado oficial (Coluna de sílica)
1	25,0	Dengue 1	Dengue 1
2	33,0	Febre Amarela	Febre Amarela
3	22,0	Dengue 3	Dengue 3
4	32,0	Zika Virus	Zika Virus
5	22,0	Dengue 2	Dengue 2
6	34,0	Febre Amarela	Febre Amarela
7	34,0	Febre Amarela	Febre Amarela
8	22,0	Dengue 4	Dengue 4
9	25,0	Chikungunya	Chikungunya
10	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado
11	24,0	Dengue 1	Dengue 1
12	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado
13	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado
14	24,0	Dengue 2	Dengue 2
15	32,0	Zika vírus	Zika vírus
16	26,0	Chikungunya	Chikungunya
17	26,0	Dengue 2	Dengue 2

18	34,0	Dengue 4	Dengue 4
19	27,0	Zika vírus	Zika Vírus
20	Não Detectado	Não Detectado	Não Detectado

Dentro os resultados obtidos, 20% foram não detectados para os alvos analisados e condizentes com o resultado oficial dos exames. Para as amostras com resultados detectáveis, obteve-se a detecção de Dengue, Zika, Chikunguya e Febre Amarela, e a similaridade de 100% com os resultados oficiais, indicando que o reagente desenvolvido foi eficaz na extração de amostras de soro. A análise individual das amostras revelou que o reagente consegue extrair amostras com CTs variados (altos e baixos), indicativos de cargas virais diferentes. No caso de arboviroses, esse é um item importante, uma vez que as amostras de soro são muito sensíveis a degradação podendo impactar o RNA viral presente no material e reduzir a confiabilidade dos resultados. Além disso, a própria coleta e processamento das amostras de soro já pode impactar os resultados de PCR, caso existam alguns problemas, como hemólise, armazenamento inadequado e longo tempo até a centrifugação da amostra (Al-Soud; Rådström, 2001).

No caso da detecção da dengue, também foi possível obter resultados satisfatórios para a sorotipagem do tipo de dengue (Dengue 1, 2, 3 e 4), com o uso do reagente desenvolvido. Portanto, os resultados obtidos demonstram que é possível extrair o material genético do soro utilizando o reagente desenvolvido, e que não houve interferência nas reações enzimáticas RT-qPCR utilizando sondas de hidrólise, do tipo *Taqman*, resultando em 100% de compatibilidade com os resultados oficiais de diagnóstico.

5.1.2.5 Desenvolvimento e validação de protocolo de extração para amostras de plasma

Para verificar efetividade da extração de ácidos nucleicos com o reagente desenvolvido em amostras de plasma, o teste de sexagem fetal por qPCR com o material extraído foi realizado. Este ensaio utiliza sondas de hidrólise para detectar fragmentos de gene do cromossomo Y circulante no sangue da mãe. Assim, a amplificação do alvo no cromossomo Y indica que o feto é do sexo

masculino e a não detecção, indica que o feto é do sexo feminino. Acredita-se que o DNA fetal livre no plasma materno seja derivado de células trofoblásticas que são aprisionadas e lisadas no pulmão materno, ou liberadas após a apoptose natural de células fetais que estão vazando continuamente através da placenta (Bianchi, 1998). Lo e colaboradores (1998) mostraram que a concentração de DNA fetal circulante no plasma materno já é relativamente alta no início da gravidez e que esta concentração aumenta gradualmente com a gestação. Estudos anteriores mostraram que a detecção do DNA fetal no plasma materno é alcançada em um período gestacional de 7 semanas com segurança, mas com 4 semanas já é possível a identificação do DNA fetal em alguns casos (Lo *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 1995).

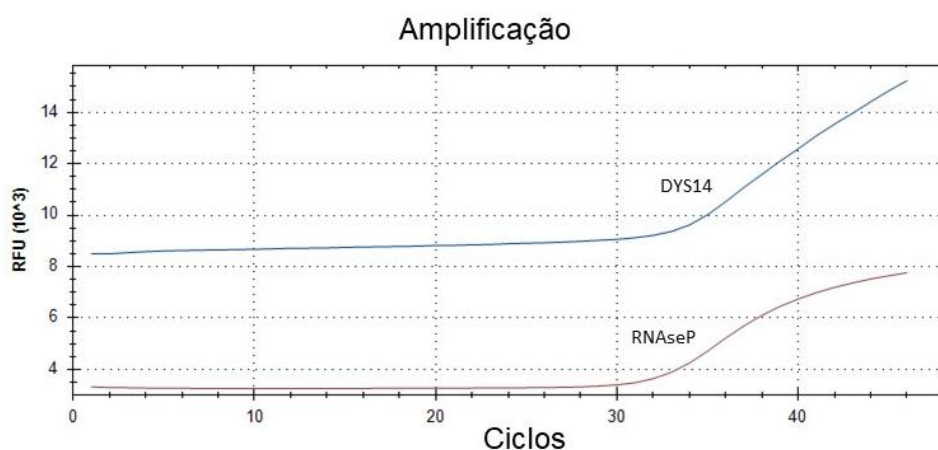
Durante a extração de ácidos nucleicos de plasma com o reagente desenvolvido, não foram observadas intercorrências e o protocolo de extração foi bem semelhante ao descrito para amostras de soro (7 minutos de extração, reação 1:1 – amostra-reagente, e baixo consumo de material plástico). A **tabela 6** mostra os resultados obtidos em 11 amostras para ensaio de detecção do gene DYS14 presente no cromossomo Y, com o kit de EasyPlex Sexagem Fetal (CBI Scientific).

Dentre os resultados obtidos, foi observada a concordância em 100% com o resultado oficial, indicando que o reagente pode atuar na extração e preservação de ácidos nucleicos oriundos do plasma. Além da detecção do gene DYS14 nas amostras (**Figura 24**), não foi observada a amplificação de nenhum gene analisado (DYS14 e RNaseP) nos controles negativos, indicando não haver contaminação nas análises realizadas.

Tabela 6 – Resultados de qPCR para detecção do gene DYS14 (cromossomo Y) e sexagem fetal em amostras de plasma, extraídas com reagente desenvolvido.

Amostra	Valor do CT	Resultado obtido por qPCR	Idade gestacional na coleta (semanas)	Resultado verificado por Ultrassom
1	34,0	Sexo masculino	39	Sexo masculino
2	35,0	Sexo masculino	31	Sexo masculino
3	33,0	Sexo masculino	25	Sexo masculino
4	33,0	Sexo masculino	38	Sexo masculino
5	35,0	Sexo masculino	37	Sexo masculino
6	34,0	Sexo masculino	27	Sexo masculino
7	29,0	Sexo masculino	27	Sexo masculino
8	33,0	Sexo masculino	29	Sexo masculino
9	33,0	Sexo masculino	29	Sexo masculino
10	35,0	Sexo masculino	33	Sexo masculino
11	33,0	Sexo masculino	30	Sexo masculino

Figura 24 - Curva de amplificação de amostra de plasma, com detecção do gene DYS14 (sexo masculino).



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Assim como as amostras de sangue total e de soro, as amostras de plasma também exigem atenção especial às condições de extração, pois podem conter uma grande quantidade de inibidores e interferentes na reação de PCR (Al-Soud; Rådström, 2001). Embora os resultados atuais confirmem a capacidade do reagente desenvolvido em extrair e preservar ácidos nucleicos de plasma materno, até o momento o reagente só foi desafiado para amostras com idade gestacional elevada (acima de 25 semanas), nas quais há uma quantidade maior de material disponível para a reação. Assim, a inclusão de novas amostras biológicas pode complementar o entendimento da capacidade de detecção de um kit de sexagem fetal utilizando um reagente de extração rápida.

5.1.2.6 Desenvolvimento de protocolo de extração para amostras vegetais

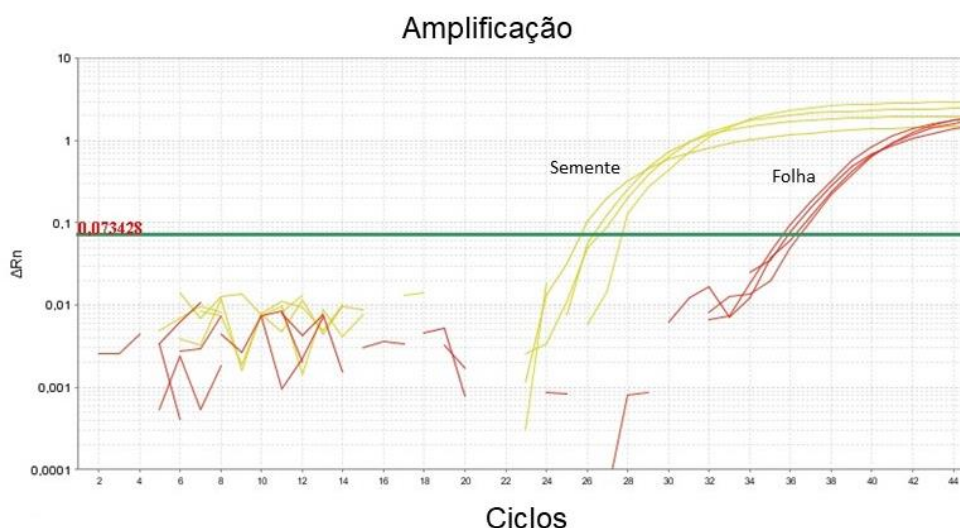
Atualmente, a utilização da biologia molecular no ramo de agricultura está em crescimento, pois permite compreender a genética e os processos biológicos vegetais, o que possibilita melhorar a produção, a qualidade nutricional e a resistência a estresses ambientais e doenças. Isso contribui para o desenvolvimento sustentável da agricultura e para garantir a segurança alimentar em nível global. Por isso, estudos que fornecem celeridade e menor custo aos ensaios de biotecnologia são muito importantes globalmente, sendo a etapa de extração de ácidos nucleicos um fator a ser explorado. No Brasil, a soja é a principal cultura, tanto em escala quanto em valor, por isso foi escolhida para o desenvolvimento e validação do reagente de extração rápida (Cattelan; Dall'agnol, 2018).

A extração com as folhas e sementes foi realizada com facilidade e rapidez, mantendo o protocolo inicial sugerido. O gene de escolha para a avaliação por PCR foi o da lectina 2, amplamente expresso na soja durante o desenvolvimento da planta e é encontrada principalmente nas sementes de soja. A lectina 2 desempenha um papel importante na defesa da planta contra insetos e patógenos, pois tem a capacidade de se ligar a carboidratos presentes na superfície de organismos invasores (Wang *et al.*, 2021). A expressão de genes pode ser influenciada por vários fatores, como condições ambientais, estresse, estágio de desenvolvimento da planta e outros fatores regulatórios. Portanto, é importante lembrar que a expressão do gene da lectina 2 pode variar

dependendo das condições específicas em que a soja está crescendo, sendo assim, um importante gene de controle de extração.

Através dos resultados obtidos, foi possível a detecção do gene da lectina 2 nas folhas e sementes de soja por qPCR, conforme demonstrado na **figura 25**. Os valores de CT obtidos foram $36,08 \pm 0,36$ para folhas, e $26,55 \pm 0,80$ para sementes. Essa diferença observada ocorreu devido à diferença de expressão em diferentes partes da planta. Como nas sementes a expressão do gene da lectina 2 é maior do que nas folhas, esperava-se um CT menor do que nas folhas, devido a maior disponibilidade de material para a reação. As análises estatísticas entre as quaduplicatas das amostras não mostram diferença significativa entre elas ($p > 0,05$), indicando uma boa repetibilidade do método de extração.

Figura 25 - Curva de amplificação de amostras de sementes e folhas de soja, após extração com reagente desenvolvido.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Um estudo de Zimmermann e colaboradores (1998) avaliou e comparou nove diferentes métodos de extração (ligação a resina ou lise térmica) de ácidos nucleicos de soja. Dos nove métodos avaliados, 5 geraram completa ou intensa desnaturação do DNA durante a extração. Além disso, o tempo médio de extração dos métodos avaliados foi de 98 minutos, demonstrando a importância e o ganho com reagentes de extração rápida, como a do reagente desenvolvido com apenas 7 minutos. Foi demonstrado que os métodos de extração usando resinas de ligação, resultaram em rendimentos comparativamente baixos. No

entanto, o DNA extraído com esses métodos é de alta qualidade. Já utilizando métodos mais simples e rápidos, os autores obtiveram rendimentos relativamente altos, mas de qualidade relativamente ruim, uma característica esperada uma vez que não há purificação do material genético.

Ainda de acordo com Zimmermann e colaboradores (1998), observou-se inibição da PCR devido a um dos tampões utilizados durante a extração de ácidos nucleicos. Além disso, o estudo destaca a possibilidade de efeitos inibitórios no processamento subsequente causados por certos métodos de extração. No caso de espécies vegetais, a presença de lignina e polifenóis podem ocasionar inibição da reação de qPCR. Embora não tenha sido observada a inibição da reação de qPCR, o uso de reagentes de extração rápida desenvolvido deve ser testado e ajustado para diferentes amostras de interesse, com o intuito de corrigir qualquer inibição.

Os resultados obtidos mostram que o reagente de extração rápida desenvolvido e a metodologia empregada foram eficazes para extrair os ácidos nucleicos de folhas e sementes de soja, sugerindo preservação dos ácidos nucleicos presentes nas amostras.

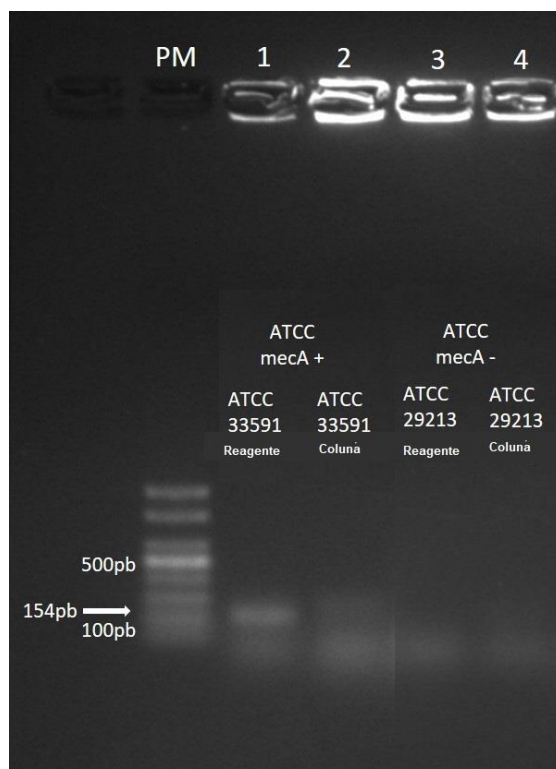
5.1.2.7 Desenvolvimento de protocolo de extração para bactérias gram-positivas

Embora seja descrito na literatura que a purificação de ácidos nucleicos de procariontes é relativamente mais fácil do que de células vegetais e animais, existe uma preocupação com a degradação dos ácidos nucleicos por enzimas e com a maximização da extração (Abbas; Ihn, 2016). Em relação às bactérias, as gram-positivas são mais resistentes à lise celular devido à alta concentração de peptidoglicano dentro da parede celular e por isso, muitas vezes é necessária a adição de lisozima para hidrolisá-los (Khan; Yadav, 2004). Contudo, resultados obtidos em gel de eletroforese após a PCR demonstram que a extração e preservação dos ácidos nucleicos utilizando o reagente desenvolvido foi satisfatória e não ocorreu inibição da reação (**Figura 26**).

Os resultados da eletroforese indicam a ausência de fragmentos de 154 pb (pares de bases) na cepa ATCC 29213, indicando que não há expressão do gene *MecA*. Já para a ATCC 33591, foi possível observar fragmentos de 154 pb tanto na extração com coluna e com o reagente de extração rápida. De acordo

com a literatura, as cepas de *S. aureus* ATCC 29213 não possuem expressão de gene *MecA*, enquanto as ATCC33591 possuem (Baddour; Abuelkheir; Fatani, 2007). A análise da eletroforese também revelou uma melhor visualização do amplicon com o reagente desenvolvido, indicando que o material genético estava preservado para a reação de PCR. Assim, o reagente desenvolvido permitiu a extração satisfatória dos ácidos nucleicos de bactérias gram-positivas e não interferiu na amplificação por PCR.

Figura 26 – Imagem do gel de eletroforese após a PCR, utilizando primers para o gene *MecA*, após extração em bactérias *S. aureus* com o reagente de extração rápida desenvolvido.



Onde, a seta no marcador de peso molecular de 154 pb indica a banda de expressão do gene *MecA*.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

5.1.3 Estudo de estabilidade

Os estudos de estabilidade do reagente de extração desenvolvido revelaram que o mesmo se mantém estável quando mantido congelado a -20

°C, devendo-se evitar ciclos de congelamento e descongelamento contínuos. Os valores de CT para gene N, gene E e gene RdRp estão listados na **tabela 7**.

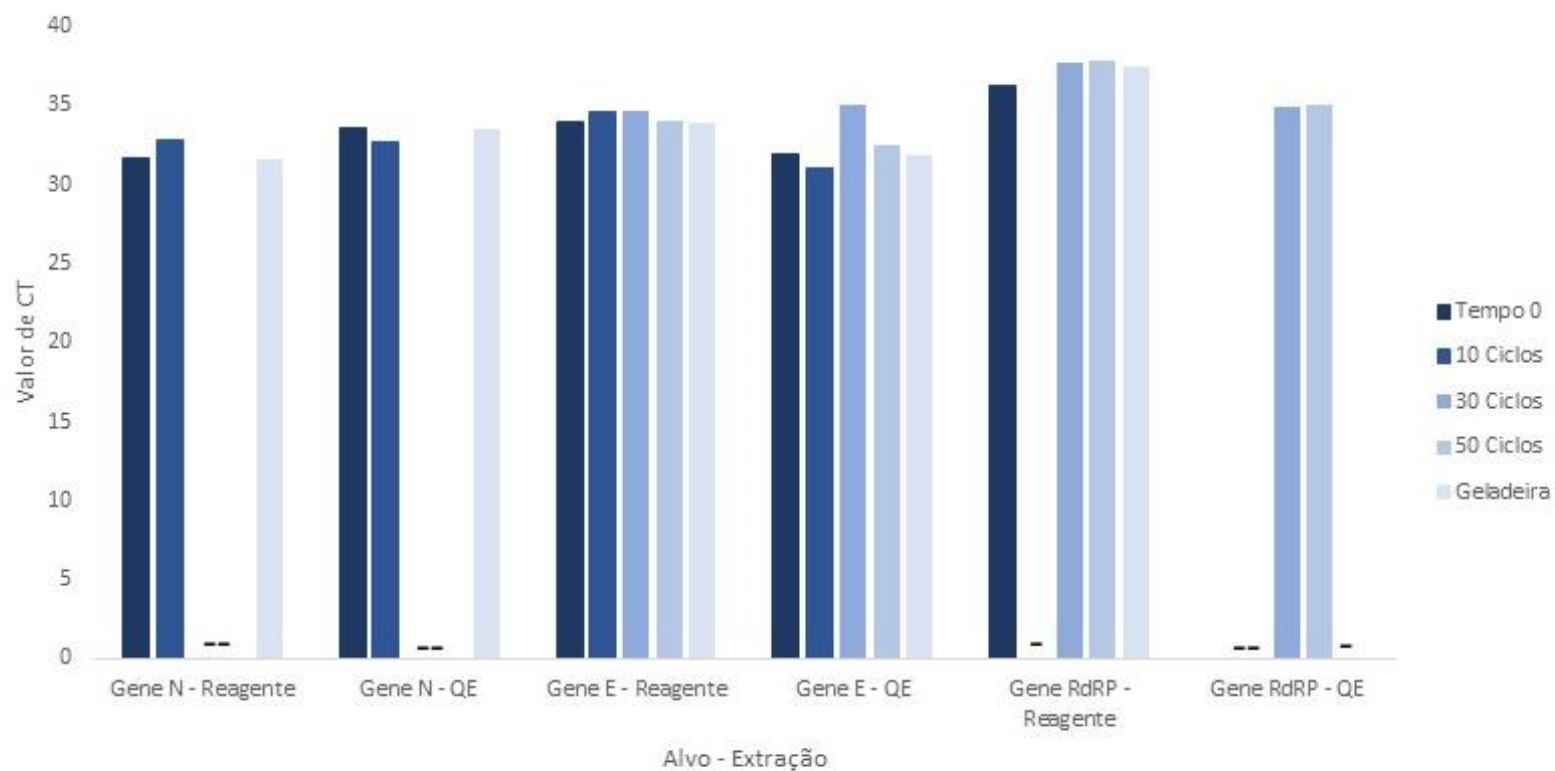
Os resultados sugerem que para a amostra com valores de CT elevados (**Figura 27**), ciclos repetidos de congelamento/descongelamento podem impactar na detecção de alguns alvos. No caso do gene N, até 10 ciclos foi possível manter o CT sem diferença estatística ($p > 0,05$), mas a partir de 30 ciclos já não foi possível detectar o gene. Para o gene E e RdRp, foi possível detectar os alvos mesmo após 50 ciclos de congelamento/descongelamento. Para a amostra com provável carga viral alta (**Figura 28**), foi possível a detecção de todos os genes, mesmo após 50 ciclos de congelamento/descongelamento, porém os genes N, E e RdRp apresentaram diferença significativa de valores após 30 ciclos.

Tabela 7 - Valores de CTs obtidos para amostras de SARS-CoV-2, extraídas com reagente desenvolvido ou com QuickExtract (QE) armazenado em diferentes condições.

Amostra A (CT > 30,0)						
Condição	Reagente Gene N	QE Gene N	Reagente Gene E	QE Gene E	Reagente Gene RdRp	QE Gene RdRp
Tempo 0	31,62	33,51	33,96	31,88	36,21	N.D.
10 Ciclos	32,78	32,66	34,53	31,02	N.D.	N.D.
30 Ciclos	N.D.	N.D.	34,69	34,97	37,73	34,88
50 Ciclos	N.D.	N.D.	34,02	32,48	37,82	35,02
4-8 °C	31,63	33,51	33,89	31,88	37,49	N.D.
Amostra B (CT < 30,0)						
Condição	Reagente Gene N	QE Gene N	Reagente Gene E	QE Gene E	Reagente Gene RdRp	QE Gene RdRp
Tempo 0	19,74	18,21	21,14	16,94	22,13	20,98
10 Ciclos	19,43	18,81	21,77	18,19	22,43	23,22
30 Ciclos	22,71	20,31	26,94	18,65	26,61	24,15
50 Ciclos	21,82	20,36	24,98	18,78	25,61	24,68
4-8 °C	20,33	18,21	22,15	16,94	22,77	20,98

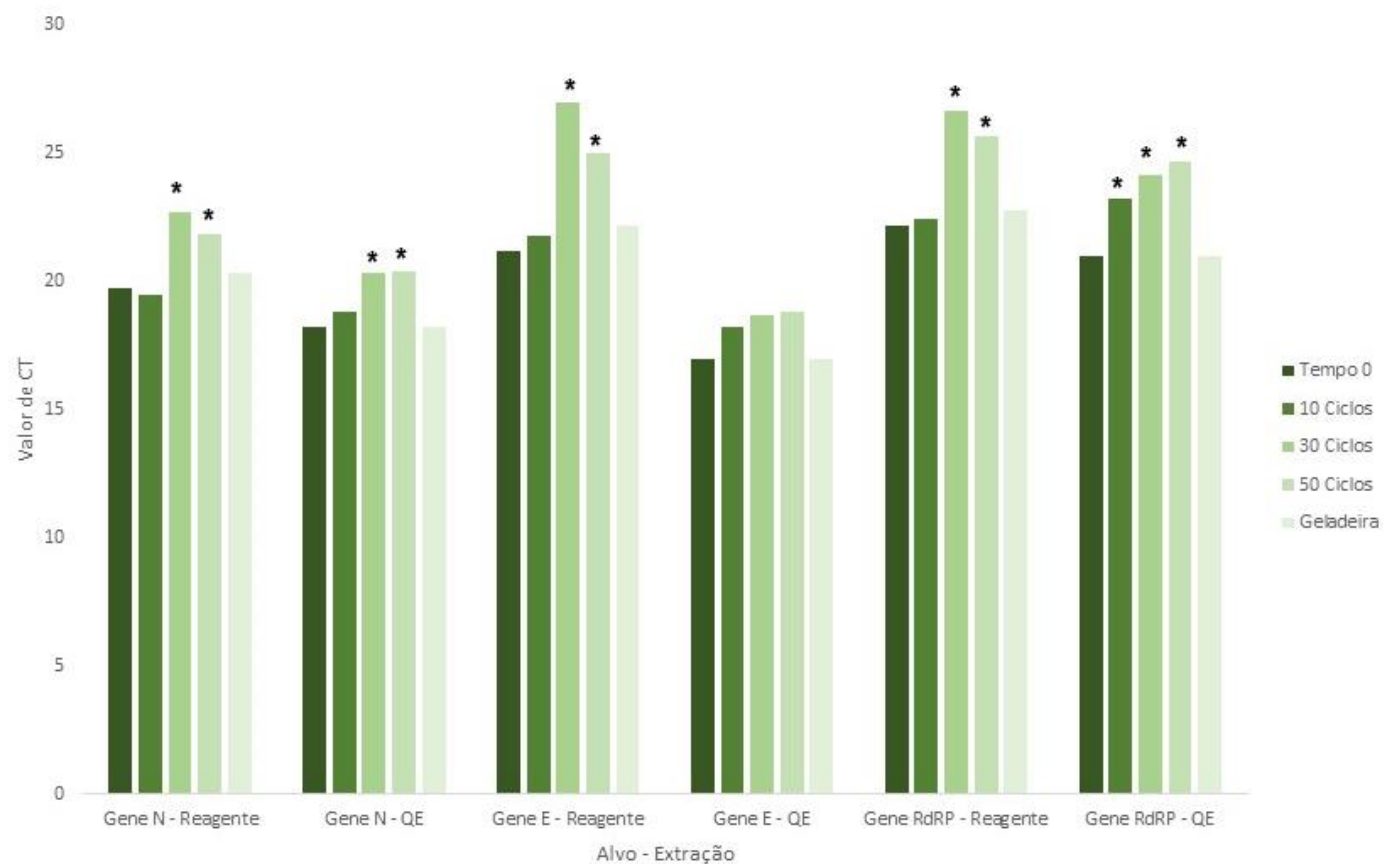
Onde, N.D. = indeterminado. Armazenamento em 4-8 °C, por 7 dias. Condição: ciclos de congelamento/descongelamento do reagente desenvolvido, usado para extração anterior ao PCR.

Figura 27 - Valores de CT dos genes N, E e RdRp de uma amostra de SARS-CoV-2 com provável carga viral baixa, após extração com reagente desenvolvido em diferentes condições de armazenamento.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 28 - Valores de CT dos genes N, E e RdRp de uma amostra de SARS-CoV-2, com provável carga viral alta, após extração com reagente desenvolvido em diferentes condições de armazenamento.



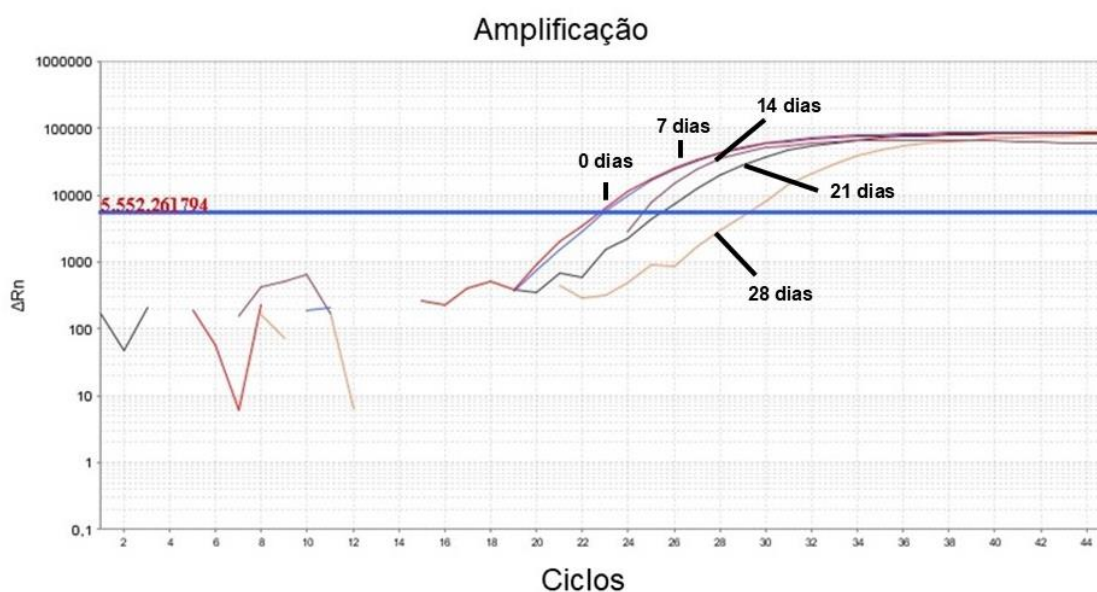
* Diferença significativa quando comparado com tempo zero ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Em relação aos resultados obtidos com extração do reagente mantido em 4-8 °C, os valores de CTs para ambas as amostras foram semelhantes aos CTs obtidos com o reagente recém produzido, indicando que embora o reagente deva ser mantido congelado, o mesmo resiste a pelo menos uma semana resfriado.

A avaliação do desempenho do reagente após armazenamento em 24 °C $\pm$ 2 °C revelou que o reagente pode ser mantido a temperatura ambiente por até 7 dias, sem perda de eficiência. Após esse período, observou-se redução nos valores de CT, indicando redução de eficiência do reagente (**Figura 29**). Comparando os resultados obtidos para o gene N, no tempo zero obteve-se um CT de $22,73 \pm 0,87$. Após 07 dias, as amostras foram reextraídas com reagente mantido em temperatura ambiente e o CT foi de $22,98 \pm 0,45$. Após 14 dias, o CT foi $24,57 \pm 0,51$, após 21 dias, $25,73 \pm 0,19$ e após 28 dias, $29,19 \pm 0,74$. Como observado, após 7 dias há um aumento significativo entre os CTs obtidos, podendo impactar na análise realizada.

Figura 29 - Detecção do Gene N, de uma amostra de SARS-CoV-2 após extração com reagente desenvolvido armazenado em temperatura ambiente.



Onde, vermelho: 0 dias; Azul: 7 dias; Roxo: 14 dias; Verde: 21 dias; Laranja: 28 dias.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os resultados obtidos nos estudos de estabilidade indicam que o reagente deve ser mantido congelado a -20°C , mas também resiste até 14 dias em temperatura ambiente.

5.1.4 Transferência de Tecnologia

O reagente desenvolvido foi transferido oficialmente pela Universidade Federal de Juiz de Fora para a empresa Pi-Biotech Genética Avançada Ltda (Pi-Biotech, CNPJ nº 41.940.548/0001-07), através de documento de transferência de tecnologia publicado no D.O.U. 187, de 01/10/2021 (**Anexo C**). Atualmente o produto se encontra com venda e distribuição irrestrita no mercado nacional como Reagente Para Pesquisa (*R.U.O. Research Use Only*), pela empresa Nova Analítica Imp. Exp. Ltda (CNPJ nº 67.774.679/0001-47) e pela própria empresa que detém os direitos de produção e comercialização.

A pandemia de COVID-19 mostrou que o Brasil é muito dependente da importação de insumos para realização de ensaios de biologia molecular, o que torna a técnica ainda mais cara. A transferência dessa tecnologia foi um importante passo e estímulo para ampliar o setor produtivo de reagentes e ativos voltados a biotecnologia, biologia molecular e diagnóstico no país, incentivando o Complexo Industrial de Saúde do Brasil.

5.2 DESENVOLVIMENTO DE KIT DE DETECÇÃO MULTIPLEX DE VARIANTES DE SARS-CoV-2 POR RT-Q-PCR

5.2.1 Desenvolvimento de primers e sondas

Durante a pandemia do COVID-19, várias formas do SARS-CoV-2 emergiram, com mutações que levaram ao aumento da transmissibilidade, virulência e possíveis mudanças na resposta a diagnósticos, terapias e imunidade. No entanto, a detecção de outras variantes depende do sequenciamento completo do genoma, uma técnica cara e demorada. Portanto, se fazem necessários ensaios rápidos de genotipagem para permitir planejamento de ações de epidemiologia, acompanhamento viral e agilidade no processo de diagnóstico (Vohringer *et al.*, 2021). Nesse contexto, a *expertise*

para o desenvolvimento rápido de kits multiplex torna-se importantíssima para o manejo de crises como a ocorrida na pandemia. Ademais, o próprio produto (kit multiplex com distinção de variantes) é ferramenta bastante útil para área de epidemiologia e controle de variantes circulantes.

Após a definição das variantes incluídas nesse estudo, as sequências genômicas foram obtidas do banco de dados da NCBI (National Center for Biotechnology Information) (NCBI, 2023). Foram selecionadas as seguintes sequências verificadas:

- Variante Delta: GenBank: MZ009823.1;
- Variante Gamma: GenBank: MW642250.1;
- Variante Ômicron: GenBank: OP412163.1;

Diante das sequências genômicas completas, a proteína spike foi selecionada como alvo principal para o desenho de primers e sondas, já que é a proteína com mais mutações específicas para as variantes (Hao *et al.*, 2020; Yan-Rong *et al.*, 2020). Os genomas das variantes foram copiados e as análises comparativas por alinhamento das sequências em um nível básico foram feitas no Clustal Omega, obtendo um resultado indicativo de todas as diferenças entre as sequências (Brown *et al.*, 2017; Tombuloglu *et al.*, 2021).

Para a variante Delta, foi selecionada a mutação P618R, uma mutação característica dessa variante. A sonda designada deve se anelar na sua sequência para permitir a especificidade na identificação desta variante (Saito *et al.*, 2022).

Para a variante Gama, foi selecionada a mutação específica K417N/T. Assim como na Delta, a sequência complementar à mutação selecionada deve estar contemplada na sonda, para aumentar a especificidade de detecção.

Já para a Ômicron, devido a grande quantidade de mutações e subvariantes, foi selecionada uma mutação que estivesse presente no máximo possível de subvariantes. Por isso, a mutação G339D foi selecionada sendo presente nas subvariantes BA1, BA4, BA5 e BQ1.1 (Cao *et al.*, 2022).

Após a definição das mutações para o design das sondas, o programa Primer-Blast foi utilizado para obtenção dos primers *forward* e *reverse* de cada variante, excluindo-se a região das sondas. Além das três variantes, foi realizado o desenho de primers e sonda para o gene RdRp, que é comum a todas as variantes. As sequências dos primers e sondas desenvolvidos não serão

fornecidas, pois também é um produto passível de transferência de tecnologia e sua publicação inviabilizaria este processo, mas suas características gerais são apresentadas na **Tabela 8**.

Tabela 8 – Características dos primers e sondas desenvolvidos para elaboração do kit multiplex de RT-qPCR.

Item	Característica	Variante Delta	Variante Gama	Variante Ômicron	RdRp
Primer Forward	Tamanho	21	20	24	22
	Tm	59,33	59,17	59,25	59,0
	%CG	52,38	50,00	41,67	54,50
Primer Reverse	Tamanho	22	20	22	27
	Tm	58,06	58,89	59,45	55,7
	%CG	45,45	45,00	45,45	40,0
Sonda	Tamanho	14	20	18	25
	TM (°C)	54,9	55,7	50,3	61,0
	%CG	57,1	40,0	44,4	56,0
	Fluoróforo	FAM	HEX	Cy5	ROX
	Quencher	BHQ-1	BHQ-1	BHQ-3	BHQ-1

A formação de *hairpins* e dímeros entre primers e sondas de PCR é um fenômeno indesejado que pode ocorrer durante a reação de amplificação em PCR, pois podem prejudicar a eficiência e especificidade da reação. Um *hairpin* é uma estrutura secundária de DNA que se forma quando uma sequência complementar de bases em uma única fita do DNA forma um par de bases com outra sequência complementar na mesma fita, criando uma estrutura em forma de alça (*hairpin*). Isso ocorre quando uma sequência palindrômica está presente no primer ou sonda, ou quando ocorre uma repetição inversa (Meagher *et al.*, 2018; Nybo, 2009). Os dímeros de primers e sondas são estruturas que se formam quando dois primers ou uma sonda se ligam entre si através de suas regiões complementares, o que prejudica a ligação ao alvo desejado. Esses dímeros podem ocorrer durante a etapa de hibridização, onde primers e sondas se ligam à sequência alvo complementar. Quando dímeros se formam, eles

podem servir como iniciadores não específicos para a reação de PCR, levando à amplificação não específica e à diminuição da especificidade da reação (Meagher *et al.*, 2018; Nybo, 2009). A formação de dímeros e *hairpins* pode ser evitada utilizando análise *in silico* das sequências, indicada pela energia (ΔG) de formação.

Valores de ΔG maiores -9,0 kcal/mol (mais positivos) indicam que a estrutura secundária não se formará (IDT, 2023b). A análise *in silico* dos primers e sondas propostas foi realizada através dos softwares OligoAnalyzer v.3.1 e NetPrimer (IDT, 2023b; NetPrimer, 2023). Após o ajuste de posicionamento, não foi encontrado nenhum valor acima de 9,0 kcal/mol para a formação de hairpins (**Tabela 9**) e dímeros (**Tabela 10**), indicando boa estabilidade das estruturas no meio reacional.

As sequências ainda foram analisadas com o Blastn para avaliar a ligação cruzada com outros alvos e todos os resultados mostraram 100% de ligação à variante correspondente e 0,0% de ligação às correspondências humanas.

Tabela 9 - Análise *in silico* da formação de *hairpins* para as sequências de primers e sondas propostas.

Sequência	Valor em kcal/mol (ΔG)
Delta – Primer Forward	0,70
Delta – Primer Reverse	-0,50
Delta – Sonda	-0,64
Gamma – Primer Forward	-0,45
Gamma – Primer Reverse	-1,15
Gamma – Sonda	0,31
Ômicron – Primer Forward	-0,81
Ômicron – Primer Reverse	-3,10
Ômicron – Sonda	2,59
RdRp – Primer Forward	-0,10
RdRp – Primer Reverse	0,17
RdRp – Sonda	3,12

Tabela 10 - Análise *in silico* da formação de autodímeros e heterodímeros entre as sequências de primers e sondas propostas.

	Primer F Delta	Primer F Gama	Primer F Ômicron	Primer F RdRp	Primer R Delta	Primer R Gama	Primer R Ômicron	Primer R RdRp	Sonda Delta	Sonda Gama	Sonda Ômicron	Sonda RdRp
Primer F Delta	-7,05	-6,69	-4,95	-3,89	-5,09	-8,78	-5,24	-8,03	-3,61	-6,79	-7,74	-5,09
Primer F Gama	-6,69	-6,34	-4,95	-3,61	-8,57	-5,09	-5,09	-6,69	-3,61	-3,53	-6,21	-4,67
Primer F Ômicron	-4,95	-4,95	-6,3	-6,82	-6,47	-4,89	-5,24	-4,95	-4,95	-6,61	-3,89	-6,24
Primer F RdRp	-3,89	-3,61	-6,82	-5,38	-5,02	-5,38	-6,59	-4,89	-3,61	-3,89	-6,21	-4,41
Primer R Delta	-5,09	-8,57	-6,47	-5,02	-3,03	-7,04	-7,04	-5,50	-3,14	-5,02	-8,16	-5,09
Primer R Gama	-8,78	-5,09	-4,89	-5,38	-7,04	-7,05	-8,38	-6,69	-3,14	-5,24	-5,09	-6,57
Primer R Ômicron	-5,24	-5,09	-5,24	-6,59	-7,04	-8,38	-8,38	-6,69	-3,42	-6,58	-5,25	-6,60

Primer R RdRp	-8,03	-6,69	-4,95	-4,89	-5,5	-6,69	-6,69	-6,34	-3,61	-5,23	-5,84	-3,53
Sonda Delta	-3,61	-3,61	-4,95	-3,61	-3,14	-3,14	-3,42	-3,61	-5,36	-3,42	-6,21	-4,75
Sonda Gama	-6,79	-3,53	-6,61	-3,89	-5,02	-5,24	-6,58	-5,23	-0,34	-4,85	-8,56	-7,95
Sonda Ômicron	-7,74	-6,21	-3,89	-6,21	-8,16	-5,09	-5,25	-5,84	-6,21	-8,56	-3,14	-8,53
Sonda RdRp	-5,09	-4,67	-6,24	-4,41	-5,09	-6,57	-6,6	-3,53	-4,75	-7,95	-8,53	-6,01

Onde, os valores apresentados correspondem a ΔG , em kcal/mol.

5.2.2 Otimização do sistema PCR

5.2.2.1 Determinação da quantidade de amostra em ensaio de PCR

A quantidade de ácido nucleico presente em uma reação de PCR desempenha um papel crítico na eficiência e na precisão da amplificação. A concentração de ácido nucléico pode influenciar diretamente o limite de detecção do ensaio, a reprodutibilidade dos resultados e até a ocorrência de alguns problemas, como amplificação inespecífica e inibição da reação (Schrader *et al.*, 2012). Assim, a definição de uma faixa ideal de concentração de ácido nucleico é essencial para garantir a robustez e a confiabilidade da metodologia empregada.

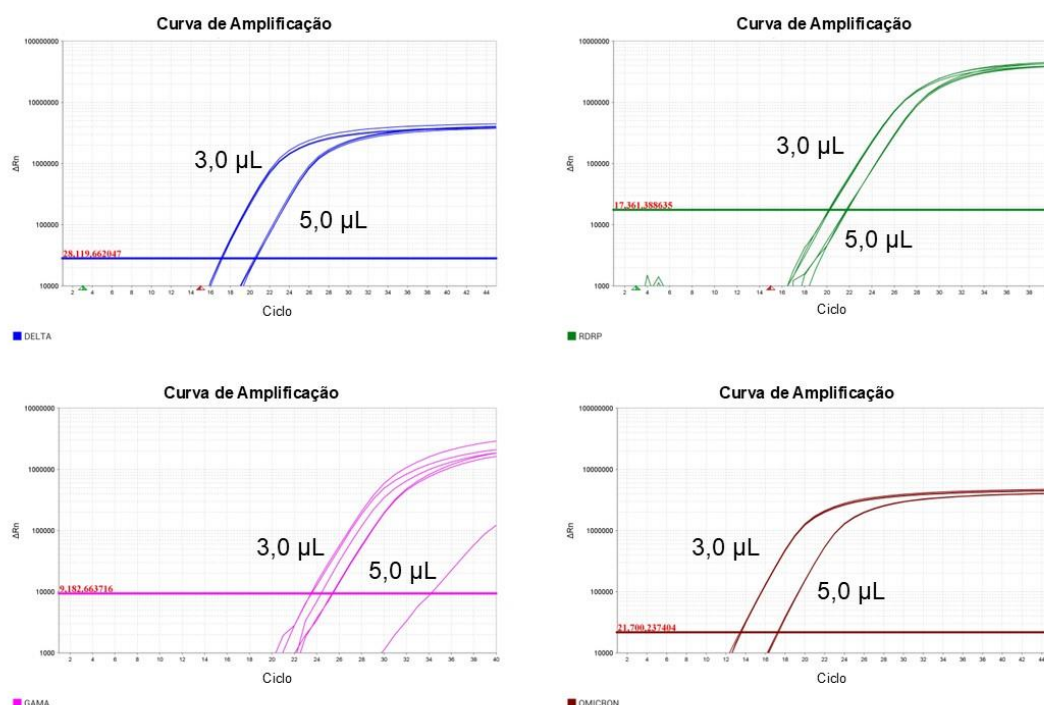
Quantidades muito baixas de amostra podem resultar em um sinal fraco ou indetectável, especialmente em amostras com baixa carga viral ou baixa abundância do alvo. Por outro lado, uma concentração excessiva de ácido nucleico pode saturar a reação, levando a outros problemas. Um dos problemas mais comuns é a inibição da polimerase, fenômeno que pode ser causado por componentes presentes na própria amostra, como proteínas, sais, polissacarídeos ou outros contaminantes co-extraídos (Schrader *et al.*, 2012). Isso pode resultar em amplificação ineficiente e, conseqüentemente, no aumento do valor de CT ou até na completa falha da reação. Além disso, quantidades elevadas de material genético podem favorecer a amplificação de produtos inespecíficos devido à ligação não específica dos primers a sequências homólogas presentes na amostra.

A presença de DNA genômico residual em amostras de RNA pode comprometer a especificidade de ensaios de RT-qPCR, especialmente quando o alvo é RNA viral (Schrader *et al.*, 2012). De acordo com Hashemipetroudi e colaboradores (2018) a contaminação por DNA genômico é um problema inerente durante a extração de RNA devido às propriedades físicas e químicas semelhantes do DNA e RNA. Essa contaminação pode resultar em amplificação não específica, influenciando negativamente a precisão dos resultados de RT-qPCR.

Portanto, a padronização da quantidade de ácido nucleico na reação de PCR deve ser realizada com base em uma validação rigorosa, considerando tanto a sensibilidade do método quanto a possibilidade de inibição.

A análise da quantidade de amostra na reação de PCR frente aos primers desenvolvidos demonstrou que o aumento na concentração de material genético provoca uma perda de sensibilidade do método, já que os valores de CT obtidos são maiores do que quando comparados com as reações nas mesmas condições e menor quantidade de amostra. Na **Figura 30** observa-se a amplificação direcionada pelos primers de cada alvo na presença de quantidade diferente de ácidos nucleicos.

Figura 30 – Avaliação da quantidade de amostra nas reações de PCR com os primers desenvolvidos.



Fonte: elaborado pela autora (2025).

Os valores de CT obtidos (**Tabela 11**) para todos os alvos indicam que em concentrações menores de material genético, a reação de PCR ocorre com maior facilidade. O aumento de CT observados nas concentrações de 25 ng indicam que o excesso de amostra pode de fato ser interferente para que a reação de PCR ocorra.

Tabela 11 – Valores de CT obtidos na determinação da concentração ideal de amostra para reação com os primers desenvolvidos.

Alvo	Valores de CT por concentração de amostra							
DELTA	[] = 15 ng				[] = 25 ng			
	n = 1	n=2	n = 3	Média (± DP)	n = 1	n=2	n = 3	Média (± DP)
	17,17	17,22	17,3	17,20 (± 0,05)	20,56	20,71	20,68	20,65 (± 0,06)
ÔMICRON	[] = 15 ng				[] = 25 ng			
	n = 1	n=2	n = 3	Média (± DP)	n = 1	n=2	n = 3	Média (± DP)
	13,75	13,84	13,81	13,80 (± 0,03)	17,54	17,55	17,54	17,54 (± 0,01)
GAMA	[] = 15 ng				[] = 25 ng			
	n = 1	n=2	n = 3	Média (± DP)	n = 1	n=2	n = 3	Média (± DP)
	23,52	24,44	23,61	23,98 (± 0,39)	25,48	25,43	34,18	28,36 (± 3,88)
RdRp	[] = 15 ng				[] = 25 ng			
	n = 1	n=2	n = 1	Média (± DP)	n = 1	n=2	n = 3	Média (± DP)
	20,4	20,31	20,25	20,36 (± 0,05)	21,77	21,84	21,87	21,83 (± 0,04)

Onde: DP = Desvio padrão

A diluição da amostra, quando necessária, pode ser uma estratégia eficiente para mitigar efeitos inibitórios, garantindo que a amplificação ocorra de forma específica e eficiente (Schrader *et al.*, 2012; Wei; Lu; Clover, 2008). No caso do ensaio com os primers da variante gama, observou-se grande variação de CT em maior concentração da amostra, mostrando o risco de inibição e possibilidade de resultados equivocados, em especial em amostras de baixa carga viral. Dessa forma, a adequação da concentração das amostras não apenas melhora a performance do ensaio, mas também aumenta a confiabilidade dos resultados, aspecto essencial para aplicações diagnósticas e de pesquisa.

Sendo assim, para a realização dos ensaios posteriores, ficou determinadas a utilização de concentração ótima de 15 ng de ácido nucléico por reação.

5.2.2.2 Otimização da concentração de primers na PCR

A otimização da concentração de primers em ensaios de PCR é importante pois quanto maior a concentração de primers na reação, maior a chance deles se associarem entre si e/ou em regiões inespecíficas. Por outro lado, baixas concentrações de primers podem gerar pouca quantidade de amplicon, diminuindo a sensibilidade do ensaio. Na PCR em tempo real, a otimização da concentração dos primers, visa diminuir o CT e a ausência de picos múltiplos na curva de *melting* (Green; Sambrook, 2018).

O ensaio de otimização da concentração dos primers demonstrou resultados satisfatórios, garantindo uma amplificação eficiente e reprodutível dos alvos analisados. Todas as curvas de amplificação apresentaram perfis característicos adequados, com valores de CT consistentes entre as repetições, indicando alta robustez dos ensaios.

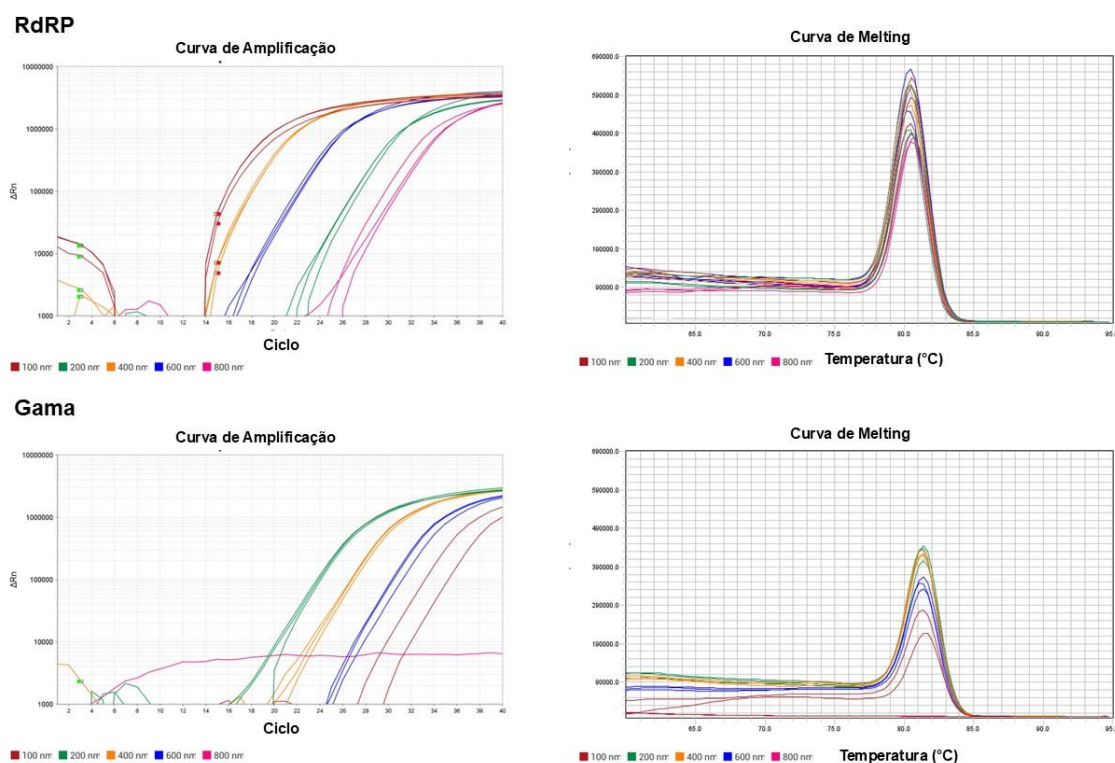
A avaliação das concentrações de primers testadas (100, 200, 400, 600 e 800 nM) permitiu identificar a melhor condição para cada alvo, considerando tanto a eficiência da reação quanto a redução de amplificações inespecíficas e formação de dímeros de primers. Os resultados obtidos foram corroborados pelas curvas de *melting*, que indicaram alta especificidade das amplificações, sem sinais significativos de produtos indesejados.

Para o alvo RdRp, embora o nível de fluorescência (ΔR_n) tenha sido semelhante, os CT variaram entre as concentrações analisadas (**Figura 31**). A reação ocorreu melhor com a concentração de primer igual a 100 nM (**Tabela 12**), uma vez que essa concentração apresentou menor CT entre as triplicatas. Nas concentrações de 200, 400, 600 e 800 nM foi observado aumento de CT, sendo que os maiores CTs foram observados para as concentrações de 200 e 800 nM. A curva de *melting* apresentou pico único para todas as concentrações testadas, indicando que os primers não formaram dímeros ou ligações inespecíficas, como previsto no ensaio *in silico* (Juul *et al.*, 2022).

Já para o alvo da variante Gama, a reação ocorreu melhor com a concentração de primer igual a 200 nM (**Tabela 12**), uma vez que apresentou menor CT entre as triplicatas. As reações funcionaram com as concentrações de 400 e 600 nM, porém uma das réplicas da triplicata de 100 nM não apresentou amplificação e nenhuma réplica funcionou na concentração de 800 nM,

sugerindo que tanto o acúmulo quanto a falta de primers comprometeu a reação da PCR. Como observado na **figura 31**, a curva de *melting* apresentou pico único para todas as concentrações testadas, indicando que os primers não formaram dímeros ou ligações inespecíficas mesmo na concentração de 100 nM (a qual não amplificou satisfatoriamente).

Figura 31 – Curvas de amplificação e curvas de *melting* de diferentes concentrações dos primers dos alvos RdRp e Gama desenvolvidos.



Onde, vermelho: 100 nM; Verde: 200 nM; Laranja: 400 nM; Azul: 600 nM; Rosa: 800nM.

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Tabela 12 – Valores de CT obtidos no ensaio de otimização na concentração de primers.

	[] primers nM	n=1	n=2	n=3	Média (± DP)
RdRp	100	14,31	14,18	14,16	14,22 (± 0,06)
	200	24,62	23,83	23,94	24,13 (± 0,33)
	400	15,60	15,41	15,31	15,44 (± 0,11)
	600	19,29	18,81	18,94	19,01 (± 0,18)
	800	27,32	27,86	26,72	27,3 (± 0,39)
	[] primers nM	n=1	n=2	n=3	Média (± DP)
Gama	100	ND	36,13	34,08	-
	200	24,94	24,71	24,83	24,83 (± 0,08)
	400	27,64	27,71	27,95	27,77 (± 0,12)
	600	32,11	31,18	31,33	31,54 (± 0,38)
	800	ND	ND	ND	-
	[] primers nM	n=1	n=2	n=3	Média (± DP)
Delta	100	26,62	26,99	26,93	26,85 (± 0,15)
	200	23,23	23,4	23,42	23,35 (± 0,08)
	400	19,63	19,67	19,75	19,68 (± 0,04)
	600	15,98	15,91	15,84	15,91 (± 0,05)
	800	30,56	30,26	30,04	-
	[] primers nM	n=1	n=2	n=3	Média (± DP)
Ômicron	100	31,25	31,02	30,55	30,94 (± 0,26)
	200	23,83	23,08	ND	23,46 (± 0,38)
	400	27,05	27,17	27,45	27,22 (± 0,15)
	600	16,52	16,57	16,59	16,56 (± 0,03)
	800	20,3	20,1	20,34	20,25 (±0,10)

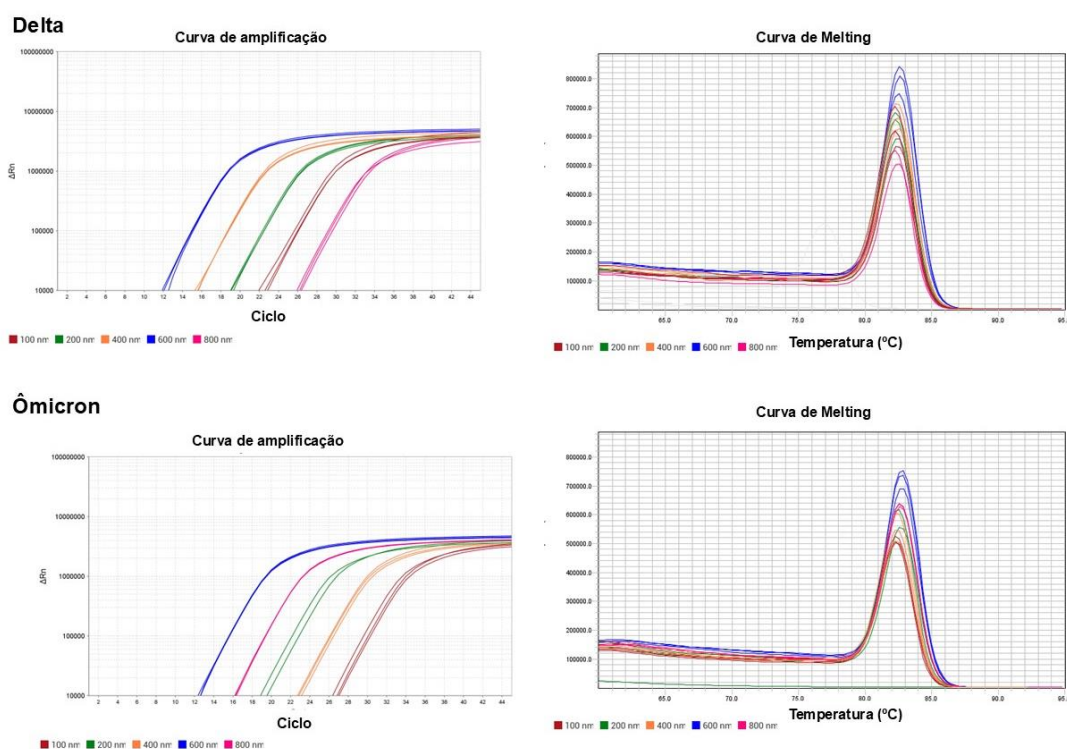
Legenda: ND = Não Detectado. DP = Desvio padrão.

Para o alvo das variantes Delta e Ômicron, as reações ocorreram melhor com a concentração de primer igual a 600 nM (**Figura 32**), já que essa concentração apresentou menor CT entre as triplicatas. As reações funcionaram

para todas as concentrações analisadas, mas houve aumento no valor do CT. A curva de *melting* apresentou pico único para todas as concentrações testadas, indicando que os primers não foram dímeros ou ligações inespecíficas (Sint; Raso; Traugott, 2013).

A análise das curvas de amplificação revelou alta reprodutibilidade entre as repetições, indicando que a padronização inicial da amostra controle foi eficaz na minimização de variações experimentais. A inclusão de controles positivos e negativos validou a confiabilidade dos dados, confirmando a ausência de contaminação cruzada e a robustez do ensaio.

Figura 32 – Curvas de amplificação e curvas de *melting* de diferentes concentrações dos primers dos alvos Delta e Ômicron desenvolvidos.



Onde, vermelho: 100 nM; Verde: 200 nM; Laranja: 400 nM; Azul: 600 nM; Rosa: 800nM.
Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Com base nesses resultados, foi possível determinar a concentração ótima de primers para cada alvo.

5.2.2.3 Otimização da relação primer - sonda

A otimização da proporção de primers e sondas é um aspecto crítico no desenvolvimento de ensaios de PCR, especialmente em testes multiplex. Em geral, a proporção entre primers e sondas é estabelecida em 2:1, ou seja, a concentração dos primers costuma ser aproximadamente o dobro da concentração da sonda. Essa proporção busca garantir a máxima eficiência da reação, promovendo a amplificação específica do DNA ou cDNA alvo sem comprometer a detecção do sinal fluorescente (Bookout *et al.*, 2003; Heid *et al.*, 1996; Ma *et al.*, 2024; Zhang *et al.*, 2024).

No entanto, essa relação pode variar dependendo de diversos fatores. A estabilidade da ligação entre os primers e a fita-alvo pode exigir ajustes na concentração, por exemplo. Primers com menor eficiência de ligação podem necessitar de concentrações mais elevadas para garantir a amplificação adequada (Hindson *et al.*, 2011). Outro fator importante é a temperatura de anelamento dos primers e sondas. Se houver diferenças significativas na temperatura de anelamento, pode ser necessário ajustar suas concentrações para otimizar a eficiência da reação. Além disso, em reações multiplex, onde múltiplos primers e sondas competem pelos reagentes, a concentração pode precisar de ajustes para evitar amplificações preferenciais de determinados alvos (Bustin, 2009; Juul *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2024).

Sendo assim, a otimização da concentração de sondas e seus respectivos primers é fundamental para garantir amplificação eficiente e específica no sistema de sondas de hidrólise. Para isso, diferentes combinações de primers e sondas foram avaliadas, com concentrações variando entre 100 nM e 600 nM para primers e entre 50 nM e 250 nM para sondas, mantendo constantes os demais reagentes da reação.

Os resultados obtidos (**Tabela 13**) evidenciam que a escolha da concentração de primers e sondas influenciou diretamente a sensibilidade e a robustez do ensaio, de acordo com cada alvo analisado. Para o alvo RdRp, a melhor concentração de primers e sondas foi de 100:50, pois apresentou melhor valor médio de CT e menor variação entre as réplicas. O conjunto de primers e sondas desse alvo engloba uma região mais conservada do RNA do SARS-CoV-2, sendo possível escolher uma sequência que confere maior estabilidade à

tríade (Juul *et al.*, 2022). Nas demais concentrações testadas, observou-se um aumento significativo de CT e diversas amostras sem amplificação (ND). Além disso, algumas amostras apresentaram um elevado desvio padrão entre a triplicata, indicando dificuldade de resposta na presença de diferentes cargas virais.

O alvo da variante Gama apresentou melhor eficiência na proporção de 200:250 (primers:sonda), pois apresentou valor médio de CT mais baixo e menor variação entre as réplicas. Também foram observados grande quantidade de resultados não detectados e elevado índice de variação entre as triplicatas em outras proporções. Esse foi o único alvo em que a concentração de sonda foi superior à concentração de primer. Isso pode ser devido ao fluoróforo e quencher da sonda. Estudos anteriores mostram que a eficiência da sonda pode ser afetada por seu fluoróforo e quencher, impactando a relação ideal entre primers e sondas para garantir um bom sinal de detecção (Bustin, 2009).

Tabela 13 – Valores de CT obtidos na determinação da melhor proporção de concentração de primer:sonda para cada alvo.

Alvo	[] primers nM	[] Sonda nM															
		50			Média ± DP	100			Média ± DP	200			Média ± DP	250			Média ± DP
RdRp	100	26	25	24	25,0 ± 0,67	27	29	29	28,3 ± 0,89	33	30	31	31,3 ± 1,11	ND	36	35	35,5 ± 0,50
	200	ND	ND	ND	-	34	31	33	32,7 ± 1,11	32	32	31	31,7 ± 0,44	34	33	34	33,7 ± 0,44
	400	25	27	22	24,7 ± 1,77	33	31	31	31,7 ± 0,89	32	34	35	33,7 ± 1,11	30	31	29	30,0 ± 0,67
	600	26	24	24	24,7 ± 0,89	33	31	31	31,7 ± 0,89	32	35	34	33,7 ± 1,11	30	31	29	30,0 ± 0,67
Gama	100	30	34	36	33,3 ± 2,22	33	34	36	34,3 ± 1,11	ND	N D	ND	-	ND	ND	31	-
	200	30	33	34	32,3 ± 1,56	34	31	39	34,7 ± 2,89	ND	31	ND	-	29	29	31	29,0 ± 0,89
	400	34	36	ND	35,0 ± 1,00	ND	39	ND	-	33	35	39	36,7 ± 2,22	32	32	36	33,3 ± 1,78
	600	36	ND	40	38,0 ± 2,00	ND	35	38	-	31	30	39	33,3 ± 3,77	36	36	39	37,0 ± 1,33

Delta	100	ND	34	ND	-	31	38	ND	-	35	34	36	35,0 ± 0,67	30	34	40	34,7 ± 3,56
	200	31	32	ND	-	30	33	ND	-	32	33	37	34,0 ± 2,00	29	36	39	34,7 ± 3,78
	400	30	24	39	31,0 ± 5,33	29	35	39	34,3 ± 3,56	30	33	31	31,3 ± 1,11	31	34	ND	-
	600	ND	ND	ND	-	31	33	36	33,3 ± 1,77	30	34	38	34,0 ± 2,67	32	31	ND	-
Ômicron	100	33	32	39	34,67 ± 2,89	34	ND	40	-	33	36	38	35,7 ± 1,78	30	34	40	34,7 ± 3,56
	200	ND	32	ND	-	33	33	38	34,7 ± 2,22	33	33	37	34,3 ± 1,78	30	33	ND	-
	400	34	31	39	34,67 ± 2,89	36	36	ND	-	31	33	ND	-	29	32	ND	-
	600	ND	ND	ND	-	33	35	ND	-	30	32	34	32,0 ± 1,33	30	32	36	32,7 ± 2,22

Onde: ND = Não Detectado. DP = Desvio padrão. Negrito: proporção que resultou em menor valor de CT dentro do alvo.

Já o alvo da variante Delta apresentou melhor eficiência na proporção de 400:200 (primers:sonda), pois apresentou melhor valor médio de CT e menor variação entre as réplicas. Em proporções menores e maiores foi observado grande quantidade de resultados não detectáveis e grandes variações entre os CT. Resultado semelhante foi observado com o alvo da variante Ômicron, que apresentou a melhor eficiência na proporção de 600:200 (primers:sonda), pois apresentou melhor valor médio de CT e menor variação entre as réplicas.

Em geral, concentrações muito baixas de sondas (50 e 100 nM) resultaram em um sinal de fluorescência fraco, exceto para o alvo RdRp, aumentando os valores de CT e reduzindo a robustez da detecção. Já concentrações elevadas (250 nM) acabaram aumentando os valores de CT e gerando ruídos que podem dificultar a interpretação dos resultados.

As proporções selecionadas garantiram amplificações consistentes, com fluorescência bem definida e ausência de amplificação inespecífica. A inclusão de controles negativos reforçou a confiabilidade dos dados, confirmando que as condições otimizadas minimizaram artefatos e potenciais fontes de erro experimental. Além disso, a análise das curvas de amplificação mostrou que todas as amostras apresentaram perfis de amplificação característicos, sem desvios inesperados, indicando que as reações foram conduzidas sob condições ideais.

A partir desses achados, foi possível estabelecer um protocolo otimizado para a detecção dos alvos por RT-qPCR utilizando o sistema de sondas de hidrólise. Esse refinamento foi essencial para garantir que a multiplexação subsequente fosse realizada de maneira equilibrada.

5.2.2.4 Determinação da especificidade dos primers e sondas desenvolvidos

Os testes de especificidade demonstraram que os primers e sondas projetados apresentaram elevada especificidade para seus respectivos alvos, sem amplificação cruzada entre variantes.

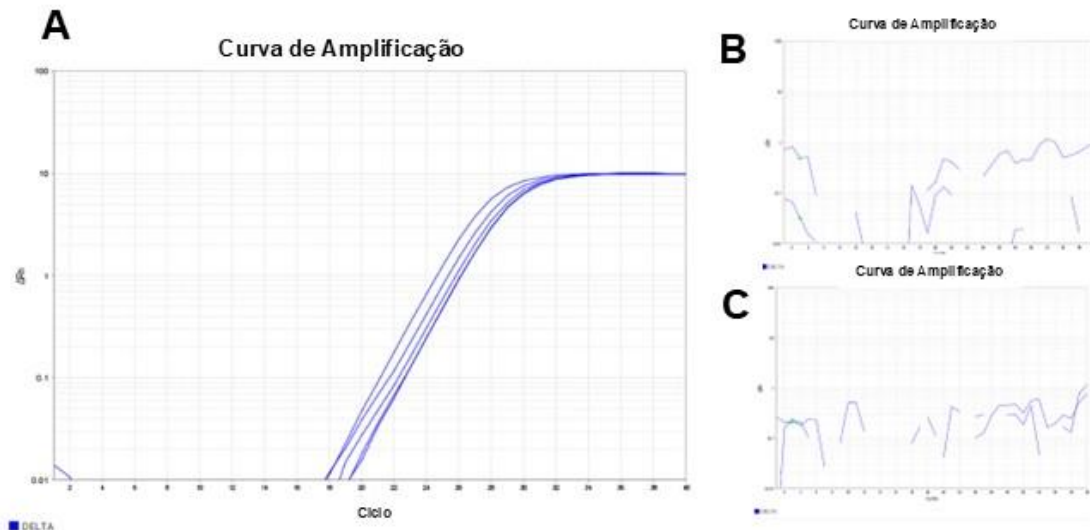
Em relação aos alvos específicos para as variantes Gama, Delta e Ômicron, os primers e sondas apresentaram amplificação apenas para suas respectivas amostras correspondentes, sem amplificação em amostras de outras

variantes. Esses resultados confirmam a especificidade dos oligonucleotídeos, reduzindo o risco de detecção inespecífica ou falso-positivos.

A análise das curvas de amplificação evidenciou perfis característicos bem definidos para cada alvo, sem sinais de amplificação tardia ou ruídos que pudessem comprometer a interpretação dos resultados (**Figuras 33, 34 e 35**). Além disso, os controles negativos não apresentaram sinais de amplificação, reforçando a confiabilidade dos testes.

Na análise dos primers e sonda para a variante Delta, foi observada curvas de amplificação (**Figura 33A**) para as cinco amostras selecionadas no período correspondente a circulação da variante no Brasil. Já para as amostras selecionadas no período correspondente de circulação das variantes Gama (**figura 33B**) e Ômicron (**figura 33C**), não foi observada amplificação para nenhuma amostra.

Figura 33 – Ensaio de especificidade dos primers e sonda desenvolvidos para a variante Delta.

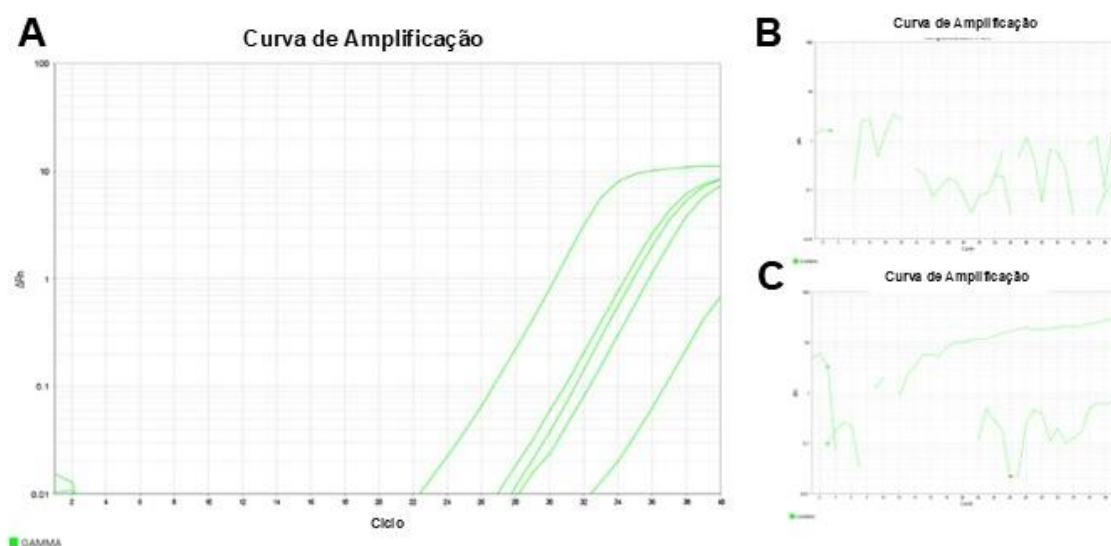


Onde: A – Curvas de amplificação com amostras correspondentes ao período de circulação da variante Delta no Brasil; B - Ausência de curvas de amplificação com amostras correspondentes ao período de circulação da variante Gama no Brasil; C - Ausência de curvas de amplificação com amostras correspondentes ao período de circulação da variante Ômicron no Brasil.

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

O mesmo resultado foi observado para os primers e sondas para as variantes Gama e Ômicron. Cada conjunto de primers e sonda apresentou curvas de amplificação (**Figuras 34A e 35A**) somente para as amostras selecionadas nos períodos correspondentes ao período de circulação das variantes. A análise das outras amostras não apresentou curva de amplificação (**Figuras 34B, 34C, 35B e 35C**).

Figura 34 – Ensaio de especificidade dos primers e sonda desenvolvidos para a variante Gama.



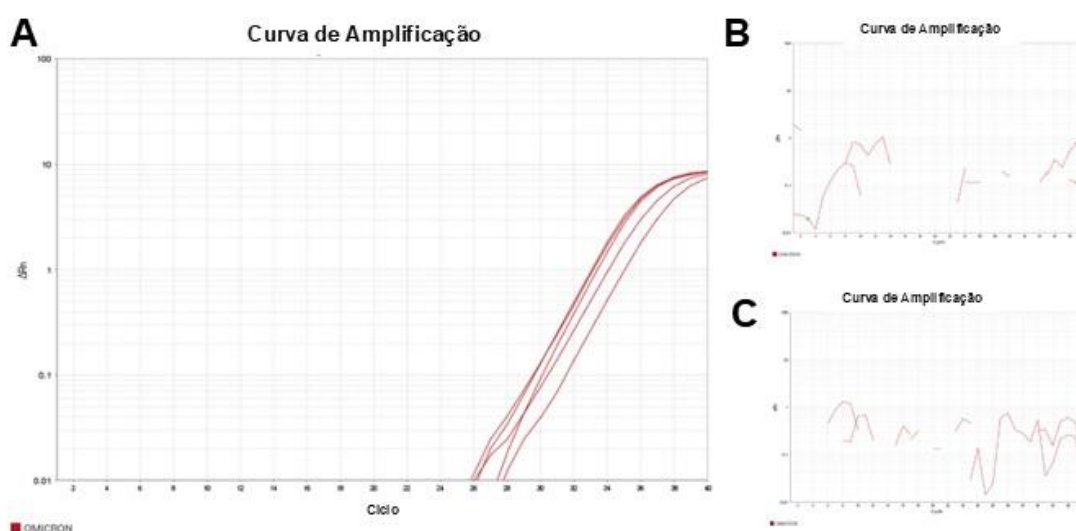
Legenda: A – Curvas de amplificação com amostras correspondentes ao período de circulação da variante Gama no Brasil; B - Ausência de curvas de amplificação com amostras correspondentes ao período de circulação da variante Gama no Brasil; C - Ausência de curvas de amplificação com amostras correspondentes ao período de circulação da variante Ômicron no Brasil.

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

A validação da especificidade dos primers é um passo essencial no desenvolvimento de sistemas de PCR, pois garante a confiabilidade do ensaio e a segurança na detecção do alvo desejado. Em sistemas multiplex, onde múltiplos primers e sondas são utilizados simultaneamente, a verificação da especificidade torna-se ainda mais crítica para evitar interações indesejadas e amplificação inespecífica. A ausência de reatividade cruzada entre os alvos testados confirma a adequação dos oligonucleotídeos para aplicação em detecção molecular de alta precisão e reforçam a viabilidade do protocolo

proposto para a vigilância epidemiológica e monitoramento das variantes do SARS-CoV-2 (Dikdan *et al.*, 2022; Pelegri-Martínez *et al.*, 2022; Dikdan *et al.*, 2022).

Figura 35 – Ensaio de especificidade dos primers e sonda desenvolvidos para a variante Ômicron.



Legenda: A – Curvas de amplificação com amostras correspondentes ao período de circulação da variante Ômicron no Brasil; B - Ausência de curvas de amplificação com amostras correspondentes ao período de circulação da variante Gama no Brasil; C - Ausência de curvas de amplificação com amostras correspondentes ao período de circulação da variante Delta no Brasil.

Fonte: Elaborado pela autora (2025).

5.2.3 Multiplexação do sistema PCR

O desenvolvimento de um sistema de PCR em tempo real com sondas de hidrólise para a detecção simultânea de múltiplas variantes do SARS-CoV-2 representou um desafio técnico significativo. A abordagem metodológica adotada neste estudo baseou-se na multiplexação progressiva dos alvos RdRp, Delta, Ômicron e Gama, assegurando um processo de otimização gradual, controlado e tecnicamente rigoroso. Esse tipo de estratégia tem sido amplamente adotado em estudos recentes para identificação de variantes do SARS-CoV-2, utilizando abordagens de multiplexação em tempo real (Dikdan *et al.*, 2022; Juul *et al.*, 2022).

A etapa inicial concentrou-se na padronização do ensaio em formato duplex, incorporando os alvos RdRp — gene conservado comumente utilizado como controle de presença do vírus — e a mutação característica da variante Delta. A partir dos parâmetros estabelecidos no ensaio singleplex (item 5.2.2.3), foi implementada uma redução de 20% nas concentrações de primers e sondas, visando a mitigação de competição entre alvos e a diminuição de ruídos de fluorescência. Estratégias similares de ajuste de concentração de oligonucleotídeos são descritas na literatura como cruciais para manter a eficiência em ensaios multiplex sem perda de sensibilidade (Juul *et al.*, 2022).

Nos testes realizados com 10 amostras clínicas positivas e selecionadas no pico de circulação da variante Delta, os valores médios de CT foram de $28,63 \pm 5,3$ para RdRp e $29,7 \pm 4,6$ para Delta (**Tabela 14**). A variação observada deve-se à natureza clínica das amostras, que apresentaram diferentes cargas virais. Uma amostra não apresentou amplificação para nenhum dos dois alvos, possivelmente em decorrência do tempo de armazenamento ou carga viral extremamente baixa.

O ensaio duplex foi então aplicado às amostras de variantes não correspondentes, com o objetivo de avaliar a especificidade dos oligonucleotídeos. A análise das 10 amostras provavelmente positivas para variante Gama não mostrou curva de amplificação para o alvo Delta, mais uma vez evidenciando a especificidade do conjunto de primers e sonda desenvolvidos. Para o alvo RdRp, os valores médios de CT dessas amostras foram $32,4 \pm 2,4$ (**Tabela 14**).

Já para as amostras provavelmente positivas para a variante Ômicron, observou-se a amplificação para duas amostras no alvo Delta, porém os CT foram elevados (38 e 41), podendo ser correspondetes a alguma amplificação inespecífica. Para o alvo RdRp, duas amostras não apresentaram amplificação e as demais tiveram valores médio de CT de $32,6 \pm 3,1$ (**Tabela 14**).

A etapa seguinte consistiu na adição sequencial dos alvos relacionados às variantes Ômicron e Gama. Inicialmente, a inclusão do alvo Ômicron foi realizada com redução de 20% da proporção de primers e sondas previamente testada.

Os testes em 10 amostras clínicas positivas para SARS-CoV-2 e provavelmente positivas para a variante Delta demonstraram valores médios de

CT de $28,9 \pm 5,6$ para RdRp, $28,0 \pm 1,8$ para Delta e nenhuma detecção para Ômicron. Das 10 amostras analisadas, 2 delas não apresentaram amplificação para os alvos RdRp (**Tabela 15**).

Tabela 14 – Valores de CT obtidos no sistema duplex RdRp e Delta.

Amostra: provavelmente DELTA											
N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Média ± DP
Delta	ND	35	37	32	23	31	34	24	24	27	$29,7 \pm 4,6$
RdRp	ND	36	37	31	22	ND	32	22	23	26	$28,6 \pm 5,3$
Amostra: provavelmente GAMA											
N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Média ± DP
Delta	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-
RdRp	34	34	33	29	24	33	36	35	32	34	$32,4 \pm 2,4$
Amostra: provavelmente ÔMICRON											
N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Média ± DP
Delta	ND	ND	ND	ND	ND	41	ND	ND	ND	38	$39,5 \pm 1,5$
RdRp	ND	31	35	34	28	36	30	38	29	ND	$32,6 \pm 3,1$

Onde: ND = Não Detectado; DP = Desvio padrão.

A análise das 10 amostras provavelmente positivas para variante Gama não mostrou curva de amplificação para o alvo Delta e nem para o Ômicron. Para o alvo RdRp, os valores médios de CT foram $29,9 \pm 2,7$ (**Tabela 15**).

Já para as 10 amostras provavelmente positivas para a variante Ômicron, observou-se a amplificação para duas amostras no alvo Delta. Como essas amostras também não apresentaram amplificação para o alvo Ômicron, provavelmente sejam de fato amostras da variante Delta, que ainda circulavam na transição para o período epidemiológico de Ômicron. Duas amostras também não amplificaram no alvo RdRp, provavelmente por serem amostras com baixa carga viral, já que a amplificação delas para o alvo da Ômicron, apresentaram altos valores de CT. As demais amostras apresentaram valores médios de CT de $28,6 \pm 2,2$. Para o alvo Ômicron, os valores médios de CT foram de $30,8 \pm 5,0$.

No ensaio quadriplex final, com todos os quatro alvos simultâneos, observou-se manutenção da sensibilidade e especificidade. No sistema quadriplex, as 10 amostras da variante Delta apresentaram valores médios de CT de $28,7 \pm 3,2$ para delta, $29,0 \pm 7,1$ para RdRp e não foram observadas amplificações nos alvos Ômicron e Gama (**Tabela 16**).

Tabela 15 – Valores de CT obtidos no sistema triplex RdRp, Delta e Ômicron.

Amostra: provavelmente DELTA											
N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Média ± DP
Delta	26	28	31	34	27	27	28	25	26	28	$28 \pm 1,8$
RdRp	ND	34	37	35	22	ND	32	23	22	26	$28,8 \pm 5,6$
Ômicron	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-
Amostra: provavelmente GAMA											
N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Média ± DP
Delta	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-
RdRp	30	35	28	23	27	28	34	30	34	30	$29,9 \pm 2,7$
Ômicron	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-
Amostra: provavelmente ÔMICRON											
N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Média ± DP
Delta	ND	ND	ND	ND	ND	37	ND	ND	ND	38	-
RdRp	30	26	30	26	ND	29	25	31	ND	32	$28,6 \pm 2,2$
Ômicron	26	26	36	25	38	ND	26	32	37	ND	$30,8 \pm 5,0$

Onde: ND = Não Detectado; DP = Desvio padrão.

Para as amostras selecionadas da variante Gama, os resultados obtidos foram valores médios de CT de $27,1 \pm 3,2$ para Gama, $30,9 \pm 2,9$ para RdRp e não foram observadas amplificações para os alvos Ômicron e Delta. Uma amostra não amplificou para o alvo Gama, podendo ser correspondente a uma amostra antiga, com perda do material genético, ou de baixa carga viral (**Tabela 16**).

Para as amostras selecionadas provavelmente como da variante Ômicron, no sistema quadriplex também foi observada a amplificação das

mesmas duas amostras descritas anteriormente para o alvo Delta. Os valores médios de CT para o alvo RdRp foi de $30,2 \pm 2,7$ e para o alvo Ômicron foi de $28,6 \pm 5,1$. Uma amostra não amplificou para o alvo Ômicron, sendo essa amostra já descrita anteriormente como possível erro de seleção. Outra amostra (número 10) apresentou amplificação para os alvos Delta e Ômicron, mas elevado CT (=41) para o Ômicron, podendo ser alguma amplificação inespecífica. Nenhuma amostra Ômicron apresentou amplificação para Gama, corroborando a especificidade do ensaio (**Tabela 16**).

Tabela 16 – Valores de CT obtidos no sistema quadriplex RdRp, Delta, Ômicron e Gama.

Amostra: provavelmente DELTA											
N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Média ± DP
Delta	20	38	31	34	28	27	27	28	27	27	$28,7 \pm 3,2$
RdRp	20	39	40	36	23	ND	33	23	23	25	$29,0 \pm 7,1$
Ômicron	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-
Gama	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-
Amostra: provavelmente GAMA											
N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Média ± DP
Delta	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-
RdRp	31	37	29	23	28	29	35	31	34	30	$30,9 \pm 2,9$
Ômicron	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-
Gama	31	34	25	29	22	29	27	26	ND	21	$27,1 \pm 3,2$
Amostra: provavelmente ÔMICRON											
N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Média ± DP
Delta	ND	ND	ND	ND	ND	38	ND	ND	ND	39	-
RdRp	33	30	30	28	34	30	26	25	ND	36	$30,2 \pm 2,7$
Ômicron	25	25	35	23	29	ND	22	26	32	41	$28,6 \pm 5,1$
Gama	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-

Onde: ND = Não Detectado; DP = Desvio padrão;

Importante ressaltar que a inclusão simultânea dos quatro alvos não comprometeu significativamente a sensibilidade do sistema, que se manteve

dentro da faixa esperada para amostras clínicas com cargas virais variadas. Além disso, a ausência de amplificação cruzada entre os alvos específicos reafirma a robustez e a especificidade da metodologia adotada.

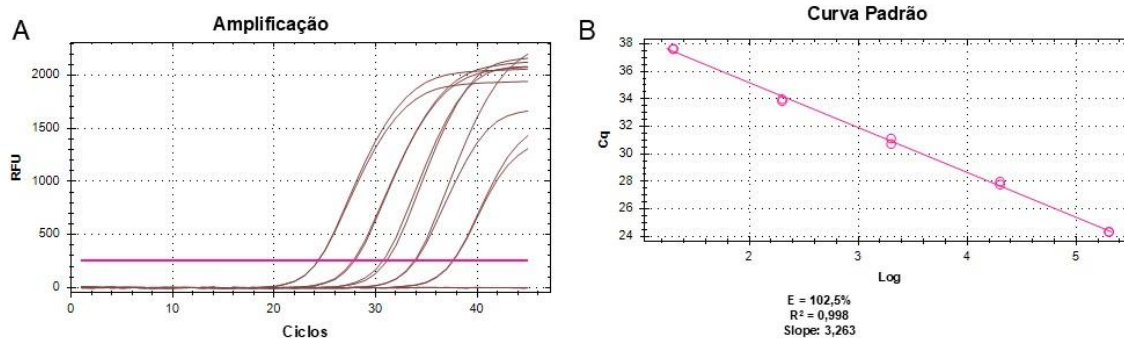
A multiplexação em RT-qPCR exige um ajuste criterioso entre eficiência, sensibilidade e especificidade. A estratégia de inclusão sequencial adotada permitiu identificar e mitigar interferências de forma progressiva, garantindo melhor performance do sistema a cada etapa. A escolha por concentrações assimétricas de oligonucleotídeos — notadamente as menores concentrações para o alvo RdRp — foi crucial para evitar competição por reagentes e reduzir a formação de dímeros, contribuindo para a estabilidade do sistema (Dikdan *et al.*, 2022; Juul *et al.*, 2022).

Do ponto de vista da vigilância genômica, o ensaio quadriplex desenvolvido representa uma ferramenta promissora, permitindo a triagem molecular rápida e de baixo custo para variantes de preocupação. Tal ferramenta pode ser particularmente útil em contextos de vigilância em saúde pública, onde o sequenciamento de todas as amostras não é viável.

5.2.3.1 Determinação do limite de detecção

A avaliação do limite de detecção dos primers e sondas específicos para as variantes SARS-CoV-2 foi conduzida por meio da construção de uma curva padrão a partir de diluições seriadas do controle positivo 2019-ncov_n_positive control (IDT), partindo de $2,0 \times 10^5$ até $2,0 \times 10^0$ cópias/ μ L, utilizando o kit Allplex™ SARS-CoV-2 (Seegene) (**Figura 36**). Em seguida, foram selecionadas amostras dos períodos correspondentes a circulação da variante Delta, Gama e Ômicron, cujos valores de CT se enquadravam na curva obtida na concentração de 10^4 cópias/ μ L. As amostras foram diluídas e analisadas para definir os limites de detecção de cada alvo.

Figura 36 – Curva padrão e curvas de amplificação obtidas com controle positivo 2019-ncov_n_positive control

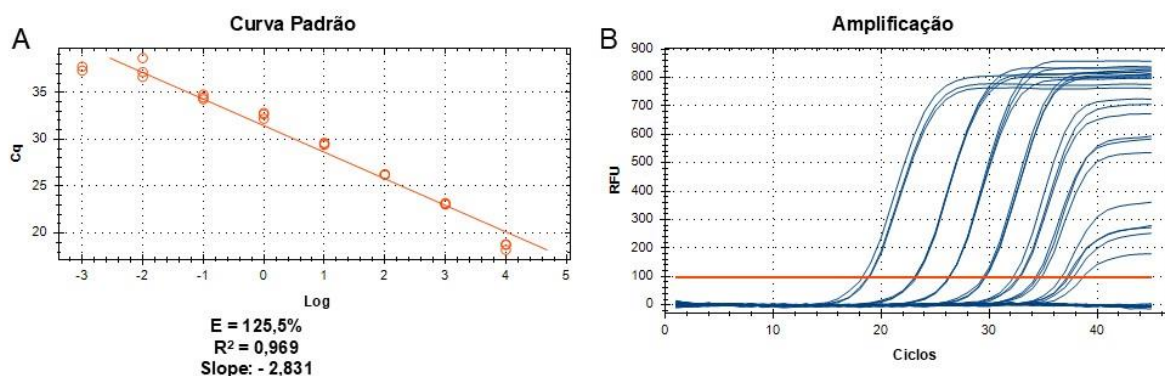


Legenda: A – Curvas de amplificação obtidas; B – Curva padrão obtida.

Fonte: elaborado pela autora (2025).

O alvo Delta apresentou curva padrão com regressão linear de coeficiente de determinação (R^2) de 0,969, indicando uma correlação satisfatória entre a concentração de RNA alvo e os valores de quantificação (**Figura 37**). Apesar de o valor de R^2 estar ligeiramente abaixo do ideal ($\geq 0,98$), ele ainda pode ser considerado aceitável em ensaios exploratórios e em testes envolvendo alvos virais com baixa estabilidade ou menor expressão relativa (Kuypers; Jerome, 2020; Taylor *et al.*, 2019). O slope da curva foi de $-2,831$, o que corresponde a uma eficiência de amplificação estimada em 125,5%. O valor negativo mais acentuado do slope em comparação ao ideal contribui para essa elevação na eficiência observada.

Figura 37 – Ensaio de limite de detecção do alvo Delta.

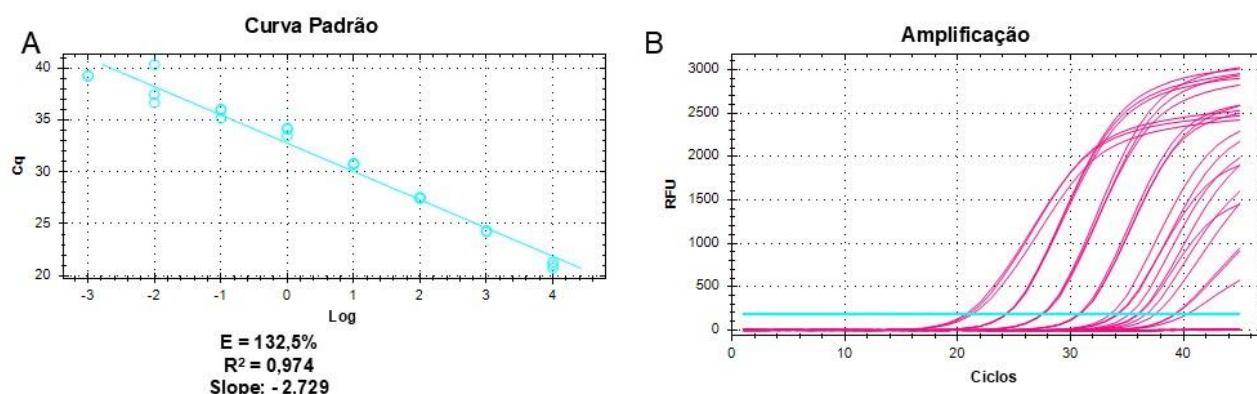


Legenda: A – Curva padrão obtida; B – Curvas de amplificação obtidas.

Fonte: elaborado pela autora (2025).

A curva padrão gerada para o alvo RdRp apresentou coeficiente de determinação (R^2) de 0,97, valor que demonstra uma alta correlação linear entre a concentração de RNA e os valores de ciclo de quantificação (**Figura 38**). Segundo as *MIQE Guidelines* (Bustin *et al.*, 2009), valores de R^2 acima de 0,98 são ideais, mas valores superiores a 0,95 ainda são considerados aceitáveis em condições experimentais reais, especialmente quando se utilizam múltiplas diluições em triplicata. Portanto, o R^2 observado é satisfatório e indica boa reprodutibilidade dos dados. O slope da curva foi de $-2,729$, resultando em uma eficiência de amplificação de 132,5% (**Figura 38**), novamente indicando uma curva com slope mais negativo que o ideal, refletindo amplificação mais acelerada. A eficiência de amplificação superior a 130% observada pode estar relacionada à alta afinidade dos primers ou à presença de artefatos técnicos, conforme discutido por Lippi e colaboradores (2020).

Figura 38 – Ensaio de limite de detecção do alvo RdRp.



Onde: A – Curva padrão obtida; B – Curvas de amplificação obtidas.

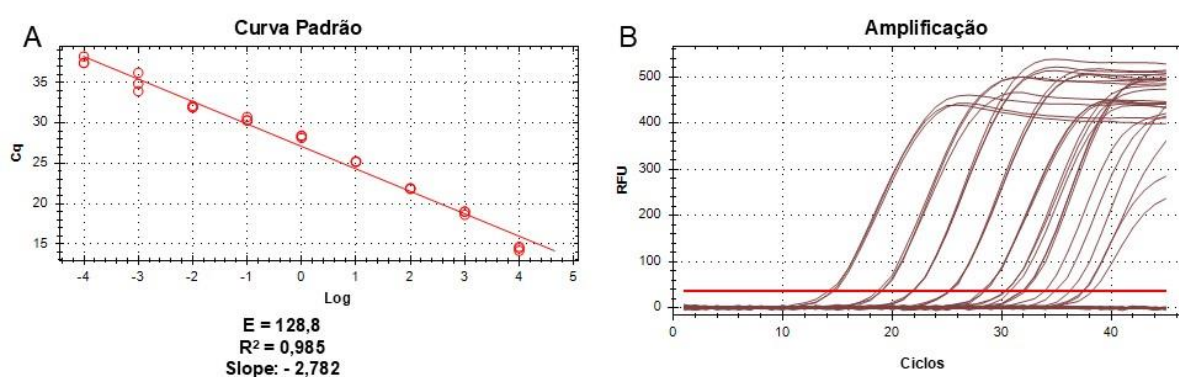
Fonte: elaborado pela autora (2025).

A curva padrão gerada para o alvo específico da variante Ômicron apresentou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,985, indicando excelente correlação linear entre a concentração de RNA alvo e os valores de ciclo de quantificação (**Figura 39**). Segundo as *MIQE Guidelines* (Bustin *et al.*, 2009), valores de R^2 acima de 0,98 são altamente desejáveis, especialmente para ensaios quantitativos. Esse alto R^2 reforça a reprodutibilidade e consistência do ensaio, o que é fundamental para diagnósticos de alta confiabilidade,

principalmente quando se trata de variantes de preocupação (VOC) como a Ômicron (Chan *et al.*, 2020; WHO, 2022).

O slope da curva foi de $-2,782$, o que resultou em uma eficiência de amplificação de 128,8% (**Figura 39**), valor que ultrapassa o intervalo ideal de 90% a 110% preconizado para reações de RT-qPCR (Bustin *et al.*, 2009; Huggett *et al.*, 2013). A inclinação mais acentuada (mais negativa) da curva pode estar associada a alta afinidade dos primers ou à presença de artefatos técnicos, mas a linearidade e a reprodutibilidade permitem considerar o desempenho como adequado para detecção qualitativa.

Figura 39 – Ensaio de limite de detecção do alvo Ômicron.



Onde: A – Curva padrão obtida; B – Curvas de amplificação obtidas.

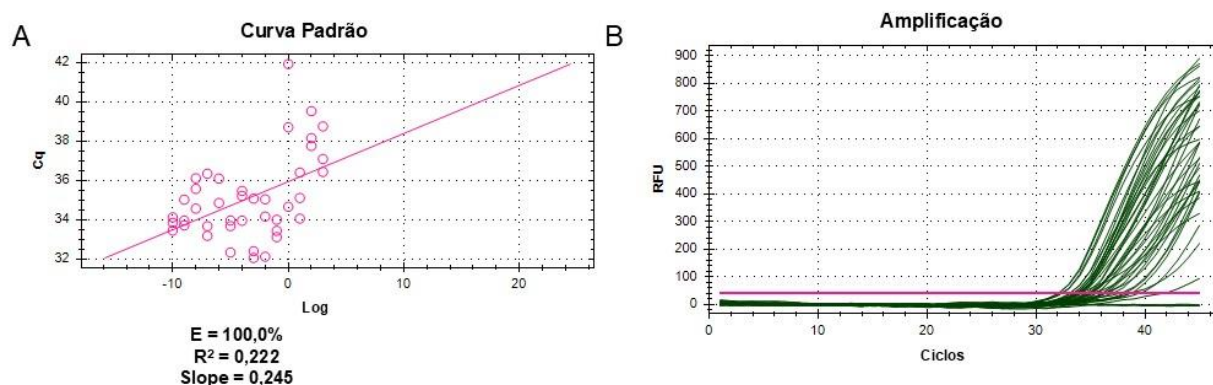
Fonte: elaborado pela autora (2025).

O alvo Gama apresentou curva padrão com coeficiente de determinação (R^2) de apenas 0,22, evidenciando uma correlação fraca entre a concentração de RNA e os valores de CT obtidos (**Figura 40**). O *slope* calculado foi de 0,245 — valor incoerente com a dinâmica logarítmica de amplificação esperada em ensaios de PCR em tempo real. Embora a eficiência tenha sido estimada em 100%, esse número não é confiável, já que apenas *slopes* entre $-3,6$ e $-3,1$ são considerados adequados para cálculo válido de eficiência, conforme as Diretrizes MIQE (Bustin *et al.*, 2009). A baixa performance do alvo pode ser atribuída a diversos fatores técnicos, como baixa afinidade dos primers, fluorescência de fundo ou reação fora da faixa dinâmica ideal do ensaio (Vogels *et al.*, 2020). No entanto, uma análise mais aprofundada sugere que o problema pode estar relacionado a interações moleculares indesejadas entre os

oligonucleotídeos utilizados no sistema quadriplex. A **Tabela 10** mostra que os primers forward e reverse de Gama, bem como sua sonda, apresentaram valores de energia livre (ΔG) elevadas em módulo ($> 8,0$ kcal/mol) em interações cruzadas com oligonucleotídeos de outros alvos, especialmente Delta e Ômicron. Esses valores indicam uma tendência à formação de dímeros de primers e dímeros de sondas, que podem gerar amplificação inespecífica ou aumento de fluorescência basal. Esses dímeros comprometem a precisão da curva padrão e podem justificar a aparente eficiência elevada e o baixo R^2 observados. Embora o valor de ΔG recomendado pelo IDT para minimizar interações cruzadas seja inferior a -9 kcal/mol, os dados aqui apresentados sugerem que esse limiar pode ser insuficiente para sistemas multiplex com alta complexidade, como o quadriplex utilizado (Huggett *et al.*, 2013; IDT, 2023b; Taylor *et al.*, 2019), sugerindo um limite de ΔG igual a -8 kcal/mol.

Apesar dessas limitações, observou-se amplificação consistente nas diluições mais concentradas para o alvo Gama, o que sugere que ele ainda pode ser útil como marcador qualitativo, para testes de presença/ausência em aplicações clínicas ou epidemiológicas (WHO, 2022).

Figura 40 – Ensaio de limite de detecção do alvo Gama.



Onde: A – Curva padrão obtida; B – Curvas de amplificação obtidas.

Fonte: elaborado pela autora (2025).

A eficiência ideal para ensaios de PCR em tempo real deve estar entre 90% e 110%, conforme estabelecido pelas Diretrizes MIQE (Bustin *et al.*, 2009). Eficiências acima desse intervalo sugerem que a amplificação ocorre em um

ritmo mais acelerado que o esperado, o que pode ser indicativo de artefatos técnicos, como:

- Formação de dímeros de primers ou estruturas secundárias que facilitam a amplificação inespecífica (Borillo; Kagan; Marlowe; 2022; Lippi; Simundic; Plebani, 2020; Taylor *et al.*, 2019);
- Contaminação cruzada ou carryover de amplificação anterior, especialmente quando as curvas padrão utilizam materiais sintéticos altamente concentrados (Borillo; Kagan; Marlowe; 2022; Lippi; Simundic; Plebani, 2020; Taylor *et al.*, 2019);
- Erros de pipetagem em diluições muito baixas, que podem introduzir variabilidade entre as replicatas (Borillo; Kagan; Marlowe; 2022; Lippi; Simundic; Plebani, 2020; Taylor *et al.*, 2019);
- Alta afinidade dos primers com a região-alvo, levando a uma amplificação excessivamente eficiente, o que pode ser desejável em determinadas condições, mas requer validação adicional (Taylor *et al.*, 2010).

Eficiências elevadas podem ser aceitáveis desde que haja reprodutibilidade, ausência de amplificação nos controles negativos e boa linearidade. É importante destacar que, em ensaios multiplex, pequenas diferenças de eficiência podem introduzir vieses na amplificação, favorecendo determinados alvos (Huggett *et al.*, 2013). Assim, para detecção qualitativa ou triagem molecular, o desempenho dos alvos Delta, RdRp e Ômicron é aceitável. Contudo, para quantificação absoluta, recomenda-se a otimização das reações para manter a eficiência dentro dos padrões ideais.

Apesar dos resultados das curvas não terem atingido o ideal para todos os alvos, a detecção consistente foi observada até a diluição de $1,0 \times 10^{-3}$ cópia/ μ L no sistema multiplex (**Tabela 17**), estabelecendo este valor como o limite de detecção desse sistema. Abaixo dessa concentração, observou-se perda de reprodutibilidade, com amplificação irregular entre as replicatas. Segundo Corman e colaboradores (2020), a definição do limite de detecção em ensaios moleculares é crítica. A capacidade de detectar quantidades mínimas de RNA viral torna o ensaio altamente sensível e adequado para triagem populacional e vigilância epidemiológica.

Os resultados observados neste estudo apresentam desempenho comparável ou superior ao de protocolos internacionais de referência, como os

do CDC (2020) e do Charité Institute of Virology, com limites de detecção de $1,0 \times 10^{-2}$ cópia/ μ L. A elevada sensibilidade pode estar associada à qualidade do RNA sintético utilizado, à alta afinidade dos primers e à ausência de interferências nos controles negativos (Taylor *et al.*, 2019). Mesmo com eficiências elevadas, a alta linearidade observada e a ausência de amplificações inespecíficas mantêm a validade do sistema analítico (Bustin *et al.*, 2009).

Todos os ensaios foram acompanhados de controles negativos, que não apresentaram sinal de amplificação, confirmando a especificidade dos primers e a ausência de contaminação ou reações cruzadas, aspecto crucial para evitar falsos positivos e garantir segurança diagnóstica.

Em síntese, os dados obtidos demonstram que o conjunto de primers e sondas avaliado apresenta bom desempenho analítico, sendo adequado para aplicações clínicas e epidemiológicas. A capacidade de detecção em concentrações mínimas e a reprodutibilidade entre replicatas posicionam o ensaio como ferramenta altamente sensível e confiável (Tom; Mina, 2020; Wölfel *et al.*, 2020), especialmente quando integrado a protocolos multiplex para vigilância genômica e detecção precoce de variantes do SARS-CoV-2.

Tabela 17 – Valores de CT obtidos nos ensaios de determinação de limite de detecção dos primers e sondas desenvolvidos

Alvo	Delta				Gama				RdRp				Ômicron			
Cópias / μL	10^4	10^4	10^4	Média $\pm$ DP	10^4	10^4	10^4	Média $\pm$ DP	10^4	10^4	10^4	Média $\pm$ DP	10^4	10^4	10^4	Média $\pm$ DP
N	18,83	18,22	18,75	23,13 $\pm$ 0,06	ND	ND	ND	ND	21,31	20,72	21,03	21,02 $\pm$ 0,20	14,66	14,17	14,48	14,44 $\pm$ 0,18
Cópias / μL	10^3	10^3	10^3	Média $\pm$ DP	10^3	10^3	10^3	Média $\pm$ DP	10^3	10^3	10^3	Média $\pm$ DP	10^3	10^3	10^3	Média $\pm$ DP
N	23,07	23,22	23,09	26,25 $\pm$ 0,02	38,88	36,60	37,20	37,56 $\pm$ 0,88	24,30	24,33	24,25	24,29 $\pm$ 0,03	19,03	19,02	18,63	18,89 $\pm$ 0,18
Cópias / μL	10^2	10^2	10^2	Média $\pm$ DP	10^2	10^2	10^2	Média $\pm$ DP	10^2	10^2	10^2	Média $\pm$ DP	10^2	10^2	10^2	Média $\pm$ DP
N	26,24	26,28	26,22	29,53 $\pm$ 0,08	39,69	38,26	37,94	38,63 $\pm$ 0,71	27,58	27,46	27,47	27,50 $\pm$ 0,05	21,90	21,83	21,92	21,88 $\pm$ 0,04
Cópias / μL	10^1	10^1	10^1	Média $\pm$ DP	10^1	10^1	10^1	Média $\pm$ DP	10^1	10^1	10^1	Média $\pm$ DP	10^1	10^1	10^1	Média $\pm$ DP
N	29,41	29,62	29,56	32,56 $\pm$ 0,24	34,18	35,33	36,52	35,34 $\pm$ 0,78	30,70	30,83	30,84	30,79 $\pm$ 0,06	25,17	25,23	25,23	25,21 $\pm$ 0,03
Cópias / μL	10^0	10^0	10^0	Média $\pm$ DP	10^0	10^0	10^0	Média $\pm$ DP	10^0	10^0	10^0	Média $\pm$ DP	10^0	10^0	10^0	Média $\pm$ DP
N	32,82	32,20	32,67	34,50 $\pm$ 0,18	42,11	34,79	38,87	38,59 $\pm$ 2,53	34,13	33,52	34,25	33,97 $\pm$ 0,30	28,45	28,36	28,15	28,32 $\pm$ 0,11
Cópias / μL	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}	Média $\pm$ DP	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}	Média $\pm$ DP	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}	Média $\pm$ DP	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}	Média $\pm$ DP
N	34,27	34,46	34,78	37,49 $\pm$ 0,78	33,52	33,18	34,07	33,59 $\pm$ 0,32	36,09	35,97	35,21	35,76 $\pm$ 0,36	30,30	30,35	30,76	30,47 $\pm$ 0,19
Cópias / μL	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	Média $\pm$ DP	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	Média $\pm$ DP	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	Média $\pm$ DP	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	Média $\pm$ DP
N	37,17	38,66	36,65	37,54 $\pm$ 0,22	34,24	35,11	32,18	33,84 $\pm$ 1,11	36,71	40,37	37,51	38,20 $\pm$ 1,45	31,91	31,95	32,13	32,00 $\pm$ 0,09
Cópias / μL	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	Média $\pm$ DP	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	Média $\pm$ DP	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	Média $\pm$ DP	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	Média $\pm$ DP
N	37,32	ND	37,75	ND	32,49	32,12	35,15	33,25 $\pm$ 1,26	39,31	39,26	ND	39,29 $\pm$ 0,03	33,94	34,86	36,22	35,01 $\pm$ 0,81
Cópias / μL	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	Média $\pm$ DP	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	Média $\pm$ DP	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	Média $\pm$ DP	10^{-4}	10^{-4}	10^{-4}	Média $\pm$ DP
N	ND	ND	ND	ND	35,56	35,29	34,04	34,96 $\pm$ 0,62	ND	ND	ND	ND	37,45	37,42	38,25	37,71 $\pm$ 0,36
Cópias / μL	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	Média $\pm$ DP	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	Média $\pm$ DP	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	Média $\pm$ DP	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	Média $\pm$ DP

N	ND	ND	ND	ND	34,04	32,42	33,76	33,41 ± 0,66	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cópias / µL	10⁻⁶	10⁻⁶	10⁻⁶	Média ± DP	10⁻⁶	10⁻⁶	10⁻⁶	Média ± DP	10⁻⁶	10⁻⁶	10⁻⁶	Média ± DP	10⁻⁶	10⁻⁶	10⁻⁶	Média ± DP
N	ND	ND	ND	ND	34,97	ND	36,19	35,58 ± 0,61	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cópias / µL	10⁻⁷	10⁻⁷	10⁻⁷	Média ± DP	10⁻⁷	10⁻⁷	10⁻⁷	Média ± DP	10⁻⁷	10⁻⁷	10⁻⁷	Média ± DP	10⁻⁷	10⁻⁷	10⁻⁷	Média ± DP
N	ND	ND	ND	ND	33,77	33,24	36,44	34,48 ± 1,30	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cópias / µL	10⁻⁸	10⁻⁸	10⁻⁸	Média ± DP	10⁻⁸	10⁻⁸	10⁻⁸	Média ± DP	10⁻⁸	10⁻⁸	10⁻⁸	Média ± DP	10⁻⁸	10⁻⁸	10⁻⁸	Média ± DP
N	ND	ND	ND	ND	36,19	34,65	35,66	35,50 ± 0,57	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cópias / µL	10⁻⁹	10⁻⁹	10⁻⁹	Média ± DP	10⁻⁹	10⁻⁹	10⁻⁹	Média ± DP	10⁻⁹	10⁻⁹	10⁻⁹	Média ± DP	10⁻⁹	10⁻⁹	10⁻⁹	Média ± DP
N	ND	ND	ND	ND	33,8	35,09	34,03	34,31 ± 0,52	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cópias / µL	10⁻¹⁰	10⁻¹⁰	10⁻¹⁰	Média ± DP	10⁻¹⁰	10⁻¹⁰	10⁻¹⁰	Média ± DP	10⁻¹⁰	10⁻¹⁰	10⁻¹⁰	Média ± DP	10⁻¹⁰	10⁻¹⁰	10⁻¹⁰	Média ± DP
N	ND	ND	ND	ND	33,52	33,93	34,19	33,88 ± 0,24	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Onde: ND = Não Detectado; DP = Desvio padrão.

6 CONCLUSÃO

A extração de ácidos nucleicos é uma etapa de suma importância em experimentos de biologia molecular pois possui custo elevado e grande geração de resíduo, podendo ser fonte de contaminação na análise. Vale ressaltar que, durante a pandemia de SARS-CoV-2, essa etapa levou milhares de operadores a exaustão e desgaste devido a repetibilidade do processo. Por isso, o desenvolvimento de tecnologias que permitam a rápida extração de ácidos nucleicos traz vantagens enormes. O reagente de extração rápida desenvolvido mostrou-se capaz de extrair e preservar ácidos nucleicos de diferentes matrizes biológicas, em um tempo médio de extração de 07 minutos por amostra e com utilização mínima de material plástico. Além disso, a utilização do reagente de extração rápida desenvolvido mostrou-se eficaz e não interferiu nos resultados de PCR. Em última análise, a transferência do reagente é de importância singular para o desenvolvimento do sistema produtivo de reagentes para diagnóstico no Brasil, estimulando o Complexo Industrial em Saúde do país. O reagente teve a sua tecnologia transferida e hoje é comercializado com o nome de Pi-Lise Nucleic Acid Extraction Reagent.

O reagente desenvolvido ainda pode ser utilizado para a extração de diversas matrizes biológicas diferentes, mas precisa de ajustes específicos na metodologia de acordo com a complexidade da matriz. Além disso, como perspectiva futura, devido à facilidade de manuseio para extração e preservação de ácidos nucleicos com a utilização do reagente, é possível que ele seja aplicado a instrumentos automatizados, agregando ainda maior celeridade e eficiência às etapas de extração.

Assim como a extração, a análise por RT-qPCR também ganhou grande importância na pandemia de COVID-19. Enquanto diversos exames eram realizados repetidamente utilizando sistemas *singleplex*, novos sistemas de detecção *multiplex* trouxeram avanços significativos em tempo e custo dos ensaios diagnósticos. Associado a isso, a rápida transformação do vírus SARS-CoV-2 expôs a necessidade de vigilância genômica e acompanhamento contínuo das mutações virais. Neste contexto, o desenvolvimento de um kit *multiplex* para detecção simultânea de variantes do SARS-CoV-2 representa um

marco importante, não apenas pela capacidade de resposta rápida frente às emergências sanitárias, mas também pela complexidade envolvida na seleção e combinação de diferentes primers e sondas em uma única reação, garantindo sensibilidade e especificidade.

A validação desse sistema *multiplex* demonstrou sua viabilidade técnica e potencial de aplicação em larga escala, contribuindo diretamente para a vigilância epidemiológica no país. O conjunto das tecnologias desenvolvidas nesta tese — reagente de extração rápida e kit de detecção *multiplex* — reforça o papel da pesquisa nacional na construção da autonomia tecnológica em diagnóstico molecular e no fortalecimento da resposta brasileira a emergências em saúde pública.

REFERÊNCIAS

ABBAS, H. F.; IHN, A. M. Evaluation three methods of the extraction and purification of bacterial DNA of Gram positive and Gram negative bacteria. **World Journal of Experimental Biosciences**, v. 4, p. 62-65, 2016.

AGILENT TECHNOLOGIES. RNA Integrity Number (RIN) – User Guide. Publication number: 5990-9613E, 2016.

AL-ADSANI, A. M.; BARHOUSH, S. A.; BASTAKI, N. K.; AL-BUSTAN, S. A.; AL-QATTAN, K. K. Comparing and Optimizing RNA Extraction from the Pancreas of Diabetic and Healthy Rats for Gene Expression Analyses. **Genes**, v. 13, n. 5, 2022.

AL-SOUD, W. A.; RÅDSTRÖM, P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 2, p. 485-493, 2001.

ALI, N.; RAMPAZZO, R. C. P.; COSTA, A. D. T.; KRIEGER, M. A. Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. **BioMed Research International**, 2017.

ALI, R.; SHAMSAH, A.; SHAFIUL, H.; RANJIT, S.; RUCHI, T.; YASHPAL, M.; KULDEEP, D.; IQBAL, Y.; BONILLA-ALDANA, K.; RODRÍGUEZ-MORALES, A. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV: a comparative overview. **Le Infezioni in Medicina**, v. 2, p.174-84, 2020.

ARCHER, M. J.; LIN, B.; WANG, Z.; STENGER, D.A. Magnetic bead-based solid phase for selective extraction of genomic DNA. **Analytical Biochemistry**, v. 355, n.2, p. 285-297, 2006.

ARORA, P.; ZHANG, L.; KRÜGER, N.; ROCHA, C.; SIDAROVICH, A.; SCHULZ, S.; KEMPF, A.; GRAICHEN, L.; MOLDENHAUER, A. S.; COSSMANN, A.; DOPFER-JABLONKA, A.; BEHRENS, G. M. N.; JÄCK, H. M.; PÖHLMANN, S.; HOFFMANN, M. SARS-COV-2 omicron sublineages show comparable cell entry but differential neutralization by therapeutic antibodies. **Cell Host & Microbe**, v. 30, n. 8, p. 1103-1111, 2022.

ARYA, M.; SHERGILL, I. S.; WILLIAMSON, M.; GOMMERSALL, L.; ARYA, N.; PATEL, H. R. Basic principles of real-time quantitative PCR. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 5, n. 2, p. 209-219, 2005.

BADEN, L. R.; EL SAHLY, H. M.; ESSINK, B.; KOTLOFF, K.; FREY, S.; NOVAK, R.; DIEMERT, D.; SPECTOR, S. A.; ROUPHAEL, N.; CREECH, C. B.; MCGETTIGAN, J.; KHETAN, S.; SEGALL, N.; SOLIS, J.; BROSZ, A.; FIERRO, C.; SCHWARTZ, H.; NEUZIL, K.; COREY, L.; GILBERT, P.; JANES, H.; FOLLMANN, D.; MAROVICH, M.; MASCOLA, J.; POLAKOWSKI, L.; LEDGERWOOD, J.; GRAHAM, B. S.; BENNETT, H.; PAJON, R.; KNIGHTLY, C.; LEAV, B.; DENG, W.; ZHOU, H.; HAN, S.; IVARSSON, M.; MILLER, J.; ZAKS, T.; COVE STUDY GROUP. Efficacy and Safety of the mRNA-

1273 SARS-CoV-2 Vaccine. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 5, p. 403-416, 2021.

BADDOUR, M. M.; ABUELKHEIR, M. M.; FATANI, A. J. Comparison of mecA polymerase chain reaction with phenotypic methods for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Current microbiology**, v. 55, p. 473-479, 2007.

BARTLETT, J. M. S.; STIRLING, D. A Short History of the Polymerase Chain Reaction". **PCR Protocols**, v. 226, p. 3-6, 2003.

BASSETTI, M.; VENA, A.; GIACOBBE, D. R. The novel Chinese coronavirus (2019-nCoV) infections: challenges for fighting the storm. **European Journal of Clinical Investigation**, 2020.

BASU, C. Preface. PCR primer design. **Methods in Molecular Biology**, v. 1275, 2015.

BLASTN, 2023. Software **BlastN**. Disponível em: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch. Acesso em 05 ago 2023.

BEI, Y.; VRTIS, K. B.; BORGARO, J. G.; LANGHORST, B. W.; NICHOLS, N. M.; The Ômicron variant mutation at position 28,311 in the SARS-CoV-2 N gene does not perturb CDC N1 target detection. **medRxiv**, v. 12, 2021.

BERENSMEIER, S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n.3, p. 495-504, 2006.

BERKHOUT, B.; HERRERA-CARRILLO, E. SARS-CoV-2 evolution: on the sudden appearance of the Ômicron variant. **Journal of Virology**, v. 96, n. 7, 2022.

BIANCHI, D. W. Fetal DNA in maternal plasma: the plot thickens and the placental barrier thins. **The American Journal of Human Genetics**, v. 62, p. 763-764, 1998.

BOOKOUT, A. L.; MANGELSDORF, D. J. Quantitative real-time PCR protocol for analysis of nuclear receptor signaling pathways. **Nuclear Receptor Signaling**, v. 1, 2003.

BORILLO, G. A.; KAGAN, R. M.; MARLOWE, E. M. Rapid and Accurate Identification of SARS-CoV-2 Variants Using Real Time PCR Assays. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 2022.

BROCK, T. D.; FREEZE, H. *Thermus aquaticus*, a nonsporulating extreme thermophile. **Journal of Bacteriology**, v. 98, n.1, p. 289-297, 1969.

BROWN, S. S.; CHEN, Y. W.; WANG, M.; CLIPSON, A.; OCHOA, E.; DU, M. Q. PrimerPooler: automated primer pooling to prepare library for targeted sequencing. **Biology Methods and Protocols**, v. 2, n. 1, 2017.

BUSTIN, S. A. **The PCR revolution: basic technologies and applications**. 1ª edição. Cambridge: Cambridge University Press, 2009.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, p. 169–193, 2000.

BUSTIN, S. AZ de Quantitative PCR. **IUL Biotechnology Series**, International University Line, La Jolla, Califórnia. 2004.

BUSTIN, S. A.; MUELLER, R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. **Clinical Science**, v. 109, n. 4, p. 365-379, 2005.

BUSTIN, S.; HUGGETT, J. qPCR primer design revisited. **Biomolecular Detection and Quantification**, v. 14, p. 19-28, 2017.

CALLAWAY, E.; LEDFORD, H. How bad is Omicron? What scientists know so far. **Nature**, v. 600, n. 7888, p. 197-199, 2021.

CAO, Y.; WANG, J.; JIAN, F.; XIAO, T.; SONG, W.; YISIMAYI, A.; HUANG, W.; LI, Q.; WANG, P.; AN, R.; WANG, J.; WANG, Y.; NIU, X.; YANG, S.; LIANG, H.; SUN, H.; LI, T.; YU, Y.; CUI, Q.; LIU, S.; YANG, X.; DU, S.; ZHANG, Z.; HAO, X.; SHAO, F.; JIN, R.; WANG, X.; XIAO, J.; WANG, Y.; XIE, X. S. Ómicron escapes the majority of existing SARS-CoV-2 neutralizing antibodies. **Nature**, v. 602, p. 657–663, 2022.

CATTELAN, Alexandre José; DALL'AGNOL, Amélio. The rapid soybean growth in Brazil. **OCL**, v. 25, n. 1, p. D102, 2018.

CBI, 2020. **Manual de Instruções**. Disponível em <https://cbiscientific.com/easy-plex-sexagem-fetal/>. Acesso em 15 de fev. 2020.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention, 2020. **CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel**. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/134922/download>. Acesso em 6 abr. 2025.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention, 2019. **CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Primers and Probes**.

Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-probes.html>. Acesso em 06 ago 2023.

CHAN, J. F.; YIP, C. C.; TO, K. K.; TANG, T. H.; WONG, S. C.; LEUNG, K. H.; FUNG, A. Y.; NG, A. C.; ZOU, Z.; TSOI, H. W.; CHOI, G. K.; TAM, A. R.; CHENG, V. C.; CHAN, K. H.; TSANG, O. T.; YUEN, K. Y. Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/HeI real-time reverse transcription-PCR assay validated in vitro and with clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n. 5, p. e00310-20, 2020.

CHEN, J. Pathogenicity and transmissibility of 2019-nCoV-A quick overview and comparison with other emerging viruses. **Microbes and Infection**, v. 22, p. 69-71, 2020.

CHEN, J.; WANG, R.; WANG, M.; WEI, G. W. Mutations strengthened SARS-CoV-2 infectivity. **Journal of Molecular Biology**, v. 432, p. 5212-5226, 2020.

CHOMCZYNSKI P, SACCHI N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochemistry**, v. 162, n. 1, p. 156-159, 1987.

CHUANG, L.Y.; Y.H.; CHENG; YANG, C.H. Specific primer design for the polymerase chain reaction. **Biotechnology**, v. 35, n. 10, p. 1541-1549, 2013.

COELHO, S. M. O.; MORAES, R. A. M.; SOARES, L. C.; PEREIRA, I. A.; GOMES, L. P.; SOUZA, M. M. S. Mapeamento do perfil de resistência e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* oxacilina-resistentes isolados de espécies humanas e animais. **Ciência rural**, v. 37, p. 195-200, 2007.

COOPERSMITH, C. M.; ANTONELLI, M.; BAUER, S. R.; DEUTSCHMAN, C. S.; EVANS, L. E.; FERRER, R.; HELLMAN, J.; JOG, S.; KESECIOGLU, J.; KISSOON, N.; MARTIN-LOECHES, I.; NUNNALLY, M. E.; PRESCOTT, H. C.; RHODES, A.; TALMOR, D.; TISSIERES, P.; DE BACKER, D. The Surviving Sepsis Campaign: Research Priorities for Coronavirus Disease 2019 in Critici Illness. **Critical Care Medicine**, v. 49, n. 4, p. 598-622, 2021.

CORONAVIRUS BRASIL, 2025. **Painel Coronavírus**. Disponível em <https://covid.saude.gov.br/>. Acesso em 22 abr. 2025.

COSTA, R.; SILVA, A.; SIMON, G.; BESSA, O.; DIAS, M. Agronomic performance of transgenic soybean cultivars in Brazilian Cerrado. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 41, 2019.

COVARIANTS. Disponível em: <https://covariants.org/>. Acesso em 23 jul 2023.

CHUA, A. C.; CUNNINGHAM, J.; MOUSSY, F.; PERKINS, M. D.; FORMENTY, P. The Case for Improved Diagnostic Tools to Control Ebola Virus Disease in

West Africa and How to Get There. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 6, 2015.

DAVIES, N. G.; ABBOTT, S.; BARNARD, R. C.; JARVIS, C. I.; KUCHARSKI, A. J.; MUNDAY, J. D.; PEARSON, C. A. B.; RUSSELL, T. W.; TULLY, D. C.; WASHBURNE, A. D.; WENSELEERS, T.; GIMMA, A.; WAITES, W.; WONG, K. L. M.; VAN ZANDVOORT, K.; SILVERMAN, J. D.; CMMID COVID-19 WORKING GROUP; COVID-19 GENOMICS UK (COG-UK) CONSORTIUM; DIAZ-ORDAZ, K.; KEOGH, R.; EGGO, R. M.; FUNK, S.; JIT, M.; ATKINS, K. E.; EDMUNDS, W. J. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. **Science**, v. 372, n. 6538, 2021.

DENG, X.; GARCIA-KNIGHT, M. A.; KHALID, M. M.; SERVELLITA, V.; WANG, C.; MORRIS, M. K.; SOTOMAYOR-GONZÁLEZ, A.; GLASNER, D. R.; REYES, K. R.; GLIWA, A. S.; REDDY, N. P.; SANCHEZ SAN MARTIN, C.; FEDERMAN, S.; CHENG, J.; BALCEREK, J.; TAYLOR, J.; STREITHORST, J. A.; MILLER, S.; SREEKUMAR, B.; CHEN, P. Y.; SCHULZE-GAHMEN, U.; TAHA, T. Y.; HAYASHI, J. M.; SIMONEAU, C. R.; KUMAR, G. R.; MCMAHON, S.; LIDSKY, P. V.; XIAO, Y.; HEMARAJATA, P.; GREEN, N. M.; ESPINOSA, A.; KATH, C.; HAW, M.; BELL, J.; HACKER, J. K.; HANSON, C.; WADFORD, D. A.; ANAYA, C.; FERGUSON, D.; FRANKINO, P. A.; SHIVRAM, H.; LAREAU, L. F.; WYMAN, S. K.; OTT, M.; ANDINO, R.; CHIU, C. Y. Transmission, infectivity, and neutralization of a spike L452R SARS-CoV-2 variant. **Cell**, v. 184, n. 13, p. 3426-3437, 2021.

DIKDAN, R. J.; MARRAS, S. A. E.; FIELD, A. P.; BROWNLEE, A.; CIRONI, A.; HILL, D. A.; TYAGI, S. Multiplex PCR Assays for Identifying all Major Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Variants. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 24, n. 4, p. 309-319, 2022.

DUNDAS, N.; LEOS, N. K.; MITUI, M.; REVELL, P.; ROGERS, B.B. Comparison of automated nucleic acid extraction methods with manual extraction. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 10, n. 4, p. 311 – 316, 2008.

ERLICH, H. A. **PCR technology**. New York: Stockton press, v. 246, 1989.

ESSER, K.; MARX, W. H.; LISOWSKY, T. Nucleic acid-free matrix: regeneration of DNA binding columns. **Biotechniques**, v. 39, n. 3, p.270–271, 2005.

FARIA, N. R.; MELLAN, T. A.; WHITTAKER, C.; CLARO, I. M.; CANDIDO, D. D. S.; MISHRA, S.; CRISPIM, M. A. E.; SALES, F. C. S.; HAWRYLUK, I.; MCCRONE, J. T.; HULSWIT, R. J. G.; FRANCO, L. A. M.; RAMUNDO, M. S.; DE JESUS, J. G.; ANDRADE, P. S.; COLETTI, T. M.; FERREIRA, G. M.; SILVA, C. A. M.; MANULI, E. R.; PEREIRA, R. H. M.; PEIXOTO, P. S.; KRAEMER, M. U. G.; GABURO, N. JR.; CAMILO, C. D. C.; HOELTGEBAUM, H.; SOUZA, W. M.; ROCHA, E. C.; DE SOUZA, L. M.; DE PINHO, M. C.; ARAUJO, L. J. T.; MALTA, F. S. V.; DE LIMA, A. B.; SILVA, J. D. P.; ZAULI, D. A. G.; FERREIRA, A. C. S.; SCHNEKENBERG, R. P.; LAYDON, D. J.; WALKER, P. G. T.; SCHLÜTER, H. M.; DOS SANTOS, A. L. P.; VIDAL, M. S.;

DEL CARO, V. S.; FILHO, R. M. F.; DOS SANTOS, H. M.; AGUIAR, R. S.; PROENÇA-MODENA, J. L.; NELSON, B.; HAY, J. A.; MONOD, M.; MISCOURIDOU, X.; COUPLAND, H.; SONABEND, R.; VOLLMER, M.; GANDY, A.; PRETE, C. A. JR.; NASCIMENTO, V. H.; SUCHARD, M. A.; BOWDEN, T. A.; POND, S. L. K.; WU, C. H.; RATMANN, O.; FERGUSON, N. M.; DYE, C.; LOMAN, N. J.; LEMEY, P.; RAMBAUT, A.; FRAIJI, N. A.; CARVALHO, M. D. P. S. S.; PYBUS, O. G.; FLAXMAN, S.; BHATT, S.; SABINO, E. C. Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. **Science**, v. 372, n. 6544, p. 815-821, 2021.

FINNING, K. M.; CHITTY, L. S. Non-invasive fetal sex determination: impact on clinical practice. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, p. 69-75, 2008.

FIOCRUCZ, 2023. **Genomahcov**. Disponível em: <https://www.genomahcov.fiocruz.br/dashboard-pt/>. Acesso em: 05 ago 2023.

FLEIGE, S.; PFAFFL, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2-3, p. 126-139, 2006.

FREEMAN, M.; LINZ, L. QuickExtract – Rapid and efficient extraction of PCR-ready genomic DNA from plant and seed samples. **Application Note Biosearch Technologies**, 2019.

GAHAN, P. B.; SWAMINATHAN, R. Circulating nucleic acids in plasma and serum: recent developments. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1137, n. 1, p. 1-6, 2008.

GANDHI, R. T.; LYNCH, J. B.; DEL RIO, C. Mild or Moderate Covid-19. **The New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 18, p. 1757-1766, 2020.

GANESH, B.; RAJAKUMAR, T.; MALATHI, M.; MANIKANDAN, N.; NAGARAJ, J.; SANTHAKUMAR, A.; ELANGO, A.; MALIK, Y. Epidemiology and pathobiology of SARS-CoV-2 (COVID-19) in comparison with SARS, MERS: An updated overview of current knowledge and future perspectives. **Clinical Epidemiology and Global Health**, v. 10, 2021.

GISAID. **Covariant**, 2021. Disponível em: <https://covariants.org/variants/21K.Ômicron>. Acesso em 23 jul 2023.

GOLDBERG, S. Mechanical/physical methods of cell distribution and tissue homogenization. **Methods in Molecular Biology**, v. 1295, p.1-20, 2015.

GREEN, K.; WINTER, A.; DICKINSON, R.; GRAZIADIO, S.; WOLFF, R.; MALLETT, S.; ALLEN, A. J. What tests could potentially be used for the screening diagnosis and monitoring of Covid-19 and what are their advantages and disadvantages? **The Centre for Evidence-Based Medicine**, 2020.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. Optimizing Primer and Probe Concentrations for Use in Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Assays. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 10, 2018.

GUPTA, S. L.; JAISWAL, R. K. An Assessment of the Bivalent Vaccine as a Second Booster for COVID-19. **Vaccines**, v. 29, n.1, 2022.

HAQUE, S. K. M.; ASHWAQ O.; SARIEF, A.; MOHAMED, A. K. A. J. A comprehensive review about SARS-CoV-2. *Future Virology*, V. 15, N. 9, P. 625-648, 2020.

HAO, X.; LIANG, Z.; JIAXIN, D.; JIAKUAN, P.; HONGXIA, D.; XIN, Z.; TAIWEN, L.; QIANMING, CHEN. High expression of ACE2 receptor of 2019nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. **International Journal of Oral Science**, v. 12, n. 8, 2020.

HASHEMIPETROUDI, S. H.; NEMATZADEH, G.; AHMADIAN, G.; YAMCHI, A.; KUHLMANN, M. Assessment of DNA Contamination in RNA Samples Based on Ribosomal DNA. *Journal of Visualized Experiments*, v. 131, 2018.

HATTAB, D.; AMER, M. F. A.; AL-ALAMI, Z. M.; BAKHTIAR, A. SARS-CoV-2 journey: from alpha variant to omicron and its sub-variants. **Infection**, v. 52, n. 3, p. 767-786, 2024.

HE, X.; HONG, W.; PAN, X.; LU, G.; WEI, X. SARS-CoV-2 Ômicron variant: Characteristics and prevention. **MedComm**, v. 2, n. 4, p. 838-845, 2020.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M.; Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, n.10, p. 986-994, 1996.

HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; WALSH, P. S.; GRIFFITH, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 413-417, 1992.

HINDSON, B. J.; NESS, K. D.; MASQUELIER, D. A.; BELGRADER, P.; HEREDIA, N. J.; MAKAREWICZ, A. J.; BRIGHT, I. J.; LUCERO, M. Y.; HIDDESEN, A. L.; LEGLER, T. C.; KITANO, T. K.; HODEL, M. R.; PETERSEN, J. F.; WYATT, P. W.; STEENBLOCK, E. R.; SHAH, P. H.; BOUSSE, L. J.; TROUP, C. B.; MELLEN, J. C.; WITTMANN, D. K.; ERNDT, N. G.; CAULEY, T. H.; KOEHLER, R. T.; SO, A. P.; DUBE, S.; ROSE, K. A.; MONTESCLAROS, L.; WANG, S.; STUMBO, D. P.; HODGES, S. P.; ROMINE, S.; MILANOVICH, F. P.; WHITE, H. E.; REGAN, J. F.; KARLIN-NEUMANN, G. A.; HINDSON, C. M.; SAXONOV, S.; COLSTON, B. W. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 22, p. 8604 – 8610, 2011.

HUGGETT, J. F.; FOY, C. A.; BENES, V.; EMSLIE, K.; GARSON, J. A.; HAYNES, R.; HELLEMANS, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R. D.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTWER, C. T.; BUSTIN, S. A. The digital MIQE guidelines: Minimum Information for Publication

of Quantitative Digital PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 892–902, 2013.

HULLEY, E. N.; THARMALINGAM, S.; ZARNKE, A.; BOREHAM, D. R. Development and validation of probe-based multiplex real-time PCR assays for the rapid and accurate detection of freshwater fish species. **PLos One**, v 01, 2019.

IBMP, 2020. Instrução de Uso Kit IBMP Biomol ZDC-Zika, Dengue e Chikungunya. Disponível em <https://www.ibmp.org.br/wp-content/uploads/2025/01/INF-047-15-Kit-IBMP-Biomol-ZDC.pdf>. Acesso em 15 de fev. 2020.

IDT. Software OligoAnalyzer v.3.1. Disponível em <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>. Acesso em 25 jul 2023b.

IDT. How do I use the OligoAnalyzer™ Tool to check for possible hairpins and dimers formed by my oligo?. Disponível em <https://www.idtdna.com/pages/support/faqs/how-do-i-use-the-oligoanalyzer-tool-to-analyze-possible-hairpins-and-dimers-formed-by-my-oligo>. Acesso em 30 ago 2023a.

IMBEAUD, S.; GRAUDENS, E.; BOULANGER, V.; BARLET, X.; ZABORSKI, P.; EVENO, E.; MUELLER, O.; SCHROEDER, A.; AUFRAY, C. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n; 6, 2005.

JACOFISKY, D.; JACOFISKY, E. M.; JACOFISKY, M. Understanding Antibody Testing for COVID-19. **Journal of Arthroplasty**, v. 37, n. 7S, p. S74-S81, 2020.

JAEGER, L. H.; NASCIMENTO, T. C.; ROCHA, F. D.; VILELA, F. M. P.; DUQUE, A. P. D. N.; SILVA, L. M.; RIANI, L. R.; MOREIRA, J. P.; CHAGAS, J. M. A.; PEREIRA, T. V.; PERCHES, C. G. P.; WATANABE, A. S. A.; VICCINI, L. F.; SILVÉRIO, M. S.; CORRÊA, J. O. D. A.; PEREIRA-JUNIOR, O. D. S.; PITTELLA, F. Adjusting RT-qPCR conditions to avoid unspecific amplification in SARS-CoV-2 diagnosis. **International Journal of Infectious Disease**, v. 102, p. 437-439, 2021.

JAMISON, D. A.; ANAND NARAYANAN, S.; TROVÃO, N. S.; GUARNIERI, J. W.; TOPPER, M. J.; MORAES-VIEIRA, P. M.; ZAKSAS, V.; SINGH, K. K.; WURTELE, E. S.; BEHESHTI, A. A comprehensive SARS-CoV-2 and COVID-19 review, Part 1: Intracellular overdrive for SARS-CoV-2 infection. **European Journal of Human Genetics**, v. 30, p. 889–898, 2022.

JARROUS, Nayef. Roles of RNase P and its subunits. **Trends in Genetics**, v. 33, n. 9, p. 594-603, 2017.

JAVIERRE MIRANDA, A. P.; HERCE, P. A.; MARCO, J. J. G.; ¿Está justificada la cuarta dosis para el SARS-CoV-2? Entre la necesidad y la evidencia.

Atencion Primaria, v. 54, n.12, 2022.

JIN, L.; LI, Z.; ZHANG, X.; LI, J.; ZHU, F. CoronaVac: A review of efficacy, safety, and immunogenicity of the inactivated vaccine against SARS-CoV-2.

Human Vaccines & Immunotherapeutics, v.18, n. 6, 2022.

JOTHIKUMAR, P.; HILL, V.; NARAYANAN, J. Design of FRET-TaqMan probes for multiplex real-time PCR using an internal positive control. **Biotechniques**, v. 46, n. 7, p. 519 – 524, 2009.

JUUL, S., SPIEGELHAUER, M.R., PETERSEN, M.N.; FLUGT, K. K.; HANSEN, N. V.; LARSEN, H.; JENSEN, P. B.; CHRISTENSEN, U. B.; PETERSEN, R. K. FRIIS-HANSEN, L. Validation and advantages of using novel RT-qPCR *melting* curve analysis assays for the identification of SARS-CoV-2 variants. **Scientific Reports**, v. 12, 2022.

KADRI, K. **Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications.** Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science. IntechOpen; 2020.

KHAN, I. U.; YADAV, J. S. Development of a single-tube, cell lysisbased, genus-specific PCR method for rapid identification of mycobacteria: optimization of cell lysis, PCR primers and conditions, and restriction pattern analysis. **J Clin Microbiol**, v.42, p. 453-457, 2004.

KHORANA, H.G.; AGARWAL, P.; BESMER, H.; BUCHI, M.H.; CARUTHERS, P.J.; CASHION, M.; FRIDKIN, E.; JAY, K.; KLEPPE, R.; KLEPPE, A.; KUMAR, P.C.; LOEWEN, R.C.; MILLER, K.; MINAMOTO, A.; PANET, U.L.; RAJBHANDARY, B.; RAMAMOORTHY, T.; SEKIYA, T.; TAKEYA, VAN DE SANDE, J.H. Total synthesis of the structural gene for the precursor of a tyrosine suppressor transfer RNA from *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v.251, n. 3, p. 565-70, 1976.

KIM, D.; LEE, J.; YANG, J.; KIM, J. W.; KIM, V. N.; CHANG, H. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell*, v. 181, n. 4, p. 914-921, 2020.

KOMIAZYK, M.; WALORY, J.; KOZINSKA, A.; WASKO, I.; BARANIAK, A. Impact of the Nucleic Acid Extraction Method and the RT-qPCR Assay on SARS-CoV-2 Detection in Low-Viral Samples. **Diagnostics**, v. 11, 2021.

KORBER, B.; FISCHER, W. M.; GNANAKARAN, S.; YOON, H.; THEILER, J.; ABFALTERER, W.; HENGARTNER, N.; GIORGI, E. E.; BHATTACHARYA, T.; FOLEY, B.; HASTIE, K. M.; PARKER, M. D.; PARTRIDGE, D. G.; EVANS, C. M.; FREEMAN, T. M.; DE SILVA, T. I.; SHEFFIELD COVID-19 GENOMICS GROUP; MCDANAL, C.; PEREZ, L. G.; TANG, H.; MOON-WALKER, A.; WHELAN, S. P.; LABRANCHE, C. C.; SAPHIRE, E. O.; MONTEFIORI, D. C.

Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. **Cell**, v. 182,n4, p. 812-827, 2020.

KNOLL, M. D.; WONODI, C. Oxford-AstraZeneca COVID-19 vaccine efficacy. **The Lancet**, v. 397, n. 10269, p. 72-74, 2021.

KUYPERS, J.; JEROME, K. R. Applications of Digital PCR for Clinical Microbiology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n. 6, p. e00259-20, 2020.

KUNG, Y.; CHUANG, C.; CHEN, Y.; YANG, H.; LI, H.; CHEN, C.; JANAPATLA, R. P.; CHEN, C.; SHIH, S.; CHIU, C. Worldwide SARS-CoV-2 Omicron variant infection: Emerging sub-variants and future vaccination perspectives. **Journal of the Formosan Medical Association**, 2024.

LADHA, A.; JOUNG, J.; ABUDAYYEH, O. O.; GOOTENBERG, J. S.; ZHANG, F. A 5-min RNA preparation method for COVID-19 detection with RT-qPCR. **medRxiv**, 2020.

LAI, M. M.; CAVANAGH, D. The molecular biology of coronaviruses. **Advances in Virus Research**, v. 48, 1997.

LAWYER, F. C.; STOFFEL, S.; SAIKI, R. K.; MYAMBO, K.; DRUMMOND, R.; GELFAND, D. H. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. **Biological Chemistry**, v. 264, p. 6427-6437, 1989.

LI, D.; ZHANG, J.; LI, J. Primer design for quantitative real-time PCR for the emergente Coronavirus SARS-CoV-2. **Theranostics**, v. 10, p. 7150-7162, 2020.

LI, X.; GENG, M; PENG, Y.; MENG, Y.; LU, S. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. X. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, 2020.

LI, J.; , CHENG, R.; BIAN, Z.; NIU, J.; XIA, J.; MAO, G.; LIU, H.;WU, C.; HAO, C. Development of multiplex allele-specific RT-qPCR assays for differentiation of SARS-CoV-2 Omicron subvariants. **Applied Genetics and Molecular Biotechnology**, v. 108, n. 35, 2024.

LICÍNIO, C. O. L.; AYRES, F. M. The use of real time PCR for arboviruses diagnostics: integrative review. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 57, p. e2882021, 2021.

LIMA-CAMARA, T. N. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. **Revista de saude publica**, v. 50, 2016.

LIPPI, G.; SIMUNDIC, A. M.; PLEBANI, M. Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19). **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 58, n. 7, p. 1070–1076, 2020.

LIU, Y.; ZHU, Z.; DU, J.; ZHU, X.; PAN, C.; YIN, C.; SUN, W. Development of multiplex real-time PCR for simultaneous detection of SARS-CoV-2, CCoV, and FIPV. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 11, 2024.

LU, J.; DU PLESSIS, L.; LIU, Z.; HILL, V.; KANG, M.; LIN, H.; SUN, J.; FRANÇOIS, S.; KRAEMER, M. U. G.; FARIA, N. R.; MCCRONE, J. T.; PENG, J.; XIONG, Q.; YUAN, R.; ZENG, L.; ZHOU, P.; LIANG, C.; YI, L.; LIU, J.; XIAO, J.; HU, J.; LIU, T.; MA, W.; LI, W.; SU, J.; ZHENG, H.; PENG, B.; FANG, S.; SU, W.; LI, K.; SUN, R.; BAI, R.; TANG, X.; LIANG, M.; QUICK, J.; SONG, T.; RAMBAUT, A.; LOMAN, N.; RAGHWANI, J.; PYBUS, O. G.; KE, C. Genomic Epidemiology of SARS-CoV-2 in Guangdong Province, China. **Cell**, v. 181, n. 5, p. 997-1003, 2020.

LO, Y. M.; TEIN, M. S.; LAU, T. K.; HAINES, C. J.; LEUNG, T. N.; POON, P. M.; WAINSCOT, J. S.; JOHNSON, P. J.; CHANG, A. M.; HJELM, N. M. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *The American Journal of Human Genetics*, v. 62, n. 4, p. 768-775, 1998.

LUDWIG, 2023. **Manual de Instruções**, 2023.

LUNDBLAD, E. W.; ALTMAN, S. Inhibition of gene expression by RNase P. **New Biotechnology**, v.27, n. 3, p. 212-221, 2010.

MA, L.; ZHU, H.; JIANG, Y.; KONG, X.; GAO, P.; LIU, Y.; ZHAO, M.; DENG, G.; CAO, Y. Development of a Novel Multiplex PCR Method for the Rapid Detection of SARS-CoV-2, Influenza A Virus, and Influenza B Virus. **International Journal Anal Chemistry**, v. 29, 2024.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 6, p. 1292-1305, 2002.

MARKOULATOS, P.; SIAFAKAS, N.; MONCANY, M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 16, n. 1, p. 47-51, 2002.

MARSON, F. A. L.; ORTEGA, M. M. COVID-19 in Brazil. **Pulmonology**, v. 26, n. 4, p. 241-244, 2020.

MEAGHER, R. J.; PRIYE, A.; LIGHT, Y. K.; HUANG, C.; WANG, E. Impact of primer dimers and self-amplifying hairpins on reverse transcription loop-mediated isothermal amplification detection of viral RNA. **Analyst**, v. 143, n. 8, p. 1924-1933, 2018.

MENG, B.; KEMP, S. A.; PAPA, G.; DATIR, R.; FERREIRA, I. A. T. M.; MARELLI, S.; HARVEY, W. T.; LYTRAS, S.; MOHAMED, A.; GALLO, G.; THAKUR, N.; COLLIER, D. A.; MLCOCHOVA, P.; COVID-19 GENOMICS UK (COG-UK) CONSORTIUM; DUNCAN, L. M.; CARABELLI, A. M.; KENYON, J. C.; LEVER, A. M.; DE MARCO, A.; SALIBA, C.; CULAP, K.; CAMERONI, E.; MATHESON, N. J.; PICCOLI, L.; CORTI, D.; JAMES, L. C.; ROBERTSON, D.

L.; BAILEY, D.; GUPTA, R. K. Recurrent emergence of SARS-CoV-2 spike deletion H69/V70 and its role in the Alpha variant B.1.1.7. **Cell Reports**, v. 35, n. 13, 2021.

MOHAMMAD, I. Different types of PCR A review paper. **Global Scientific Journal**, v. 9, p. 758-768, 2021.

MORRISON, T. B.; WEIS, J. J.; WITTEWER, C. T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. **BioTechniques**, v. 24, p. 954–958. 1998.

MULLIUS, K. FALLONA, F.; SCHARF, S. SAIKI, R; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*? The polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 51, p. 263-273, 1986.

NETPRIMER, 2023. Software **Premier Biosoft**, Disponível em <http://premierbiosoft.com/>. Acesso em: 10 jun 2023.

NCBI, 2023. **National Center for Biotechnology Information**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 05 ago 2023.

NOVA TECNOLOGIA. Manual de uso do Brazol, 2022.

NYBO, K. DNA and General PCR Methods: PCR Primer Design. **Biotechniques**, v. 46, n. 7, 2009.

PELEGRI-MARTINEZ, E.; GURUCEAGA, X.; MARTIN-SOUTO, L.; ABAD-DIAZ-DE-CERIO, A.; REMENTERIA, A.; DOMINGUEZ-MONEDERO, A.; GALLEGO, M.; MARTINEZ, O.; ARANA-ARRI, E.; ARANZAMENDI, M.; RAMIREZ-GARCIA, A. Flexible multiplex PCR to detect SARS-CoV-2, coronavirus OC43 and influenza A virus in nasopharyngeal swab samples. **Journal of Applied Microbiology**, v. 133, n. 6, p. 3534-3545, 2022.

PELT-VERKUIL, E.; BELKUM, A.; JOHN, P. A brief comparison between *in vivo* DNA replication and in vitro PCR amplification. In: PELT-VERKUIL, E. **Principles and Technical Aspects of PCR Amplification**. Netherlands: Springer; 2008. pp. 9-15.

POLACK F. P.; THOMAS, S. J.; KITCHIN, N.; ABSALON, J.; GURTMAN, A.; LOCKHART, S.; PEREZ, J. L.; PÉREZ MARC, G.; MOREIRA, E. D.; ZERBINI, C.; BAILEY, R.; SWANSON, K. A.; ROYCHOUDHURY, S.; KOURY, K.; LI, P.; KALINA, W. V.; COOPER, D.; FRENCK, R. W. JR.; HAMMITT, L. L.; TÜRECI, Ö.; NELL, H.; SCHAEFER, A.; ÜNAL, S.; TRESNAN, D. B.; MATHER, S.; DORMITZER, P. R.; ŞAHİN, U.; JANSEN, K. U.; GRUBER, W. C. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. **The New England Journal of Medicine**, v. 383, n27, p. 2603-2615, 2020.

PRITHIVIRAJ, J.; VINCENT, H.; JOTHIKUMAR N. Design of FRET-TaqMan probes for multiplex real-time PCR using an internal positive control. **BioTechniques**, v. 46, n. 7, p. 519-524, 2009.

PUBLIC HEALTH ENGLAND. **Investigation of novel SARS-CoV-2 variant: variant of concern 202012/01: technical briefing 3**. Disponível em: https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/959360/Variant_of_Concern_VOC_202012_01_Technical_Briefing_3.pdf. Acesso em: 23 jul. 2023.

RABINOW, P. **Making PCR: A story of Biotechnology**. Chicago: University of Chicago Press, 1996.

RAHMAN, T, UDDIN, M.; SULTANA, R.; MOUE, A.; SETU, M. Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. **Anwer Khan Modern Medical College Journal**, v. 4, p. 30-36, 2013.

REBRIKOV, D.V.; TROFIMOV, D.Y. Real-time PCR: A review of approaches to data analysis. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, p. 455–463, 2006.

REN, S. Y.; WANG, W. B.; GAO, R. D.; ZHOU, A. M. Ômicron variant (B.1.1.529) of SARS-CoV-2: mutation, infectivity, transmission, and vaccine resistance. **World Journal of Clinical Cases**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2022.

RODRÍGUEZ, A.; RODRÍGUEZ, M.; CÓRDOBA, J.J.; ANDRADE, M.J. Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. In: BASU, C. **PCR Primer Design: Methods in Molecular Biology**, New York: Humana Press, v. 1275, 2015.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; HERNÁNDEZ, M. Real-Time PCR in Food Science: Introduction. **Current Issues Molecular Biology**, v. 15, p. 25-38, 2013.

ROSENBLUM, H. G.; GEE, J.; LIU, R.; MARQUEZ, P. L.; ZHANG, B.; STRID, P.; ABARA, W. E.; MCNEIL, M. M.; MYERS, T. R.; HAUSE, A. M.; SU, J. R.; MARKOWITZ, L. E.; SHIMABUKURO, T. T.; SHAY, D. K. Safety of mRNA vaccines administered during the initial 6 months of the US COVID-19 vaccination programme: an observational study of reports to the Vaccine Adverse Event Reporting System and v-safe. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 22, n. 6, p. 802-812, 2022.

SABINO, E. C.; BUSS, L. F.; CARVALHO, M. P. S.; PRETE, C. A. JR.; CRISPIM, M. A. E.; FRAIJ, N. A.; PEREIRA, R. H. M.; PARAG, K. V.; DA SILVA PEIXOTO, P.; KRAEMER, M. U. G.; OIKAWA, M. K.; SALOMON, T.; CUCUNUBA, Z. M.; CASTRO, M. C.; DE SOUZA SANTOS, A. A.; NASCIMENTO, V. H.; PEREIRA, H. S.; FERGUSON, N. M.; PYBUS, O. G.; KUCHARSKI, A.; BUSCH, M. P.; DYE, C.; FARIA, N. R. Resurgence of COVID-19 in Manaus, Brazil, despite high seroprevalence. **Lancet**, v. 455, p.397:452, 2021.

SADOFF, J.; GRAY, G.; VANDEBOSCH, A.; CÁRDENAS, V.; SHUKAREV, G.; GRINSZTEJN, B.; GOEPFERT, P. A.; TRUYERS, C.; FENNEMA, H.; SPIESSENS, B.; OFFERGELD, K.; SCHEPER, G.; TAYLOR, K. L.; ROBB, M. L.; TREANOR, J.; BAROUCH, D. H.; STODDARD, J.; RYSER, M. F.; MAROVICH, M. A.; NEUZIL, K. M.; COREY, L.; CAUWENBERGHS, N.; TANNER, T.; HARDT, K.; RUIZ-GUIÑAZÚ, J.; LE GARS, M.; SCHUITEMAKER, H.; VAN HOOFF, J.; STRUYF, F.; DOUGUIH, M. Safety and Efficacy of Single-Dose Ad26.COV2.S Vaccine against Covid-19. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 23, p. 2187-2201, 2021.

SAITO, A.; IRIE, T.; SUZUKI, R.; MAEMURA, T.; NASSER, H.; URIU, K.; KOSUGI, Y.; SHIRAKAWA, K.; SADAMASU, K.; KIMURA, I.; ITO, J.; WU, J.; IWATSUKI-HORIMOTO, K.; ITO, M.; YAMAYOSHI, S.; LOEBER, S.; TSUDA, M.; WANG, L.; OZONO, S.; BUTLERTANAKA, E. P.; TANAKA, Y. L.; SHIMIZU, R.; SHIMIZU, K.; YOSHIMATSU, K.; KAWABATA, R.; SAKAGUCHI, T.; TOKUNAGA, K.; YOSHIDA, I.; ASAKURA, H.; NAGASHIMA, M.; KAZUMA, Y.; NOMURA, R.; HORISAWA, Y.; YOSHIMURA, K.; TAKAORI-KONDO, A.; IMAI M.; GENOTYPE TO PHENOTYPE JAPAN (G2P-JAPAN) CONSORTIUM; TANAKA, S.; NAKAGAWA, S.; IKEDA, T.; FUKUHARA, T.; KAWAOKA, Y.; SATO, K. Enhanced fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Delta P681R mutation. **Nature**, v. 602, n. 7896, p. 300-306, 2022.

SAYERS, E. W.; BARRETT, T.; BENSON, D. A.; BOLTON, E.; BRYANT, S. H.; CANESE, K.; CHETVERNIN, V.; CHURCH, D. M.; DICUCCIO, M.; FEDERHEN, S.; FEOLO, M.; FINGERMAN, I. M.; GEER, L. Y.; HELMBERG, W.; KAPUSTIN, Y.; LANDSMAN, D.; LIPMAN, D. J.; LU, Z.; MADDEN, T. L.; MADEJ, T.; MAGLOTT, D. R.; MARCHLER-BAUER, A.; MILLER, V.; MIZRACHI, I.; OSTELL, J.; PANCHENKO, A.; PHAN, L.; PRUITT, K. D.; SCHULER, G. D.; SEQUEIRA, E.; SHERRY, S. T.; SHUMWAY, M.; SIROTKIN, K.; SLOTTA, D.; SOUVOROV, A.; STARCHENKO, G.; TATUSOVA, T. A.; WAGNER, L.; WANG, Y.; WILBUR, W. J.; YASCHENKO, E.; YE, J. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research**, v. 39, 2011.

SCHRADER, C.; SCHIELKE, A.; ELLERBROEK, L.; JOHNE, R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n.5, p. 1014-1026, 2012.

SCHROEDER, A.; MUELLER, O.; STOCKER, S.; SALOWSKY, R.; LEIBER, M.; GASSMANN, M.; LIGHTFOOT, S.; MENZEL, W.; GRANZOW, M.; RAGG, T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. **BMC Molecular Biology**, v. 7, n. 3, 2006.

SEEGENE. **Manual Allplex™ SARS-CoV-2 Assay** (Cat. Nº RV10247Y), 2020. Disponível em: https://seegenebrazil.com.br/wp-content/uploads/2021/01/RV10247Y_V1-15_PT-Manual.pdf. Acesso em: 25/07/2023.

SIDSTEDT, M.; HEDMAN, J.; ROMSOS, E. L.; WAITARA, L.; WADSÖ, L.; STEFFEN, C. R.; VALLONE, P. M.; RÅDSTRÖM, P. Inhibition mechanisms of

hemoglobin, immunoglobulin G, and whole blood in digital and real-time PCR. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 410, n. 10, p. 2569–2583, 2018.

SILVA, L.M.; RIANI, L.R.; SILVÉRIO, M.S.; PEREIRA-JÚNIOR, O.D.S.; PITTELLA, F. Comparison of Rapid Nucleic Acid Extraction Methods for SARS-CoV-2 Detection by RT-qPCR. **Diagnostics**, v. 12, 2022.

SIMMS, D; CHOMCZYNSKI, P.E. trizol™: a new reagent for optimal single-step isolation of RNA. **Focus**, v. 15, n. 4, 1993.

SINGH, J.; BIRBIAN, N.; SINHA, S.; GOSWAMI, A.; A critical review on PCR, its types and applications. **International Journal of Advanced Research in Biological Sciences**, v. 1, 2014.

SINGH, D.; YI, S. V. On the origin and evolution of SARS-CoV-2. **Experimental Molecular Medicine**, v. 53, p. 537–547, 2021.

SINT, D.; RASO, L.; TRAUGOTT, M. Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 3, p. 898-905, 2012.

SODOWICH, B. I.; FADL, I.; BURNS, C. Method validation of in vitro RNA transcript analysis on the Agilent 2100 Bioanalyzer. **Electrophoresis**, v. 28, n. 14, p. 2368-2378, 2007.

TAN, S. C.; YIAP, B. C. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2009.

TAYLOR, S.; WAKEM, M.; DIJKMAN, G.; ALSARRAJ, M.; NGUYEN, M.; A practical approach to RT-qPCR – publishing data that conform to the MIQE guidelines. **Methods**, v. 50, n. 4, p. S1–S5, 2010.

TAYLOR, S. C.; NADEAU, K.; ABBASI, M.; LACHANCE, C.; NGUYEN, M.; FENRICH, J. The ultimate qPCR experiment: producing publication quality, reproducible data the first time. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 7, p. 761–774, 2019.

THE LANCET. COVID-19 in Brazil: "So what?". **The Lancet**, v. 395, n. 10235, 2020.

THERMOFISCHER. TRIzol™ **Reagent manual**, 2016.

THOMAS, M. R.; WILLIAMSON, R.; CRAFT, I.; RODECK, C.H. The time of appearance, and quantitation, of fetal DNA in the maternal circulation. **Ann N Y Acad Sci**, v. 731, p. 217-225, 1994.

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

TOMBULOGLU, H.; SABIT, H.; AL-SUHAIMI, E.; AL JINDAN, R.; ALKHARSAH, K. R. Development of multiplex real-time RT-PCR assay for the detection of SARS-CoV-2. **PLoS One**, v. 16, n. 4, 2021.

TYAGI, S.; KRAMER, F.R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 303–308, 1996.

VALASEK, M. A.; REPA, J. J.; The power of real-time PCR. **Advances in Physiology Education**, v. 29, n. 3, p. 151-159, 2005.

VALLONE, P.M.; BUTLER, J.M. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. **Biotechniques**, v. 37, n. 2, p. 226-231, 2004.

VIRALZONE. **SARS coronavirus 2 (SARS-CoV-2) proteome**. Disponível em: <https://viralzone.expasy.org/8996>. Acesso em 12 jul. 2023.

VOGELS, C. B. F.; BRITO, A. F.; WYLLIE, A. L.; FAUVER, J. R.; OTT, I. M.; KALINICH, C. C.; PETRONE, M. E.; CASANOVAS-MASSANA, A.; MUENKER, M. C.; MOORE, A. J.; KLEIN, J.; LU, P.; LU-CULLIGAN, A.; JIANG, X.; KIM, D. J.; KUDO, E.; MAO, T.; MORIYAMA, M.; OH, J. E.; PARK, A.; SILVA, J.; SONG, E.; TAKAHASHI, T.; TAURA, M.; TOKUYAMA, M.; VENKATARAMAN, A.; WEIZMAN, O.; WONG, P.; YANG, Y.; CHEEMARLA, N. R.; WHITE, E. B.; LAPIDUS, S.; EARNEST, R.; GENG, B.; VIJAYAKUMAR, P.; ODIO, C.; FOURNIER, J.; BERMEJO, S.; FARHADIAN, S.; DELA CRUZ, C. S.; IWASAKI, A.; KO, A. I.; LANDRY, M. L.; FOXMAN, E. F.; GRUBAUGH, N. D. Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR primer-probe sets. **Nature Microbiology**, v. 5, p. 1299–1305, 2020.

VOGELS, C. B. F.; BREBAN, M. I.; OTT, I. M.; ALPERT, T.; PETRONE, M. E.; WATKINS, A. E.; KALINICH, C. C.; EARNEST, R.; ROTHMAN, J. E.; JESUS, J. G.; CLARO, I.M.; FERREIRA, G. M.; CRISPIM, M. A. E.; BRAZIL-UK CADDE GENOMIC NETWORK, SINGH, L.; TEGALLY, H.; ANYANEJI, U. J.; NETWORK FOR GENOMIC SURVEILLANCE IN SOUTH AFRICA, HODCROFT, E. B.; MASON, C. E.; KHULLAR, G.; METTI, J.; DUDLEY, J. T.; MACKAY, M. J.; NASH, M.; WANG, J.; LIU, C.; HUI, P.; MURPHY, S.; NEAL, C.; LASZLO, E.; LANDRY, M. L.; MUYOMBWE, A.; DOWNING, R.; RAZEQ, J.; OLIVEIRA, T. Multiplex qPCR discriminates variants of concern to enhance global surveillance of SARS-CoV-2. **PLoS Biology**, v. 19, n. 5, p. e3001236, 2021.

VÖHRINGER, H. S.; SANDERSON, T.; SINNOTT, M.; DE MAIO, N.; NGUYEN, T.; GOATER, R.; SCHWACH, F.; HARRISON, I.; HELLEWELL, J.; ARIANI, C. V.; GONÇALVES, S.; JACKSON, D. K.; JOHNSTON, I.; JUNG, A. W.; SAINT, C.; SILLITOE, J.; SUCIU, M.; GOLDMAN, N.; PANOVSKA-GRIFFITHS, J.; WELLCOME SANGER INSTITUTE COVID-19 SURVEILLANCE TEAM; COVID-19 GENOMICS UK (COG-UK) CONSORTIUM; BIRNEY, E.; VOLZ, E.; FUNK, S.; KWIATKOWSKI, D.; CHAND, M.; MARTINCORENA, I.; BARRETT, J. C.; GERSTUNG, M. Genomic reconstruction of the SARS-CoV-2 epidemic in England. **Nature**, v. 600, n. 7889, p. 506-5011, 2021.

WANG, D.; HU, B.; HU, C.; ZHU, F.; LIU, X.; ZHANG, J.; WANG, B.; XIANG, H.; CHENG, Z.; XIONG, Y.; ZHAO, Y.; LI, Y.; WANG, X.; PENG, Z. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. **The Journal of the American Medical Association**, v. 323, n. 11, p. 1061-1069, 2020.

WANG, Z.; JIA, H.; YU, H.; WANG, T.; YANG, B. Gene Analysis of Genetically Modified Soybean Lectin Based on Fluorescence Quantitative PCR. **Biochemical Genetics**, v. 59, n. 1, p. 185-201, 2021.

WEI, Y.; LU, C.; CLOVER, G. Novel approaches to mitigate primer interaction and eliminate inhibitors in multiplex PCR, demonstrated using an assay for detection of three strawberry viruses. **Journal of Virological Methods**, v. 151, n.1, p. 132-139, 2008.

WERTHEIM, J. O.; CHU, D. K. W.; PEIRIS, J. S. M.; KOSAKOVSKY, S. L.; POON, L. M. A Case for the Ancient Origin of Coronaviruses. **Journal of Virology**, v. 87, 2013.

WHO, 2021. **Tracking SARS-CoV-2 variants**. Disponível em: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>. Acesso em 23 jul. 2023.

WHO, 2025. **WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard**. Disponível em <https://covid19.who.int/> Acesso em 22 abr. 2025.

WHO, 2022. **World Health Organization. Diagnostic testing for SARS-CoV-2**. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/334254>. Acesso em 09 abr. 2025.

WHO, 2023. **Statement on the fifteenth meeting of the IHR (2005) Emergency Committee on the COVID-19 pandemic**. Disponível em: [https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-\(covid-19\)-pandemic?adgroupsurvey={adgroupsurvey}&gclid=Cj0KCQjwk96IBhDHARIsAEKO4xYJN9r1CL_IISHZWkwrEOYE5hVc0shWb1bxgXYs7sJB4fiYEfSgB6QaAnLDEALw_wcB](https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-(covid-19)-pandemic?adgroupsurvey={adgroupsurvey}&gclid=Cj0KCQjwk96IBhDHARIsAEKO4xYJN9r1CL_IISHZWkwrEOYE5hVc0shWb1bxgXYs7sJB4fiYEfSgB6QaAnLDEALw_wcB). Acesso em 23 jul 2023.

WÖLFEL, R.; CORMAN, V. M.; GUGGEMOS, W.; SEILMAIER, M.; ZANGE, S.; MÜLLER, M. A.; NIEMEYER, D.; JONES, T. C.; VOLLMAR, P.; ROTHE, C.; HOELSCHER, M.; BLEICKER, T.; BRÜNINK, S.; SCHNEIDER, J.; EHMANN, R.; ZWIRGLMAIER, K.; DROSTEN, C.; WENDTNER, C. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. **Nature**, v. 581, p. 465–469, 2020.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **Biotechniques**, v. 39, n. 1, p. 75-85, 2005.

WU, F.; ZHAO, S.; YU, B.; CHEN, Y. M.; WANG, W.; SONG, Z. G.; HU, Y.; TAO, Z. W.; TIAN, J. H.; PEI, Y. Y.; YUAN, M. L.; ZHANG, Y. L.; DAI, F. H.; LIU, Y.; WANG, Q. M.; ZHENG, J. J.; XU, L.; HOLMES, E. C.; ZHANG, Y. Z. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 265-269, 2020.

YAN-RONG, G.; QING-DONG, C.; ZHONG-SI, H.; YUAN-YANG, T.; SHOUDENG, C.; HONG-JUN, J.; KAI-SEN, T.; DE-YUN, W.; YAN, Y. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID 19) outbreak - an update on the status. **Military Medical Research**, v. 7, n. 11, 2020.

ZHANG, P.; REN, Z.; GAO, X.; ZHAO, M.; WANG, Y.; CHEN, J.; WANG, G.; XIANG, H.; CAI, R.; LUO, S.; WANG, X. Development and application of a TaqMan-probe-based multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of porcine circovirus 2, 3, and 4 in Guangdong province of China. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 25, 2024.

ZIMMERMANN, A.; LÜTHY, J.; PAULI, U. Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food samples. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A**, v. 207, p. 81-90, 1998.

ZIMMERS, Z. A.; ADAMS, N. M.; GABELLA, W. E.; HASELTON, F. R. Fluorophore-Quencher Interactions Effect on Hybridization Characteristics of Complementary Oligonucleotides. **Anal Methods**, v. 11, n. 22, p. 2862-2867, 2019.

ANEXO A - Artigo publicado no periódico Diagnostics, com resultados obtidos para a validação de extração com reagente desenvolvido para amostras de SARS-CoV-2



diagnostics



Article

Comparison of Rapid Nucleic Acid Extraction Methods for SARS-CoV-2 Detection by RT-qPCR

Livia Mara Silva, Lorena Rodrigues Riani, Marcelo Silva Silvério, Olavo dos Santos Pereira-Júnior and Frederico Pittella * 

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora 36036-900, Brazil; liviamarasilva@gmail.com (L.M.S.); lorena.riani@ufjf.br (L.R.R.); marcelo.silverio@ufjf.edu.br (M.S.S.); olavo.pereira@farmacia.ufjf.br (O.d.S.P.-J.)

* Correspondence: frederico.pittella@ufjf.edu.br

Abstract: Since 2020, humanity has been facing the COVID-19 pandemic, a respiratory disease caused by the SARS-CoV-2. The world's response to pandemic went through the development of diagnostics, vaccines and medicines. Regarding diagnostics, an enormous challenge was faced due to shortage of materials to collect and process the samples, and to perform reliable mass diagnosis by RT-qPCR. In particular, time-consuming and high cost of nucleic acid extraction procedures have hampered the diagnosis; moreover, several steps in the routine for the preparation of the material makes the extracted sample susceptible to contamination. Here two rapid nucleic acid extraction reagents were compared as extraction procedures for SARS-CoV-2 detection in clinical samples by singleplex and multiplex RT-qPCR analysis, using different transport media, samples with high and low viral load, and different PCR machines. As observed, rapid nucleic acid extraction procedures can be applied for reliable diagnosis using a TaqMan-based assay, over multiple platforms. Ultimately, prompt RNA extraction may reduce costs with reagents and plastics, the chances of contamination, and the overall time to diagnosis by RT-qPCR.

Keywords: SARS-CoV-2; COVID-19; RT-qPCR; rapid nucleic acid extraction



Citation: Silva, L.M.; Riani, L.R.; Silvério, M.S.; Pereira-Júnior, O.d.S.; Pittella, F. Comparison of Rapid Nucleic Acid Extraction Methods for SARS-CoV-2 Detection by RT-qPCR. *Diagnostics* **2022**, *12*, 601. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12030601>

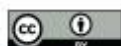
Academic Editor: Alessandro Russo

Received: 31 January 2022

Accepted: 25 February 2022

Published: 27 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

COVID-19, caused by SARS-CoV-2, became a global pandemic disease from March of 2020, when the World Health Organization (WHO) declared a “public health emergency of international concern” [1]. The first case was reported in 2019 in the city of Wuhan, China, after the emergence of symptoms similar to pneumonia in part of the population [2]. The most common clinical symptoms of COVID-19 are fever, cough, fatigue, chest pain, headache and shortness of breath, characteristic of other viral illnesses such as the flu [3]. In December 2021, there were over 200 million confirmed cases and over 5 million deaths worldwide from COVID-19 [4].

The virus that causes the disease belongs to the Coronaviridae family, which has an RNA genome. Genetic sequencing showed that SARS-CoV-2 is 79% equivalent to SARS-CoV and 50% to MERS-CoV [1]. Thus far, there is no defined treatment to eliminate the virus, but vaccines are already available to control the disease progress [5–7]; however, the transmission of SARS-CoV-2 is very fast, and the rate of vaccination is usually slow in several countries, allowing new variants of the virus to emerge around the world [8]. The diagnosis of the disease allows both the correct management of the patient and the biosafety strategic actions to avoid the dissemination of the disease [9].

The most used methods for detecting or quantifying viruses nucleic acids in human biological samples are reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) or real-time PCR. This technique detects a small segment of the viral genome, enabling rapid, sensitive and accurate strain-level detection of up to five targets in an assay. Several RT-qPCR assays have been designed for the detection of SARS-CoV-2 [10,11].

ANEXO B – Artigo publicado no periódico Viruses, com resultados obtidos para a avaliação do reagente desenvolvido para amostras de diferentes variantes de SARS-CoV-2



Communication

The Influence of the Omicron Variant on RNA Extraction and RT-qPCR Detection of SARS-CoV-2 in a Laboratory in Brazil

Livia Mara Silva ¹, Lorena Rodrigues Riani ¹, Juliana Brovini Leite ¹, Jessica Mara de Assis Chagas ¹, Laura Silva Fernandes ¹, Romário Costa Fochat ¹, Carmen Gomide Pinto Perches ², Thiago César Nascimento ³, Lauren Hubert Jaeger ¹, Marcelo Silva Silvério ¹, Olavo dos Santos Pereira-Júnior ¹ and Frederico Pittella ^{1,*}

- ¹ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n—Campus Universitário, Juiz de Fora 36036-900, MG, Brazil; liviamarasilva@gmail.com (L.M.S.); lorena.riani@ufjf.br (L.R.R.); julianabrovini@hotmail.com (J.B.L.); jessicachagas@gmail.com (J.M.d.A.C.); fernandes_ls@ufjf.br (L.S.F.); romariofochat@gmail.com (R.C.F.); laurenhi@hotmail.com (L.H.); marcelo.silverio@ufjf.br (M.S.S.); olavo.pereira@farmacia.ufjf.br (O.d.S.P.-J.)
- ² Hospital Universitário, Universidade Federal de Juiz de Fora, Av. Eugênio do Nascimento, s/n, Juiz de Fora 36038-330, MG, Brazil; cpgomidep@gmail.com
- ³ Faculdade de Enfermagem, Universidade Federal de Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n—Campus Universitário, Juiz de Fora 36036-900, MG, Brazil; thiago_ufjf1982@yahoo.com.br
- * Correspondence: frederico.pittella@ufjf.br; Tel.: +55-32-2102-3803



Citation: Silva, L.M.; Riani, L.R.; Leite, J.B.; de Assis Chagas, J.M.; Fernandes, L.S.; Fochat, R.C.; Perches, C.G.P.; Nascimento, T.C.; Jaeger, L.H.; Silvério, M.S.; et al. The Influence of the Omicron Variant on RNA Extraction and RT-qPCR Detection of SARS-CoV-2 in a Laboratory in Brazil. *Viruses* 2023, 15, 1690. <https://doi.org/10.3390/v15081690>

Academic Editors: Kenneth Lundström and Donald Seto

Received: 28 June 2023
Revised: 19 July 2023
Accepted: 30 July 2023
Published: 4 August 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The emergence of SARS-CoV-2 variants can affect their detection via RT-qPCR. The Omicron variant has a greater affinity for the upper respiratory system and causes clinical conditions similar to bronchitis, as opposed to the pneumonitis-like conditions caused by other SARS-CoV-2 variants. This characteristic increases the viscosity of clinical samples collected for diagnosis. Coinciding with the arrival of the Omicron variant, we observed a failure in control gene expression in our laboratory. In this report, we have optimized a rapid nucleic acid extraction step to restore gene expression and detect the presence of the SARS-CoV-2 virus. We reevaluated 3000 samples, compared variant types occurring in different time periods, and confirmed that the presence of the Omicron variant was responsible for changes observed in the characteristics of these clinical samples. For samples with large amounts of mucus, such as those containing the Omicron variant, a modification to the nucleic acid extraction step was sufficient to restore the quality of RT-qPCR results.

Keywords: Omicron variant; SARS-CoV-2; RT-qPCR; diagnostics

1. Introduction

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is the virus responsible for the global pandemic declared by the World Health Organization (WHO) in 2020. The infection caused by this virus, known as COVID-19, affects the respiratory tract and can range from asymptomatic or mild to a severe form. As of June 2023, there have been over 768 million confirmed cases of COVID-19 and 6.9 million deaths worldwide [1]. The original strain of the virus identified in Wuhan was named B.1.1.28. In late 2020, new variants emerged in the UK (B.1.1.7—Alpha variant), South Africa (B.1.351—Beta variant), and India (B.1.617—Delta variant) [2]. These variants exhibited mutations in the spike (S) protein receptor binding domain, which contributed to increased transmissibility, with estimates ranging from 40% to 70% [3]. Another variant, the Gamma variant (also known as the P.1 variant), was identified in Brazil, and showed 17 mutations, including changes in the spike (S) protein [4].

In November 2021, a new variant with numerous mutations was detected in South Africa. This variant was named the Omicron variant (B.1.1.529) and was classified as a

**ANEXO C - Publicação do D.O.U, nº 184, de 01 de outubro de 2021, com
extrato de contrato de transferência de tecnologia do reagente
desenvolvido**

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO

Publicado em: 01/10/2021 | Edição: 187 | Seção: 3 | Página: 83

Órgão: Ministério da Educação/Universidade Federal de Juiz de Fora/Diretoria de Inovação/CRITT

EXTRATO DE CONTRATO DE TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA

Nº do Processo: 23071.917198/2021-68.

Espécie: Contrato de Transferência de Tecnologia Não Patenteada, Não Patenteável ou de Know-How, que fazem entre si a UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA - UFJF e a empresa PI-BIOTECH GENÉTICA AVANÇADA LTDA.

Partes: Universidade Federal de Juiz de Fora e a empresa Pi-Biotech Genética Avançada Ltda.

Objeto: Constitui objeto deste contrato a transferência de tecnologia não patenteada, não patenteável ou de know-how, a título oneroso e sem exclusividade, pela UFJF à Pi-Biotech Genética Avançada Ltda, dos direitos para uso, produção, e comercialização de produtos relacionados ao "Reagente para extração e preservação de ácidos nucleicos".

Valor: 5% (cinco por cento), a título de royalties, calculado sobre a receita líquida auferida na comercialização dos produtos e/ou serviços que incorporem a Tecnologia.

Vigência: 29/09/2021 a 29/09/2026.

Data da assinatura: 29/09/2021.

Assinam: Ana Carolina Antunes Vidon (Diretora de Inovação em exercício); Fernanda Pittella Alves (Representante Legal da Empresa).

Este conteúdo não substitui o publicado na versão certificada.