



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO PROFISSIONAL FARMACOLOGIA

Nicoli De Bona Heck

**Desenvolvimento de um método imunoenzimático para detecção de IgG anti-RBD de
SARS-CoV-2**

Florianópolis

2022

Nicoli De Bona Heck

**Desenvolvimento de um método imunoenzimático para detecção de IgG anti-RBD de
SARS-CoV-2**

Dissertação submetida ao Programa de Mestrado
Profissional em Farmacologia da Universidade Federal
de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre
em Farmacologia
Orientador: Prof. André Luiz Barbosa Báfica, Dr.

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Heck, Nicoli

Desenvolvimento de um método imunoenzimático para
detecção de IgG anti-RBD de SARS-CoV-2 / Nicoli Heck ;
orientador, André Luiz Barbosa Báfica, 2022.

55 p.

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade
Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis,
2022.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Coronavírus. 3. Anticorpo. 4.
Imunoensaio. 5. ELISA. I. Barbosa Báfica, André Luiz. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Farmacologia. III. Título.

Nicoli De Bona Heck

Desenvolvimento de um método imunoenzimático para detecção de IgG anti-RBD de SARS-CoV-2

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Álvaro Menin, Dr.(a)

Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Alfeu Zanotto Filho, Dr.(a)

Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em farmacologia.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.(a) André Luiz Barbosa Báfica, Dr.(a)

Orientador(a)

Florianópolis, 2022.

Este trabalho é dedicado a todos que acreditam na ciência como
força motriz para o desenvolvimento de soluções.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e querido amigo Professor Dr. André Báfica. Mentor científico e grande incentivador, sempre acreditou mais em mim do que eu mesma. Minha eterna gratidão pelo acolhimento e por todas as longas conversas e discussões.

Ao Professor Dr. Daniel Mansur pela oportunidade de integrar a equipe e confiança no meu trabalho.

Ao Dr. Daniel Mendes por ser minha dupla e dividir comigo boa parte das minhas atribuições. Obrigada por compartilhar conhecimento, por todas as enriquecedoras discussões de resultados e por ser tão solícito para revisar desde o projeto até esta dissertação.

A Bianca K. Beck, minha I.C. padrão ouro, por ter sido meu braço direito em incontáveis momentos, por ser tão receptiva e disponível e por somar tanto pessoal e profissionalmente. Foi massa demais ter você me acompanhando nessa caminhada. Obrigada!

A Dra. Greicy M. Dias por tornar meus dias mais fáceis sendo parte fundamental do gerenciamento do laboratório como um todo. Agradeço também por estar envolvida na produção da RBD e por estimar os custos desse processo. Por fim, obrigada pelas trocas de ideia sobre dados ou sobre a vida.

A Dra. Aline M. Murad e a Dra. Ruth F. Rocha pela produção da RBD e a Aline também por estimar o custo de purificação da RBD. Além disso, agradeço por terem sido um desses felizes e inesperados encontros que a vida proporciona. Obrigada por toda troca de conhecimento e por toda a parceria, meninas!

A Ms. Carolina Eto por ter sido motivo de alegria durante todos os dias desse período. Minha amiga querida, te devo tanto! Eterna gratidão pelo reencontro, por toda a ajuda e companheirismo. Não teria sido tão leve sem você.

A Eduarda Munari por toda ajuda com os Luizes Priscilos, Robertos Carlos e seus irmãos, pela parceria ininterrupta em prol do bem-estar animal e pelo senso de humor sem igual. Se você não existisse, teria que ser inventada.

Ao Juliano Vieira e Sergio Carpeggiani, time de basquete do laboratório, por todas as trocas de biotério, pelo auxílio quando precisei e pela gentileza de sempre.

A Ms. Daiane Bobermin por cuidar do monitoramento da equipe através do PCR para SARS-CoV-2 e permitir que trabalhássemos em segurança em tempos de COVID. Mais ainda, agradeço pelas risadas, pela agradável companhia e por ter se tornado uma amiga.

A todo o *dream team* do Laboratório de Imunobiologia, para mim eternamente “Lidi”. Trabalhei com uma equipe sensacional, com certeza acima da média. Vocês foram fundamentais para a fluidez do dia a dia.

Ao Prof. Dr. Mário Steindel por ceder amostras de soro pré-pandêmicas que contribuíram para a padronização do teste em soro humano.

A Prof. Dra. Rosemery Maurici pela parceria no projeto IMUNOVIDA que permitiu que tivéssemos acesso ao soro de pacientes.

A Prof. Dra. Leda Castilho por gentilmente ceder a proteína Spike de alta qualidade utilizada ao longo de todo esse trabalho.

Ao Prof. Dr. André M. Vale e a Dra. Daniele Rodrigues por terem sido tão disponíveis no início desse processo e terem embasado boa parte do protocolo construído.

À Secretaria Municipal de Saúde da cidade de Florianópolis por ter disponibilizado os volumes mortos da vacina Coronavac para ensaios imunológicos.

A Dra. Livia H. Yamashiro e a Ms Nicole M. De Souza por me incentivarem a iniciar essa jornada quando questionei a respeito. Minhas amigas amadas, obrigada pela lealdade e presença constante ainda que com distância física.

A Maria Luiza B. M. de Oliveira, Tainara Ávila e Julia C. Soares, minhas colegas de turma do mestrado, por terem tornado as sextas-feiras de aula online divertidíssimas e por serem válvula de escape para os infinitos seminários para preparar. Vocês são incríveis! Obrigada!

Aos meus pais por serem a base que permitiu que eu investisse na minha formação. Obrigada por todo afeto e cuidado.

Ao CNPq e ao MCTIC por financiarem o desenvolvimento desse trabalho.

Ao LAMEB pelo uso dos equipamentos.

Ao Programa de pós-graduação do mestrado profissional em farmacologia por me proporcionar essa incrível vivência que foi me tornar mestre. O trabalho é árduo, mas recompensador. Obrigada por todo aprendizado!

Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos. (Marie Curie)

RESUMO

Em 2019, surgiram os primeiros casos de pacientes acometidos pela COVID-19 na China e logo a doença se alastrou pelo mundo culminando em uma pandemia. Em janeiro de 2022 a pandemia causada pelo novo coronavírus supera marcas impressionantes de número de casos e mortes, sendo o Brasil o país com 3º maior número de casos acumulados. O novo coronavírus possui uma proteína estrutural importante chamada Spike que é amplamente expressa e sabidamente imunogênica. Em decorrência disso, já estão em uso no mundo 15 vacinas que utilizam a Spike ou suas subunidades nas formulações vacinais, com destaque para o seu domínio de ligação ao receptor. Entretanto, apesar da disponibilidade de algumas vacinas, ainda há uma grande parcela da população suscetível às formas graves da COVID-19 e a altos níveis de contágio. Somado a isso, a disseminação de variantes de preocupação alerta para o fato de que mesmo indivíduos vacinados, ou com infecção prévia por SARS-CoV-2, desencadeiam uma resposta humoral menos eficiente à essas cepas, remetendo à necessidade de que a população mundial tenha acesso rapidamente ao esquema vacinal completo, a fim de minimizar os impactos causados pela doença. Por isso, o Laboratório de Imunobiologia junto a um grupo multicêntrico, propõe o desenvolvimento de uma vacina brasileira hipotetizando que uma vacina de BCG recombinante expressando determinantes antigênicos das proteínas Spike (RBD) e do Nucleocapsídeo induz uma resposta humoral protetora contra o SARS-CoV-2. Para testar esta hipótese é preciso que estejam disponíveis métodos para detecção de imunoglobulinas, sendo assim é de grande valia o desenvolvimento desta ferramenta no laboratório de Imunobiologia. Baseado nesse cenário, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um teste capaz de detectar imunoglobulinas anti-Spike e anti-RBD através da metodologia de ELISA indireto. Os ensaios foram padronizados e otimizados através da variação individual de parâmetros como a solução de bloqueio; a diluição do anticorpo secundário; a diluição das amostras e o tempo de desenvolvimento da reação enzima-substrato. Afinal, obteve-se quatro métodos imunoenzimáticos capazes de detectar IgG anti-SARS-CoV-2 em soro murino ou humano. Especificamente o ensaio para detecção de IgG anti-RBD murina, possibilita a titulação das amostras de soro e possui boas características de repetibilidade. Por fim, o custo estimado por amostra desse ensaio é por volta de 62x menor que o custo de kits comercializados no mercado, o que permite o uso escalável em laboratórios.

Palavras-chave: Anticorpo. Coronavírus. COVID-19. ELISA. Imunoensaio.

ABSTRACT

In 2019, the first cases of patients affected by COVID-19 were reported in China and this disease spread around the world, culminating in a pandemic. In January 2022, the pandemic caused by the new coronavirus overcomes impressive marks in number of cases and deaths, Brazil being the 3rd highest country in number of accumulated cases. The new coronavirus has an important structural protein called Spike that is widely expressed and known to be immunogenic. Hence, 15 vaccines developed targeting Spike protein or its subunits, with emphasis on its receptor-binding domain, are already in use worldwide. However, despite the availability of some vaccines, there is still a large portion of the world's population susceptible to severe forms of COVID-19 and high levels of transmission. In addition, the dissemination of variants of concern alerts to the fact that vaccinated individuals, or even those with previous SARS-CoV-2 infection, trigger a less efficient humoral response to these strains, leading to the need of quick access to the complete vaccination schedule for global population, to minimize impacts caused by the disease. Therefore, the Laboratory of Immunobiology, together with a multicenter group, proposed the development of a Brazilian vaccine, hypothesizing that a recombinant BCG vaccine expressing antigenic determinants of Spike protein (RBD) and Nucleocapsid protein induces a protective humoral response against SARS-CoV-2. In order to test this hypothesis, a method for detection of immunoglobulins must be available, and thus the development of this tool is of great value. Based on this scenario, the objective of this work was to develop a test capable of detecting anti-Spike and anti-RBD immunoglobulins through an indirect ELISA method. The assays were standardized and optimized through the individual variation of parameters such as the blocking solution; the dilution of the secondary antibody; the dilution of the samples and the time of the enzyme-substrate reaction. The result were four enzyme-linked immunosorbent methods capable of detecting anti-SARS-CoV-2 IgG in murine or human serum were obtained. Specifically, the assay for detecting murine anti-RBD IgG, allows titration of serum samples and has good repeatability. Finally, the estimated cost per sample of this assay is around 62x lower than the cost of commercially available kits, which allows scalable use in laboratories.

Keywords: Antibody. Coronavirus. COVID-19. ELISA. Immunoassay.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração do método de ELISA indireto.....	22
Figura 2 – Padronização da detecção de anticorpos IgG anti-Spike	26
Figura 3 – Padronização da detecção de anticorpos IgG anti-RBD	27
Figura 4 – Otimização da detecção de anticorpos IgG anti-RBD	28
Figura 5 – Titulação de amostras de soro para semiquantificação de anticorpos IgG anti-RBD	30
Figura 6 – Detecção de anticorpos IgG anti-Spike e anti-RBD em soro humano	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concordância entre a densidade ótica obtida para as duplicatas de soro.....	29
Tabela 2 – Estimativa de custo do ELISA para detecção de IgG anti-RBD murina	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg micrograma

BCG Bacilo de *Calmette-Guérin*

BSA Albumina de soro bovino (do inglês, *Bovine Serum Albumin*)

COVID-19 Doença causada pelo Coronavírus 2019 (do inglês, *Coronavirus Disease 2019*)

CV% Coeficiente de variação

D.O. Densidade ótica

D.P.I. Dias pós-imunização

ECA2 Enzima conversora de angiotensina 2

ELISA Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

Fab Fragmento de ligação ao antígeno (do inglês, *fragment antigen-binding*)

Fc Fragmento cristalizável

HCl Ácido clorídrico

HRP Peroxidase de raiz forte (do inglês, *Horseradish peroxidase*)

IgA Imunoglobulina A

IgD Imunoglobulina D

IgE Imunoglobulina E

IgG Imunoglobulina G

IgM Imunoglobulina M

iVac Vacina comercial de vírus inativado (CoronaVac)

mL Mililitro

ng Nanograma

nm Nanômetros

PBS Tampão fosfato salino (do inglês, *Phosphate-buffered saline*)

POP Protocolo Operacional Padrão

RBD Domínio de ligação ao receptor (do inglês, *Receptor Binding Domain*)

SARS-CoV-2 Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (do inglês, *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*)

TCLE Termo de consentimento livre e esclarecido

TMB Tetrametilbenzidina

UFSC Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS.....	20
1.1.1	Objetivo Geral	20
1.1.2	Objetivos Específicos	20
2	METODOLOGIA.....	21
2.1	VACINAÇÃO E COLETA DAS AMOSTRAS DE SORO CONTROLE DE CAMUNDONGOS.....	21
2.2	ELISA ANTI-SPIKE EM SORO DE CAMUNDONGOS.....	21
2.3	ELISA ANTI-RBD EM SORO DE CAMUNDONGOS.....	23
2.4	TITULAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SORO DE CAMUNDONGOS.....	23
2.5	PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO.....	23
2.6	COLETA DE SORO HUMANO	23
2.7	ELISA EM SORO HUMANO	24
3	RESULTADOS	25
3.1	DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE ELISA PARA IGG ANTI-SPIKE	25
3.2	DESENVOLVIMENTO DE ELISA PARA IGG ANTI-RBD.....	26
3.3	ELISA PARA IGG ANTI-RBD E ANTI-SPIKE HUMANO	31
4	DISCUSSÃO	33
5	CONCLUSÃO.....	37
	REFERÊNCIAS.....	38
	ANEXO A – TCLE	455
	ANEXO B – POP ELISA murino.....	488
	ANEXO C – POP ELISA humano	52

1 INTRODUÇÃO

No final do ano de 2019, começaram a surgir casos de pacientes acometidos por febre, tosse seca, dor de cabeça, dispneia e pneumonia na China. O quadro clínico dos pacientes remetia a algum tipo de infecção viral e então o *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2), um novo vírus da família Coronaviridae, foi identificado como agente causador do quadro. O sequenciamento e análise filogenética do vírus demonstraram alta similaridade com outro coronavírus anteriormente isolado de morcegos, sugerindo que a nova linhagem de vírus também tenha sido originada de morcegos (ZHOU *et al.*, 2020; ZHU *et al.*, 2020). Rapidamente os casos se multiplicaram, o quadro desenvolvido pelos pacientes passou a ser chamado de *Coronavirus Disease 2019* (COVID-19) e a doença se alastrou pelo mundo culminando em uma pandemia (WHO, 2020a; WHO, 2020b).

Nos últimos 20 anos, 2 epidemias já foram causadas por diferentes coronavírus: SARS-CoV-1 e MERS – vírus também zoonóticos – antes do aparecimento do SARS-CoV-2. Em janeiro de 2022 a pandemia já supera a marca de 292 milhões de casos da doença e mais de 5 milhões de mortes no mundo inteiro (PAHO, 2022), sendo o Brasil o país com 3º maior número de casos acumulados, somando mais de 22 milhões de casos e mais de 600 mil óbitos (BRASIL, 2022).

O novo coronavírus é um vírus de RNA fita simples e possui 4 proteínas estruturais importantes: Spike (S), Envelope (E), Membrana (M), e Nucleocapsídeo (N) (WU *et al.*, 2020). Entre elas, a proteína S tem lugar de destaque pois é amplamente expressa no envelope viral e é responsável pela ligação do vírus, através de sua porção RBD (*Receptor-Binding Domain*), ao receptor de entrada nas células – o receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) (SHANG *et al.*, 2020). A proteína S normalmente está em uma conformação inativa que é alterada para forma ativa durante o processo de fusão do vírus com a células do hospedeiro. Sua estrutura é dividida em duas subunidades principais, a S1 responsável por abrigar a RBD e a S2 onde estão o peptídeo de fusão e algumas outras estruturas. A alteração da proteína para sua forma ativa acontece pela clivagem das subunidades S1 e S2 feita por proteases do hospedeiro (HUANG *et al.*, 2020). Essa clivagem permite que a RBD fique melhor exposta e que a proteína esteja estabilizada em sua forma trimérica. Para que a ligação de anticorpos à Spike ou da Spike ao receptor da ECA2 ocorra de maneira eficaz essas modificações estruturais são necessárias (GUI *et al.*, 2016).

Anticorpos são moléculas proteicas produzidas por células plasmáticas em resposta a exposição a algum estímulo imunogênico. Eles são produzidos em 5 formas diferentes, dependendo do tipo e local do estímulo e do tempo decorrido após estímulo: Imunoglobulina G (IgG), Imunoglobulina M (IgM), Imunoglobulina E (IgE), Imunoglobulina D (IgD), Imunoglobulina A (IgA). Daremos ênfase à IgG que é a imunoglobulina produzida em respostas mais tardias e notoriamente importante para avaliação de eficácia vacinal. As IgGs são formadas por 2 cadeias leves e 2 cadeias pesadas que caracterizam a molécula. As cadeias pesadas por si dão origem a 1 porção chamada fragmento cristalizável (Fc): porção constante e envolvida nas funções efetoras dos anticorpos; a união entre as cadeias leve e pesada constituem 2 porções chamadas de fragmento de ligação ao antígeno (Fab): porção variável envolvida no reconhecimento dos antígenos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2021).

Duas características vinculadas à porção Fab dos anticorpos são bastante relevantes para a ligação antígeno-anticorpo, são elas: afinidade e avidéz. A afinidade está relacionada à força com que essa ligação ocorre através de diferentes tipos de ligações não-covalentes reversíveis. Essa característica é frequentemente representada pela constante de dissociação do complexo antígeno-anticorpo – uma medida numérica para o quão difícil é desfazer essa ligação. Já a avidéz, é uma medida um pouco mais ampla pois leva em conta a quantidade de antígenos e de sítios de ligação disponíveis nos anticorpos, assim como a estereoquímica (HEDMAN *et al.*, 1993).

Está demonstrado que pacientes convalescentes pós-COVID-19 podem produzir anticorpos de alta afinidade contra um epítipo altamente conservado da Spike (YUAN *et al.*, 2020) e que a maioria desses indivíduos produz anticorpos com ação neutralizante – que bloqueiam a entrada do vírus nas células (WU *et al.*, 2020). A neutralização acontece através da ligação do anticorpo à porção RBD da proteína Spike, impedindo a ligação ao receptor da ECA2 (YUAN *et al.*, 2020; PINTO *et al.*, 2020).

Esses dados iniciais já demonstravam que a Spike é um alvo promissor para vacinas e/ou terapias. Corroborando, já estão aprovadas pelos órgãos reguladores e em uso no mundo 24 vacinas que utilizam de quatro tecnologias distintas, das quais 15 se beneficiam da capacidade imunogênica da Spike ou de suas subunidades (FASTER CURES, 2022). Uma dessas tecnologias é a de inativação viral, que consiste no crescimento do patógeno em laboratório e posterior morte do mesmo. Por se tratar de patógenos sem capacidade de multiplicação, costumam ser administrados junto a adjuvantes para melhorar a resposta imune

e pela mesma razão são bastante seguras e podem ser utilizadas em pessoas imunossuprimidas. A tecnologia de vetores virais não-replicantes por sua vez, faz com que um vírus não patogênico e sem capacidade de replicação (frequentemente um adenovírus) carregue um gene de um vírus patogênico. Já a plataforma vacinal baseada em subunidade proteica, utiliza-se de fragmentos do vírus inativado para o estímulo de resposta protetora e, por último, a nova estratégia de uso de RNA mensageiro que codifica a tradução de proteínas do patógeno traz uma nova perspectiva para o desenvolvimento de vacinas (KRAMMER *et al.*, 2020). No Brasil, 4 vacinas para o combate à COVID-19 estão disponíveis, das quais duas são baseadas em vetores virais não replicantes que carregam o gene para a transcrição/tradução da proteína Spike: AD26.COV2-S da Janssen e AZD1222 da Universidade de Oxford/AstraZeneca; uma é baseada em RNA mensageiro para a tradução da proteína Spike: BNT162 da Pfizer/BioNTech e uma é baseada em vírus inativado: CoronaVac da Sinovac/Instituto Butantan (BRASIL, 2021b). Com exceção da vacina baseada em vírus inativado que gera resposta para outros antígenos virais além da Spike, as outras vacinas em uso no Brasil ativam o sistema imune especificamente através de antígenos da proteína S com eficácia e segurança (POLACK *et al.*, 2020; RAMASAMY *et al.*, 2020; SADOFF *et al.*, 2021; TANRIOVER *et al.*, 2021).

Apesar da disponibilidade de algumas vacinas no mercado, essas ainda são em números insuficientes para atender à população mundial com a agilidade necessária. Os países em que há morosidade na aplicação das vacinas e a cobertura vacinal é baixa têm uma grande parcela de sua população passível às formas graves da COVID-19 e a altos níveis de contágio (OUR WORLD IN DATA, 2022b). Desta forma, em decorrência da lentidão no processo de vacinação, o SARS-CoV-2 se mantém circulando com altas taxas de transmissão, o que favorece o surgimento de variantes (SANJUÁN *et al.*, 2016). Já foram identificadas cinco variantes de preocupação: Alpha, Beta, Gamma, Delta e Ômicron e a disseminação dessas cepas tem sido associada a uma taxa maior de transmissão do vírus (WHO, 2022). Em julho de 2021, os órgãos de controle epidemiológico estavam atentos ao espalhamento da variante Delta, originada na Índia em outubro de 2020. Na época, espalhada por pelo menos 111 países, a variante brevemente se tornou predominante no contexto global. Atualmente, a Ômicron ganhou os holofotes. Classificada como variante de preocupação em 26 de novembro de 2021, em janeiro de 2022 já é a cepa circulante predominante em diversos países (HODCROFT, 2022). Nos Estados Unidos, por exemplo, foi preciso apenas 3 semanas para que isso acontecesse (ESTADOS UNIDOS, 2022) e no Brasil, em um período de

aproximadamente um mês desde o primeiro caso registrado, a variante tornou-se responsável por 75,7% dos casos de infecção pelo novo coronavírus (OUR WORLD IN DATA, 2022a). Por se tratar de uma variante de preocupação, o monitoramento dos dados epidemiológicos é fundamental para verificar se há diminuição da eficácia das medidas sociais e de saúde pública, diagnósticos, vacinas e terapias utilizadas (WHO, 2021; WHO, 2022).

Mesmo indivíduos com esquema de vacinação completo, ou com infecção prévia por SARS-CoV-2, desencadeiam uma resposta humoral menos eficiente a variantes (HACISULEYMAN *et al.*, 2021; PLANAS *et al.*, 2021, WILHELM *et al.*, 2021). Durante a expansão da Delta, foi observado aumento no número de casos nos Estados Unidos, em Israel e em diversos outros países, associados à disseminação da variante. O espalhamento da Ômicron em dezembro de 2021 e janeiro de 2022 retomou esse cenário de maneira potencializada e causou aumentos importantes nos números de casos de COVID-19 mundo a fora (ESTADOS UNIDOS, 2021; OUR WORLD IN DATA, 2022b; HODCROFT, 2022). Estes fatos remetem à necessidade de que a população mundial tenha acesso rapidamente ao esquema vacinal completo, incluindo dose de reforço quando for o caso, a fim de minimizar os impactos causados pela doença (MOGHADAS *et al.*, 2021). Por isso, o Brasil tem atuado na iniciativa de desenvolvimento de diversas vacinas, incluindo um protótipo vacinal proposto por grupos da UFMG, UFSC, UFRJ e Instituto Butantan.

O projeto de desenvolvimento do protótipo vacinal utilizará o bacilo de *Calmette-Guérin* (BCG) como um vetor bacteriano para certas proteínas do novo coronavírus. A escolha leva em conta o alto grau de segurança da BCG, vacina usada na prevenção contra tuberculose, desenvolvida por *Calmette e Guérin* (1921) e introduzida no Brasil em 1925 (BENÉVOLO-DE-ANDRADE *et al.*, 2005). Mesmo se tratando de uma vacina centenária, são constantes as tentativas de aprimorar os resultados obtidos para proteção contra tuberculose. Por exemplo: estão em andamento estudos clínicos de fase 3 baseados em uma BCG recombinante (VPM1002 (BCG Δ ureC::hly) com o intuito de verificar se há melhora nos efeitos imunoprotetores da BCG *per se* (KAUFMANN *et al.*, 2020). Além disso, há demonstrações recentes de que a imunização com BCG protege contra infecções virais através da ativação da imunidade treinada em humanos (ARTS *et al.*, 2018) – um mecanismo de reprogramação epigenética que leva a uma resposta imune inata mais eficiente (KLEINNIJENHUIS *et al.*, 2012). A partir dessas evidências, levantou-se a ideia de que BCG leva a uma proteção contra COVID-19. Uma revisão de dados iniciais de 34 estudos clínicos

em andamento corrobora a convicção de haver proteção cruzada entre BCG e SARS-CoV-2 (GONZALEZ-PEREZ *et al.*, 2021).

Dessa maneira, a hipótese do grupo é que uma vacina de BCG recombinante expressando determinantes antigênicos das proteínas S (RBD) e N induz uma resposta humoral protetora contra o SARS-CoV-2. Para que essa hipótese seja testada é preciso que se tenha disponível algum método para detecção de imunoglobulinas IgG anti-RBD, objetivo dos grupos da UFRJ e UFSC.

O *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) é classificado como um imunoensaio enzimático e é um dos métodos mais frequentemente utilizado para detecção de imunoglobulinas, por ser relativamente simples, rápido e não demandar grandes infraestruturas ou equipamentos de alto custo, além de não exigir os cuidados envolvidos na manipulação de reagentes radioativos como acontece nos radioimunoensaios. O ELISA utiliza-se de uma fase sólida para imobilização de um antígeno ou anticorpo dependendo do tipo de ELISA utilizado. Quando o objetivo é detectar antígenos, pode-se lançar mão de ELISAs competitivos ou sanduíche e quando o objetivo é detectar anticorpos, utiliza-se o ELISA indireto que permite a identificação de imunoglobulinas específicas para diversos antígenos. Este tipo de ELISA é sempre classificado como heterogêneo, pois necessita de etapas de lavagem entre um reagente e outro e por fim o que será medido é a intensidade de cor produzida por uma reação enzimática que será proporcional a quantidade de anticorpo sérico detectado. O método indireto de captura de imunoglobulinas permite também que essa detecção seja classe-específica: utilizando um anticorpo secundário anti-IgG, anti-IgM, anti-IgE, anti-IgD ou anti-IgA (VAZ; MACHADO; BUENO, 2018).

Antes de partir para os estudos clínicos em humanos, os imunizantes devem ser avaliados em estudos pré-clínicos. Assim como internacionalmente, no Brasil, a ANVISA exige que o potencial de induzir resposta imune, a potência, a segurança e a toxicidade sejam verificadas em animais e que todos os procedimentos, processos e resultados sejam devidamente documentados. Esses estudos permitem direcionar vias de administração, doses e esquemas que serão utilizados nos primeiros testes em humanos, além de evitar que imunizantes sem evidências de eficácia e segurança sejam levados a diante com desperdício de verbas (BRASIL, 2020; WHO, 2005). Em estudos pré-clínicos que testam imunogenicidade de vacinas em mamíferos, o primeiro modelo comumente utilizado é o modelo murino (BOS *et al.*, 2020; GAO *et al.*, 2020; VAN DOREMALEN *et al.*, 2020; VOGEL *et al.*, 2021), por isso é importante a disponibilidade de um teste capaz de detectar

imunoglobulina anti-RBD em soro de camundongos. A presença de resposta humoral após exposição às vacinas é uma característica fundamental para que os construtos testados sejam considerados bem-sucedidos e sigam para as próximas etapas de avaliação.

Considerando a explosão de demanda devido à pandemia, foram lançados no mercado kits prontos que detectam imunoglobulinas anti-SARS-CoV-2 em soro murino. Foi possível localizar 4 marcas diferentes para o produto, todas basearam-se na técnica de ELISA indireto e utilizaram-se da RBD como antígeno. Dois dos kits oferecem padrões para construção de curva de concentração e, portanto, são testes quantitativos e dois deles permitem apenas determinar qual o título de anticorpos presentes no soro e, por isso, são testes semiquantitativos. Entretanto, o custo desses produtos é alto, inviabilizando a utilização por muitos dos laboratórios de pesquisa no Brasil. A média estimada de preço para três dos quatro produtos disponíveis é de 745 dólares – equivalente a algo próximo de 4.224 reais para 96 testes sem considerar os custos relacionados a importação, visto que não há produção nacional (utilizada como referência cotação de 10/01/2022: 1 dólar = 5,67 reais) (ACRO BIOSYSTEMS, 2021; ALPHA DIAGNOSTIC INTERNATIONAL, 2022; EAGLE BIOSCIENCES, 2022; SINO BIOLOGICAL, 2021). Para um dos produtos, encontramos representação de vendas no Brasil e o valor da revenda foi orçado em R\$7.494,43 deixando claro a dificuldade em obter acesso a preços justos em nossa localização. Baseado nesse cenário, é de grande valia o desenvolvimento de um método imunoenzimático *in house* como uma ferramenta para detecção de imunoglobulinas anti-SARS-CoV-2, desenvolvida no território nacional, com custo por amostra que permita o uso escalável em laboratórios.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver um teste capaz de detectar imunoglobulinas anti-RBD em soro de camundongos imunizados.

1.1.2 Objetivos Específicos

- 1) Desenvolver um protocolo operacional padrão para ELISA anti-Spike murino
- 2) Desenvolver um protocolo operacional padrão para ELISA anti-RBD murino;
- 3) Otimizar a solução de bloqueio;
- 4) Otimizar a diluição de anticorpo secundário;
- 5) Otimizar a diluição das amostras;
- 6) Otimizar o tempo de desenvolvimento da reação enzima-substrato;
- 7) Estimar o custo por amostra do teste desenvolvido e comparar com o custo de kits disponíveis no mercado.
- 8) Desenvolver um protocolo operacional padrão para ELISA antiSpike e anti-RBD humano.

2 METODOLOGIA

2.1 VACINAÇÃO E COLETA DAS AMOSTRAS DE SORO CONTROLE DE CAMUNDONGOS

Como amostras controle para padronização foram utilizados soros de camundongos naive ou imunizados com a CoronaVac - uma vacina comercial de vírus inativado (iVac) sabidamente indutora de anticorpos. Esses animais receberam o imunizante por via intraperitoneal e tiveram sangue total coletado pelo plexo venoso submandibular nos dias 0, 7, 14 e 21 pós-imunização. O sangue coletado foi mantido por 15 minutos a temperatura ambiente seguidos de 30 minutos a 4°C para completa coagulação e retração do coágulo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos em uma velocidade de 950 g. Após centrifugação, o soro foi coletado, transferido para um *ependorf* e armazenado em freezer - 20°C.

A autorização para o uso dos animais utilizados para as imunizações e coletas de sangue está inclusa no projeto já aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o número 8278290818.

2.2 ELISA ANTI-SPIKE EM SORO DE CAMUNDONGOS

O teste foi desenvolvido baseado na técnica de ELISA indireto (**Figura 1**). Foram utilizadas placas de alta adsorção da marca *Corning* que foram sensibilizadas *overnight*, a 4°C, com 3 µg/mL da proteína Spike em sua forma trimérica - doação da Professora Leda Castilho/LECC/COPPE/UFRJ. Os sítios de ligação inespecíficos foram bloqueados com duas soluções proteicas diferentes (Tampão fosfato salino (PBS) 1x + Albumina de soro bovino (BSA) 1% + Leite 3% + Tween 0,05% e PBS 1x + BSA 2% + Tween 0,05%) para averiguar qual apresentava o melhor desempenho – adaptações dos protocolos descritos em *Žak et al. (2021)* e *Alvim et al. (2021)*. Eleita a solução de bloqueio, analisamos a performance do ELISA com o aumento da diluição do anticorpo secundário (*Cell Signaling* código: 7076S) de 1:2000 para 1:5000. Finalmente, houve a comparação da diluição das amostras de soro entre 1:50 e 1:100 encerrando os parâmetros testados neste ELISA. A placa foi mantida em câmara úmida durante todos os períodos de incubação.

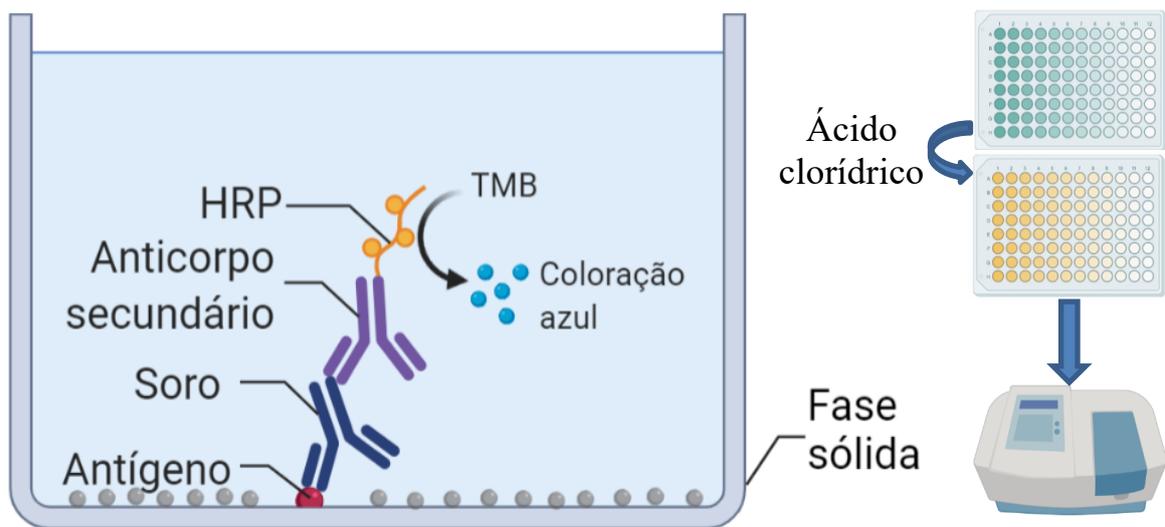


Figura 1 – Ilustração do método de ELISA indireto. Placas de alta adsorção são sensibilizadas a proteína de interesse. Os sítios de ligação inespecíficos são bloqueados com soluções proteicas e em seguida as amostras de soro são adicionadas à placa. Nos soros em que há imunoglobulina contra o antígeno adsorvido, estas ligam à proteína adsorvida na placa e são reconhecidas por um anticorpo secundário anti-IgG murino ligado a enzima *horseradish peroxidase* (HRP). As ligações são detectadas através da formação de cor azul ao acrescentar um substrato da enzima: tetrametilbenzidina (TMB). Após interromper a reação com ácido clorídrico 1 N, a cor é convertida para amarelo e a densidade ótica (D.O.) é lida em um comprimento de onda de 450 nanômetros (nm) para avaliação dos resultados.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

2.3 ELISA ANTI-RBD EM SORO DE CAMUNDONGOS

Foram utilizadas placas de alta adsorção da marca *Corning* que foram sensibilizadas *overnight*, a 4°C, com a proteína RBD recombinante produzida em sistema de expressão de células eucarióticas (HEK 293F) e purificada por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados através de um protocolo adaptado de Tee *et al.* (2020). A concentração de proteína utilizada para esta finalidade foi determinada a partir de comparações entre 2 µg/mL, 1 µg/mL ou 0,5 µg/mL. Solução de bloqueio, diluição do anticorpo secundário e diluição da amostra foram mantidos conforme definido para o ELISA anti-Spike. A última otimização realizada foi do tempo de desenvolvimento da reação enzima-substrato, avaliado em 2,5 minutos, 4 minutos e 10 minutos. A placa foi mantida em câmara úmida durante todos os períodos de incubação. Após padronização, o ensaio foi realizado por mais duas vezes, todas as vezes em duplicata.

2.4 TITULAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SORO DE CAMUNDONGOS

Utilizando o ensaio já estabelecido para detecção de IgG anti-RBD, as amostras controle positivas foram diluídas de maneira seriada na ordem 2 e na ordem 5.

2.5 PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO

Em toda placa teste foram reservados ao menos 5 poços para amostras controle negativas. A partir do resultado de D.O. obtido para essas amostras foi determinado o ponto de corte para cada placa. O ponto de corte consiste na média de D.O. das amostras controle negativas somada a 3 vezes o seu desvio padrão. Acima do ponto de corte estabelecido as amostras foram consideradas positivas. Hartman *et al.* (2018) descrevem esse e outros métodos para análise de ELISAs na ausência de padrão.

$$\text{Ponto de corte} = \bar{x} D.O._{neg} + 3 \times D.P._{neg}$$

2.6 COLETA DE SORO HUMANO

Indivíduos doadores voluntários de sangue assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (**ANEXO A**) após terem suas dúvidas sanadas. As coletas foram autorizadas pelo Conselho de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC (CAAE #36944620.5.1001.0121). Soros de indivíduos imunizados com diversas vacinas do calendário nacional de imunização, incluindo vacinas contra COVID-19 foram utilizados. Esses indivíduos tiveram sangue total coletado por punção venosa com sistema de coleta de tubos a vácuo. O sangue coletado foi mantido por pelo menos 30 minutos a temperatura ambiente para a completa coagulação e retração do coágulo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos em uma velocidade de 950 g. Após centrifugação, o soro foi coletado, transferido para tubos *eppendorfs* e armazenado em freezer -20°C.

2.7 ELISA EM SORO HUMANO

Foram utilizadas placas de alta adsorção da marca *Nunc* que foram sensibilizadas *overnight*, a temperatura ambiente, com 3 µg/mL da proteína Spike em sua forma trimérica - doação da Professora Leda Castilho/LECC/COPPE/UFRJ. Os sítios de ligação inespecíficos foram bloqueados com solução de PBS 1x + BSA 1% + Leite 3% + Tween 0,05% por 2 horas e as amostras de soro diluídas 1:100 foram incubadas por mais 2 horas. Na sequência, o anticorpo secundário (*Invitrogen* código: A18811) diluído 1:5000 foi incubado por 1,5 horas e finalmente, foi adicionado o substrato TMB para que a reação enzimática ocorresse ao longo de 5 minutos. A placa foi mantida em câmara úmida durante todos os períodos de incubação.

3 RESULTADOS

3.1 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE ELISA PARA IGG ANTI-SPIKE

Em posse do antígeno purificado (proteína Spike em sua forma trimérica), foram realizados testes com o intuito de estabelecer um ELISA para mensuração de anticorpos IgG anti-Spike. Foram utilizados soros de animais naive ou imunizados com a vacina CoronaVac como soros controles para o andamento dos testes.

O primeiro parâmetro analisado foi a solução de bloqueio utilizada e os resultados mostraram não haver diferença de efetividade entre a solução de bloqueio contendo PBS 1x + BSA 1% + Leite 3% + Tween 0,05% e a solução de bloqueio contendo PBS 1x + BSA 2% + Tween 0,05%. Ambas desempenharam bem o papel de inibir ligações inespecíficas sem impedir as ligações específicas: as amostras controle negativas se mantiveram com valores de D.O. baixos e as amostras contendo anticorpos com D.O. em níveis ótimos para detecção (**Figura 2A e 2B**). Sendo assim, optou-se pelo uso da solução de bloqueio contendo PBS 1x + BSA 2% + Tween 0,05% a fim de evitar o uso do leite, o que facilita as lavagens entre as etapas por não haver sedimentação dos solutos.

Em seguida, duas concentrações do anticorpo secundário foram avaliadas, observou-se também um desempenho semelhante entre as diluições 1:2.000 (**Figura 2B**) e 1:5.000 (**Figura 2C**) e, portanto, a diluição de 1:5.000 foi mantida assegurando bom desempenho e economia.

Avaliou-se então a diluição dos soros controle. As amostras que vinham sendo testadas em uma diluição de 1:50 (**Figura 2C**) foram testadas em uma diluição de 1:100 (**Figura 2D**) e não foi verificada mudança expressiva na capacidade de detecção das imunoglobulinas.

Por último, o tempo de desenvolvimento da reação enzima-substrato foi estabelecido através da observação do desenvolvimento de cor nos soros controle positivos sem que isso ocorra nos soros controle negativos.

Após a otimização descrita, os parâmetros utilizados para o teste de ELISA anti-Spike ficaram definidos como:

- Concentração de Spike para sensibilizar a placa: 3 µg/mL;
- Solução de bloqueio: PBS 1x + BSA 2% + Tween 0,05%;
- Diluição das amostras de soro: 1:100;

- Diluição do anticorpo secundário: 1:5.000;
- Tempo de desenvolvimento da reação enzima-substrato: 2,5 minutos.

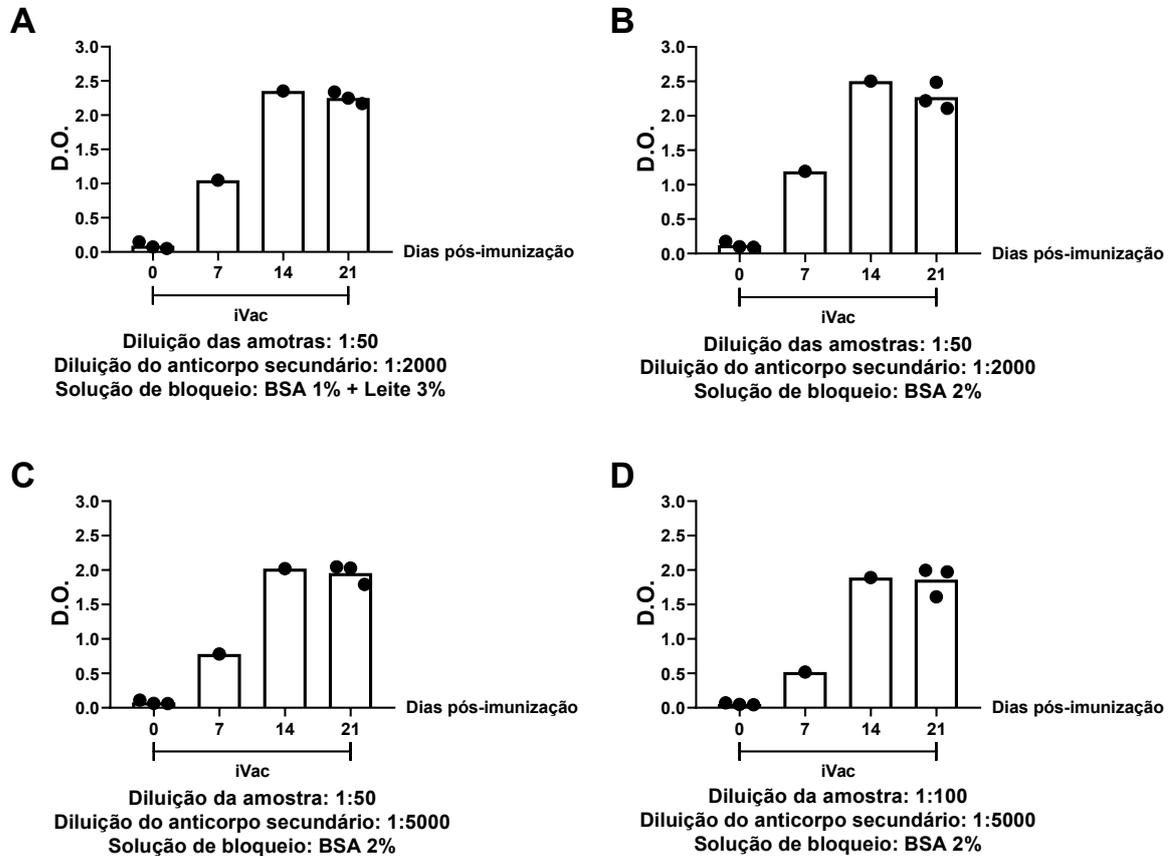


Figura 2 – Padronização da detecção de anticorpos IgG anti-Spike. Foi avaliado o desempenho de duas soluções de bloqueio (A), (B), duas diluições do anticorpo secundário (B), (C) e duas diluições das amostras (C), (D) para a detecção de IgG anti-Spike. Placas de alta adsorção foram sensibilizadas com a proteína Spike solúvel e incubadas *overnight*, em câmara úmida, na geladeira; o bloqueio foi realizado com as soluções a serem testadas por 1 hora em câmara úmida a temperatura ambiente; as amostras de soro foram diluídas 1:50 ou 1:100 e incubadas por 2 horas, em câmara úmida a temperatura ambiente; o anticorpo secundário anti-IgG-*horseradish peroxidase* (HRP) foi diluído 1:2000 ou 1:5000 e incubado por 1,5 horas para detecção dos anticorpos específicos. A reação foi desenvolvida com Tetrametilbenzidina (TMB) por 2,5 minutos e interrompida com ácido clorídrico (HCl) 1 N. Leitura realizada em espectrofotômetro a 450 nm. Para a padronização foram utilizadas amostras de soro de camundongos imunizados pela via intraperitoneal com vacina comercial de SARS-CoV-2 inativado (iVac) ao longo do tempo. Os resultados representam valores independentes de D.O. para cada animal (0 e 21 dias pós-imunização (d.p.i.) ou o *pool* dos valores de D.O. obtidos em 3 animais por grupo (7 e 14 d.p.i.). Dados representativos de 1 experimento e plotados utilizando o software GraphPad Prism.

3.2 DESENVOLVIMENTO DE ELISA PARA IGG ANTI-RBD

A partir dos resultados obtidos previamente com as verificações realizadas para o desenvolvimento do ELISA anti-Spike, foram iniciados os testes para o ELISA anti-RBD. A

solução de bloqueio, diluição das amostras de soro e diluição do anticorpo secundário foram mantidas.

A primeira etapa da padronização determinou a concentração de proteína a ser utilizada para sensibilização da placa. Foram testadas três concentrações: na concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 3C**) houve perda de sensibilidade considerada prejudicial para detecção em amostras com baixos níveis de anticorpos. Para as concentrações de 2 $\mu\text{g/mL}$ e 1 $\mu\text{g/mL}$ foram alcançados resultados bastante semelhantes e satisfatórios se realizado o manejo do tempo de desenvolvimento da reação enzima-substrato (**Figura 3A e 3B**). Optou-se então pelo uso da RBD na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ (50 ng por poço) com o tempo de desenvolvimento da reação enzima-substrato em 4 minutos ou mais.

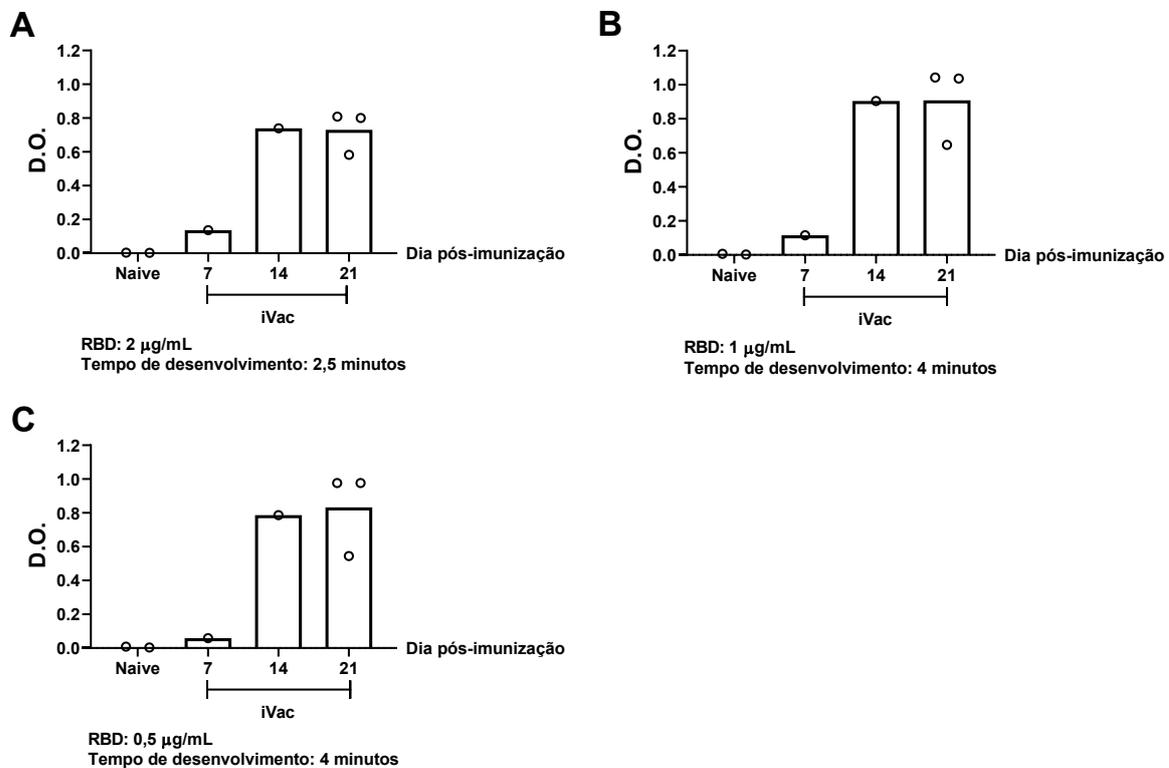


Figura 3 – Padronização da detecção de anticorpos IgG anti-RBD. Placas de alta adsorção foram sensibilizadas com (A) 2 $\mu\text{g/mL}$, (B) 1 $\mu\text{g/mL}$ ou (C) 0,5 $\mu\text{g/mL}$ da proteína RBD solúvel e incubadas *overnight*, em câmara úmida, na geladeira; bloqueio realizado com solução de PBS 1x + BSA 2% + Tween 0,05% por 1 hora em câmara úmida à temperatura ambiente; amostras de soro de 2-3 animais naive ou imunizados foram diluídas 1:100 na mesma solução e incubadas por 2 horas, em câmara úmida a temperatura ambiente; anticorpo secundário anti-IgG-*horseradish peroxidase* (HRP) diluído 1:5000 na mesma solução e incubado por 1,5 horas foi utilizado para detecção dos anticorpos específicos. A reação foi desenvolvida com Tetrametilbenzidina (TMB) por (A) 2,5 minutos ou (B), (C) 4 minutos e interrompida com ácido clorídrico (HCl) 1N. Leitura realizada em espectrofotômetro a 450 nm. Para a padronização foram utilizadas as amostras de soro dos animais naive ou imunizados com vacina comercial de SARS-CoV-2 inativado (iVac) pela via intraperitoneal. Os resultados representam valores independentes de D.O. para cada animal (Naive, 0 e 21 d.p.i.) ou o *pool* dos valores de D.O. obtidos em 3 animais por grupo (7 e 14 d.p.i.). Dados representativos de 1 experimento e plotados utilizando o software GraphPad Prism

A fim de aprimorar o manejo do tempo de reação enzima-substrato, o teste foi repetido utilizando os mesmos parâmetros já estabelecidos e o desenvolvimento de cor foi acompanhado por um período maior. A reação foi interrompida após 10 minutos proporcionando um aumento nas leituras de D.O. das amostras positivas sem resultar em falsos positivos nas amostras controle negativas (**Figura 4**).

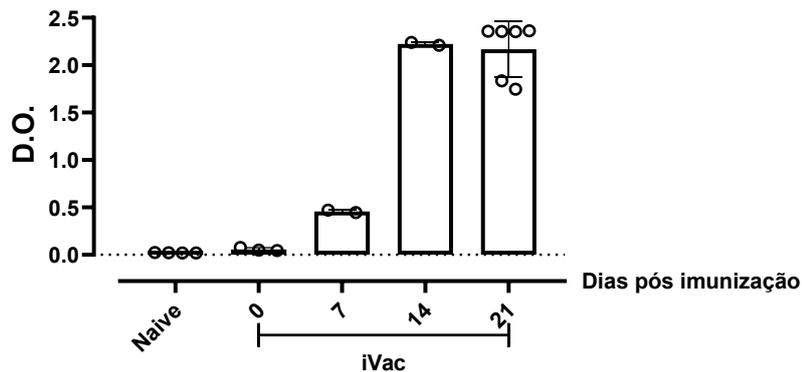


Figura 4 – Otimização da detecção de anticorpos IgG anti-RBD. Placas de alta adsorção foram sensibilizadas com 1 µg/mL da proteína RBD solúvel e incubadas *overnight*, em câmara úmida, na geladeira; bloqueio realizado com solução de PBS 1x + BSA 2% + Tween 0,05% por 1 hora em câmara úmida à temperatura ambiente; amostras de soro de 2-3 animais naive ou imunizados, em duplicata, foram diluídas 1:100 na mesma solução e incubadas por 2 horas, em câmara úmida a temperatura ambiente; anticorpo secundário anti-IgG-*horseradish peroxidase* (HRP) diluído 1:5000 na mesma solução e incubado por 1,5 horas foi utilizado para detecção dos anticorpos específicos. A reação foi desenvolvida com tetrametilbenzidina (TMB) por 10 minutos e interrompida com ácido clorídrico (HCl) 1N. Leitura realizada em espectrofotômetro a 450 nm. Para a padronização foram utilizadas as amostras de soro dos animais naive ou imunizados com vacina comercial de SARS-CoV-2 inativado (iVac) pela via intraperitoneal. Os resultados representam valores independentes de D.O. para cada animal (Naive, 0 e 21 d.p.i.) ou o *pool* dos valores de D.O. obtidos em 3 animais por grupo (7 e 14 d.p.i.). Dados representativos de 3 experimentos e plotados utilizando o software GraphPad Prism

Após a otimização descrita, os parâmetros utilizados para o teste de ELISA anti-RBD ficaram definidos como:

- Concentração de RBD para sensibilizar a placa: 1 µg/mL;
- Solução de bloqueio: PBS 1x + BSA 2% + Tween 0,05%;
- Diluição das amostras: 1:100;
- Diluição do anticorpo secundário: 1:5.000;

- Tempo de desenvolvimento da reação enzima-substrato: 10 minutos.

Estabelecidos os parâmetros, voltamos-nos para a checagem de repetibilidade do ensaio. O ELISA foi repetido 3 vezes com amostras em duplicata (**Figura 3**). Os valores de D.O. obtidos mostraram que os resultados se mantêm quando utilizado o mesmo método e itens de testes idênticos, no mesmo laboratório, pelo mesmo operador, com o mesmo equipamento, em curtos intervalos de tempo. Foram encontradas pequenas variações nas leituras entre uma replicata e outra. Já entre um experimento e outro houve uma variação um pouco maior entre as D.O.s obtidas para uma mesma amostra (**Tabela 1**). No terceiro experimento a amostra 2 do dia 21 pós-imunização não pode ser avaliada pois não havia mais soro disponível.

Tabela 1 – Concordância entre a densidade ótica obtida para as duplicatas de soro

Exp.	Réplica	Amostras									
		N 1	N 2	D0 1	D0 2	D0 3	D7	D14	D21 1	D21 2	D21 3
1	1	0,033	0,025	0,113	0,084	0,056	0,568	2,230	2,231	2,253	2,040
	2	0,036	0,028	0,110	0,077	0,059	0,547	2,355	2,267	2,222	2,040
	CV%	6,2	8,1	1,9	6,2	3,7	2,7	3,9	1,1	1,0	0
2	1	0,020	0,020	0,099	0,061	0,063	0,378	1,900	2,071	1,618	1,511
	2	0,020	0,018	0,123	0,074	0,078	0,381	1,854	2,038	1,578	1,425
	CV%	0	7,4	15,3	13,6	15,0	0,6	1,7	1,1	1,8	4,1
3	1	0,015	0,026	0,088	0,012	0,039	0,252	1,880	2,037	-	1,541
	2	0,017	0,024	0,075	0,014	0,046	0,237	1,884	2,061	-	1,550
	CV%	8,7	5,6	11,2	10,6	11,6	4,3	0,2	0,8	-	0,4

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Abreviações: CV%, coeficiente de variação; Exp., experimento; D0, dia 0 pós-imunização; D7, dia 7 pós-imunização; D14, dia 14 pós-imunização; D21, dia 21 pós-imunização; N, naive.

O próximo passo foi checar a capacidade do teste de fornecer resultados semiquantitativos. Para isso, foram realizadas diluições seriadas das amostras de soro com o intuito de saber se o teste tem sensibilidade suficiente para detectar as diferenças entre uma diluição e outra e se os dados gerados seriam coerentes. Observou-se um ELISA bastante eficiente em determinar o título das amostras positivas (**Figura 5**) o que permite seu uso com a finalidade de titular os soros testados. Entre os soros de animais imunizados percebe-se níveis mais baixos de anticorpos 7 dias após a imunização com título 1:200 e níveis mais elevados e bastante semelhantes entre si nos dias 14 e 21 pós-imunização, com títulos de 1:2.500 e 1:2.500 respectivamente.

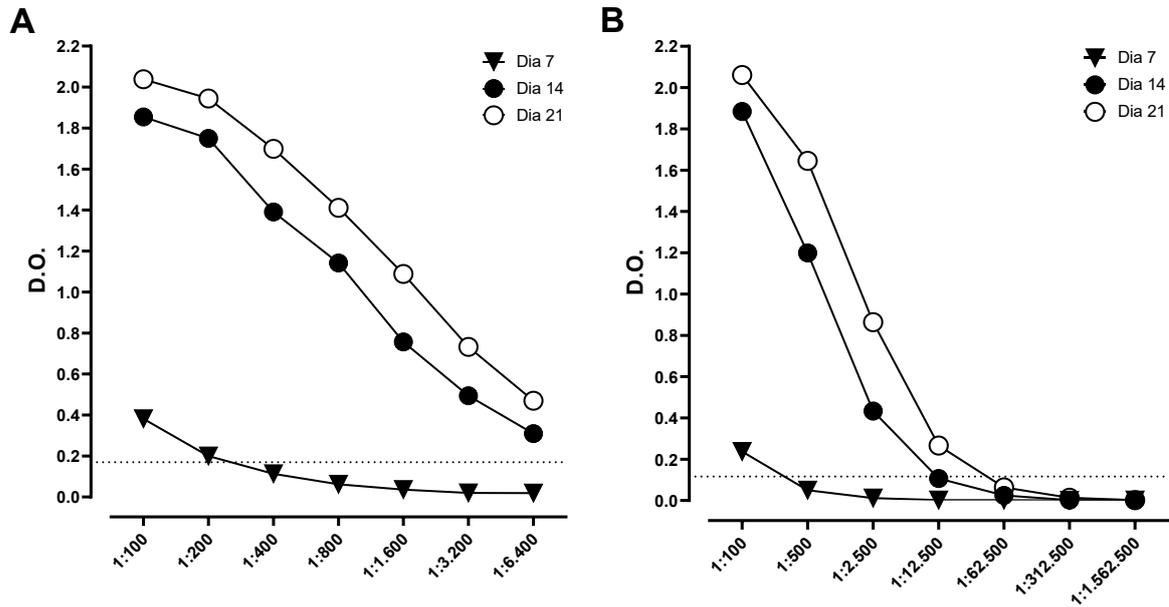


Figura 5 – Titulação de amostras de soro para semiquantificação de anticorpos IgG anti-RBD. O mesmo protocolo padronizado neste trabalho e descrito anteriormente foi utilizado; as amostras de soro de animais naïve ou imunizados pela via intraperitoneal com vacina comercial de SARS-CoV-2 inativado (iVac) foram diluídas de maneira seriada para determinação do título (última diluição em que a amostra apresenta IgG detectável). O primeiro gráfico (A) representa uma diluição seriada de ordem 2 enquanto o segundo gráfico (B) representa uma diluição seriada de ordem 5. Os resultados são representativos de 1 experimento e os dados foram plotados utilizando o software GraphPad Prism.

Depois da padronização finalizada, com todos os reagentes e concentrações de uso definidos, foram solicitados orçamentos entre dezembro de 2021 e janeiro de 2022 para estimar o custo dos itens consumíveis utilizados no ELISA para detecção de IgG anti-RBD murina desenvolvido (**Tabela 2**). Itens que não estão inclusos nos kits comercializados como água destilada para diluição dos reagentes, ponteiros e microplaca para diluição das amostras não foram incluídos na conta a fim de permitir uma comparação mais direta. Também não está contabilizado o custo com transporte/importação dos itens. O cálculo do custo total por amostra foi feito levando em conta que alguns poços são utilizados para controle em todas as placas e por isso o número de amostras testadas por placa é menor do que o número de poços disponíveis. Além disso, onde está indicado custo com taxas, refere-se a valores para manutenção do laboratório. Por fim, nesses moldes de cálculo o ensaio desenvolvido tem um custo estimado de R\$ 1,44 por amostra testada.

Tabela 2 – Estimativa de custo do ELISA para detecção de IgG anti-RBD murina

Item	Marca	Custo por placa (87 amostras)
RBD recombinante	Produção própria	R\$ 20,11
Placa de alta adsorção	<i>Corning</i>	R\$ 10,1
Sais para PBS (NaCl, KCl, KH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄)	Neon	R\$ 0,26
Tween 20	InLab	R\$ 1,89
BSA	InLab	R\$ 4,21
Anti-mouse IgG-HRP	<i>Cell signaling</i>	R\$ 1,68
TMB	Scienco	R\$ 9
HCl	Química Moderna	R\$ 0,01
Itens menores não contabilizados (+20% da matéria-prima)	-	R\$ 9,45
Recursos humanos e taxas (+145% da matéria-prima)	-	R\$ 68,53
	Custo Total Por Placa	R\$ 125,24
	Custo Total Por Amostra	R\$ 1,44

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Abreviações: RBD, *receptor binding domain*; PBS, *Phosphate-buffered saline*; BSA, *Bovine Serum Albumin*; IgG, *Imunoglobulina G*; HRP, *horseradish peroxidase*; TMB, *tetrametilbenzidina*.

3.3 ELISA PARA IGG ANTI-RBD E ANTI-SPIKE HUMANO

Utilizando da expertise adquirida, nos propomos a verificar se utilizando as mesmas etapas de padronização, testando as variáveis individualmente, poderíamos transpor esse processo para a padronização de detecção de imunoglobulinas em soro de camundongos para um ELISA de detecção de imunoglobulinas em soro humano.

Após otimização, os parâmetros utilizados para o teste de ELISA anti-Spike e anti-RBD em soro humano ficaram definidos como:

- Concentração de antígeno para sensibilização: Spike: 3 µg/mL e RBD: 1 µg/mL;
- Solução de bloqueio: PBS 1x + BSA 1% + Leite 3% + Tween 0,05%;
- Tempo de bloqueio: 2 horas;
- Diluição do anticorpo secundário: 1:5.000;
- Diluição das amostras: 1:100;

- Tempo de desenvolvimento da reação enzima-substrato: 5 minutos;
- Lavagens extras entre as etapas, incluindo período de molho da placa com a solução de lavagem.

A partir do método desenvolvido, um pequeno número de amostras de soro humano provenientes de indivíduos imunizados com vacinas comerciais de vetor viral recombinante ou de RNA mensageiro foram testadas (**Figura 6**). Encontramos um perfil de anticorpos circulantes ao longo do tempo bastante semelhante utilizando tanto o ELISA anti-Spike quanto o anti-RBD. Para os dois antígenos utilizados observou-se uma produção de IgG heterogênea entre os indivíduos.

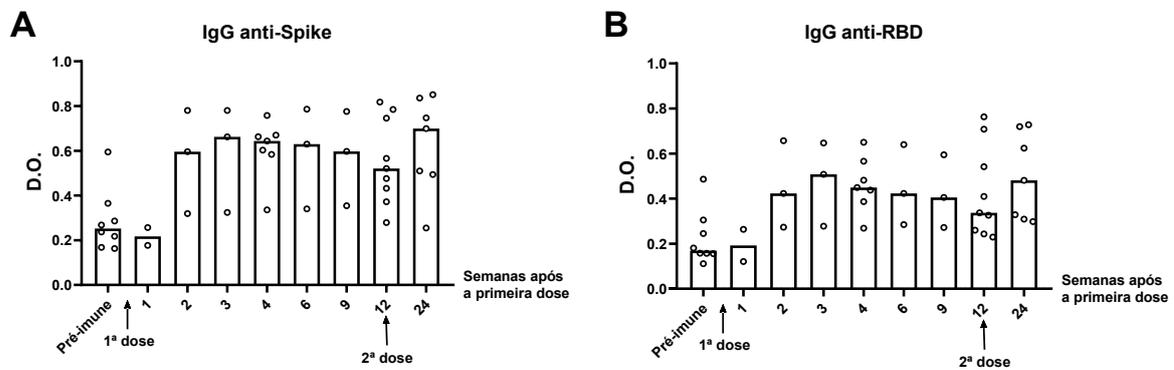


Figura 6 – Detecção de anticorpos IgG anti-Spike e anti-RBD em soro humano. Placas de alta adsorção foram sensibilizadas com 3 µg/mL de Spike (A) ou 1 µg/mL de RBD (B) solúvel e incubadas *overnight*, em câmara úmida, a temperatura ambiente; bloqueio realizado com solução de PBS 1x + BSA 1% + Leite 3% + Tween 0,05% por 2 horas em câmara úmida à temperatura ambiente; amostras de soro de indivíduos imunizados foram diluídas 1:100 na mesma solução e incubadas por 2 horas, em câmara úmida a temperatura ambiente; anticorpo secundário anti-IgG-*horseradish peroxidase* (HRP) diluído 1:5000 na mesma solução e incubado por 1,5 horas foi utilizado para detecção dos anticorpos específicos. A reação foi desenvolvida com tetrametilbenzidina (TMB) por 5 minutos e interrompida com ácido clorídrico (HCl) 1N. Leitura realizada em espectrofotômetro a 450 nm. Foram utilizadas amostras de soro de 9 indivíduos imunizados com vacinas comerciais de vetor viral recombinante ou de RNA mensageiro. Os resultados representam valores independentes de D.O. para cada indivíduo em determinado tempo. Dados representativos de 1 experimento e plotados utilizando o software GraphPad Prism.

4 DISCUSSÃO

Durante o processo de desenvolvimento dos ELISAs, foi utilizada uma abordagem tradicional de isolar as variáveis para que seja possível avaliar se houve impacto em decorrência da mudança sem que haja dúvidas sobre o fator causador – atribuição de causa e efeito.

A quantidade de proteína presente como antígeno é uma das variáveis a serem utilizadas e tem influência diretamente proporcional na leitura de D.O. encontrada. Quanto mais sítios de ligação disponíveis, maior a chance de anticorpos presentes no soro se ligarem, corroborando ALVIM *et al.* (2021). A concentração de Spike utilizada para sensibilizar as placas foi determinada com base na literatura (ALVIM *et al.*, 2021). Os testes foram iniciados com 4 µg/mL de proteína e após otimização (dados não mostrados), mantidos em 3 µg/mL.

Outra variável relevante para o desempenho do ELISA é a diluição do anticorpo secundário (de detecção) (R&D systems, 2021). É importante que o anticorpo secundário esteja em excesso para não limitar a detecção das imunoglobulinas ligadas ao antígeno adsorvido. Esse excesso de reagente precisa ser ajustado de modo que se possa aumentar o tempo de desenvolvimento da reação sem provocar aumento do *background* do teste (MINIC; ZIVKOVIC, 2021).

Apesar da padronização do tempo de desenvolvimento da reação enzima-substrato, esse parâmetro traz certa flexibilidade consigo. O olhar atento do executor aos controles positivos, negativos e brancos permite saber se já é hora de interromper a reação ou se há espaço para estender o tempo. Por exemplo: quando há interesse em identificar anticorpos presentes em baixos títulos, o tempo de reação pode ser estendido até o momento em que reações inespecíficas nos controles negativos e brancos não sejam observadas. Para esses casos de amostras com níveis baixos de anticorpos também é possível testar a incubação das amostras *overnight* a fim de aumentar a sensibilidade do ELISA, assim como foi observado quando estendemos o tempo de revelação com o TMB no ensaio para detecção de IgG anti-RBD.

Seguindo a mesma linha de raciocínio, a diluição das amostras a serem testadas em um ELISA precisa ser ajustada de acordo com a molécula a ser detectada e sua quantidade esperada. Nos ELISAs para detecção de IgG anti-SARS-CoV-2 desenvolvidos neste trabalho, 5 pontos de diluição seriada de ordem 5 partindo de uma diluição 1:100 são suficientes para determinar o título em soro de camundongos que produziram altos níveis de IgG, enquanto 5

pontos de diluição seriada de ordem 2 não são suficientes para definir os títulos, estando de acordo com o descrito em GAO *et al.* (2020). O ELISA anti-RBD desenvolvido é um teste semiquantitativo, o que pode ser considerado como uma limitação do teste, entretanto para que fosse possível quantificar as imunoglobulinas detectadas nas amostras seria necessário ter à disposição um anticorpo monoclonal purificado e quantificado. Deste modo, far-se-ia uma curva padrão com diversas concentrações do anticorpo onde seria possível interpolar os resultados de D.O. obtidos para as amostras testadas.

Consideramos vantajoso o desenvolvimento do ELISA anti-RBD a partir do ELISA anti-Spike, pois oferece menos possibilidades de reatividade cruzada. Já que o construto bacteriano vacinal testado pelo grupo expressa especificamente a RBD, a utilização do mesmo antígeno no teste exclui o viés de ligações inespecíficas em outras porções da Spike que não a RBD.

Na avaliação da variação intraensaio, obtivemos duplicatas altamente concordantes (CV% máximo de 15,3 para amostra com D.O. baixa), com coeficientes de variação maiores para as D.O.s mais baixas, de acordo com o esperado. Em se tratando de novas metodologias, critérios de aceitação ainda não estão disponíveis para avaliação da variação entre os resultados. Nesses casos, orientações sobre gerenciamento de controle de qualidade indicam que se inicie o monitoramento através da testagem de amostras controle em níveis diferentes por no mínimo vinte vezes. Quanto mais amostras testadas e quanto maior o número de repetições, mais representativos os resultados obtidos. Portanto, os valores de CV% encontrados para o ELISA desenvolvido são um indicativo da variação intraensaio, mas não podem ainda ser considerados como determinantes desse parâmetro. Com relação à variação interensaio, foram observadas diferenças um pouco maiores, que podem ser explicadas por fatores como a temperatura do ambiente durante as incubações, o tempo de pipetagem durante a distribuição do substrato e do ácido na placa ou pequenas diferenças no volume durante a pipetagem da amostra de soro, por exemplo, refletindo a presença de erros aleatórios ao longo do processo. Além de CV% maiores já serem esperados entre experimentos independentes, a utilização de controles em cada placa permite que seja estabelecido um ponto de corte para cada rodada de testes e a variação observada para as amostras é suavizada, pois o ponto de corte acompanha essa flutuação, mitigando possíveis problemas com a avaliação dos resultados (CONTROLLAB, 2011).

Para estimar o custo por amostra dos kits comercializados, utilizamos a mesma lógica de excluir os poços utilizados para controles, conforme orientação de cada kit e chegamos a um valor médio de 52 reais por amostra – se considerado o valor de conversão do dólar em real de acordo com a cotação de 10/01/2022. Quando utilizada a cotação fornecida pelo revendedor local de um dos produtos, o custo por amostra chegou a R\$89,20. Esses números implicam uma diferença de valor por amostra entre os kits comercializados e o teste desenvolvido bastante significativa (no mínimo R\$50,56), evidenciando que a utilização do teste desenvolvido é vantajosa financeiramente. As porcentagens acrescidas ao valor das matérias-primas, que representam uma estimativa de gasto com itens menores não contabilizados, recursos humanos e taxas de manutenção do laboratório foram baseadas em ALVIM *et al.* (2021).

Ao extrapolar o método para o desenvolvimento de um ELISA que identificasse IgG anti-SARS-CoV-2 humano, encontramos um processo um pouco mais complexo, pois o soro humano possui mais interferentes, problemática extensivamente mostrada por Waritani *et al.* (2017). Foi preciso substituir a solução de bloqueio por uma contendo leite, aumentar o tempo de bloqueio, incluir lavagens após a sensibilização da placa com a proteína e após o bloqueio devido a sedimentação do leite. Ainda, as lavagens precisaram ser realizadas com período de molho entre uma e outra e por 5 vezes ao invés de 3 para que obtivéssemos um delta satisfatório entre a D.O. das amostras positivas e negativas. É previsível que essas mudanças sejam necessárias visto que os camundongos utilizados para coleta do soro após imunização são isogênicos e mantidos em microisoladores sem exposição prévia a outros antígenos, já os soros humanos são de indivíduos adultos com exposição prévia a outras vacinas e infecções naturais, portanto, com maior quantidade de anticorpos circulantes e maior chance de ligações inespecíficas.

Comparando as D.O.s obtidas no ELISA anti-Spike e anti-RBD para soro humano, vê-se valores um pouco mais baixos no anti-RBD. Esse resultado pode ser explicado pela quantidade de proteína utilizada que difere entre eles: 3 µg/mL de Spike e 1 µg/mL de RBD, ou ainda pela presença de anticorpos contra outras porções da Spike que não a RBD. Como próximo passo para otimização do ELISA anti-RBD, pode ser avaliado um aumento do tempo de desenvolvimento da reação enzima-substrato para verificar se D.O.s maiores são atingidas desta maneira.

Entre os benefícios de utilizar a RBD para o ensaio com soro humano está o fato de ela não ser um antígeno altamente conservado entre os SARS-CoVs e os outros coronavírus

responsáveis por causar resfriado comum e por isso a chance de a RBD do SARS-CoV-2 ser reconhecida por anticorpos gerados em infecções prévias pelos agentes causadores do resfriado comum é reduzida (PREMKUMAR *et al.*, 2020).

Por fim, após os ajustes no protocolo, o teste de ELISA para detecção de imunoglobulinas em soro humano mostrou-se capaz de identificar diferenças importantes entre as amostras testadas. Por exemplo: na **Figura 6** observa-se uma amostra com níveis mais altos de D.O. antes da imunização e trata-se de um indivíduo com infecção natural prévia – está demonstrado na literatura que pacientes convalescentes tendem a apresentar anticorpos anti-Spike/anti-RBD em decorrência do contato com o vírus (EYRE *et al.*, 2021). Vê-se ainda uma tendência de elevação nos níveis de anticorpos circulantes após a segunda dose acordando com o previsto (HERZBERG *et al.*, 2021). Além disso, a variação interindividual nos níveis de D.O. detectados também está de acordo com o descrito e reflete o que acontece na população total de vacinados (FOLEGATTI *et al.*, 2020; MULLIGAN *et al.*, 2020).

5 CONCLUSÃO

Com o uso de materiais e reagentes relativamente comuns em laboratórios, foram desenvolvidos métodos imunoenzimáticos válidos capazes de detectar IgG anti-RBD em soro de camundongos e humanos. A partir dessas experimentações foram gerados dois protocolos operacionais padrão (POP) – Um descrevendo o procedimento para execução do ELISA anti-SARS-CoV-2 em soro murino (**ANEXO B**) e outro descrevendo o procedimento para execução do ELISA anti-SARS-CoV-2 em soro humano (**ANEXO C**).

Ainda, com uso otimizado dos reagentes necessários o ensaio para detecção de IgG anti-RBD murina permite titular os soros testados com boa repetibilidade e com um custo por amostra que pode chegar a ser 62 vezes menor quando comparado aos kits disponíveis no mercado.

Para avaliação mais completa do desempenho do teste, no futuro pode-se comparar os resultados obtidos com os gerados a partir do uso de kits comercializados e determinar características como sensibilidade e especificidade. Além disso, podem ser produzidos anticorpos monoclonais que permitam transformar o ensaio em quantitativo.

REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Cellular and Molecular Immunology**. 10. ed. Philadelphia: Elsevier, 2021.

ACRO BIOSYSTEMS. **Mouse Anti-SARS-CoV-2 Antibody IgG Titer Serologic Assay Kit (Spike Trimer)**. Disponível em: <https://www.acrobiosystems.com/P4029-Mouse%C2%A0Anti-SARS-CoV-2%C2%A0Antibody%C2%A0IgG%C2%A0Titer%C2%A0Serologic%C2%A0Assay%C2%A0Kit-%28Spike-Trimer%29.html>. Acesso em: 22 jul. 2021.

ALPHA DIAGNOSTIC INTERNATIONAL. **Recombivirus Mouse Anti SARS-CoV-2 (COVID) Spike 1 RBD IgG ELISA Kit**. Disponível em: <https://www.4adi.com/4adi/recombivirus-mouse-anti-sars-cov-2-covid-spike-1-rbd-igg-elisa-kit-34060-p.html>. Acesso em: 11 jan. 2022.

ALVIM, Renata G.F. *et al.* Development and large-scale validation of a highly accurate SARS-COV-2 serological test using regular test strips for autonomous and affordable finger-prick sample collection, transportation, and storage. Preprint, submetido em 7 de julho de 2021. <https://doi.org/10.1101/2020.07.13.20152884>

ARTS, Rob J.W. *et al.* BCG Vaccination Protects against Experimental Viral Infection in Humans through the Induction of Cytokines Associated with Trained Immunity. **Cell Host & Microbe**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 89-100, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2017.12.010>.

BENÉVOLO-DE-ANDRADE, Thereza Christina *et al.* BCG Moreau Rio de Janeiro: an oral vaccine against tuberculosis - review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 100, n. 5, p. 459-465, ago. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762005000500002>.

BOS, Rinke *et al.* Ad26 vector-based COVID-19 vaccine encoding a prefusion-stabilized SARS-CoV-2 Spike immunogen induces potent humoral and cellular immune responses. **Npj Vaccines**, [S.L.], v. 5, n. 1, 28 set. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41541-020-00243-x>.

BRASIL. Anvisa. Ministério da Saúde. **Guia sobre os requisitos mínimos para submissão de solicitação de autorização temporária de uso emergencial, em caráter experimental, de vacinas Covid-19**. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/medicamentos/publicacoes-sobre-medicamentos/guia-sobre-os-requisitos-minimos-para-submissao-de-solicitacao-de-autorizacao-temporaria-de-uso-emergencial-em-carater-experimental-de-vacinas-covid-19>. Acesso em: 07 jan. 2022.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. **BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO ESPECIAL: doença pelo novo coronavírus - covid-19**. 2021a. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/julho/16/boletim_epidemiologico_covid_71.pdf. Acesso em: 24 jul. 2021.

BRASIL. Anvisa. Ministério da Saúde. **Vacinas - Covid-19**. 2021b. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/vacinas>. Acesso em: 20 jul. 2021.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. **BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO ESPECIAL: doença pelo novo coronavírus – covid-19. Doença pelo Novo Coronavírus – COVID-19**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/covid-19/2022/boletim-epidemiologico-covid19-94.pdf/view>. Acesso em: 07 jan. 2022.

CONTROLLAB. **Gestão da Fase Analítica do Laboratório: como assegurar a qualidade na prática**. 2011. Disponível em: <https://controllab.com/ensino/livros/gestao-da-fase-analitica-do-laboratorio-como-assegurar-a-qualidade-na-pratica-vol-ii/>. Acesso em: 17 jan. 2022

EAGLE BIOSCIENCES. **Mouse SARS-CoV-2 IgG Antibody Spike RBD Quantitative ELISA**. Disponível em: <https://eaglebio.com/product/mouse-sars-cov-2-igg-spike-rbd-antibody-quantitative-elisa/>. Acesso em: 11 jan. 2022.

ESTADOS UNIDOS. Centers For Disease Control And Prevention. United States Department Of Health And Human Services. **Data tracker weekly review: interpretive summary for july16, 2021**. 2021. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/covid-data/covidview/index.html>. Acesso em: 21 jul. 2021.

ESTADOS UNIDOS. Centers For Disease Control And Prevention. United States Department Of Health And Human Services. **COVID Data Tracker: variant proportions. Variant Proportions**. 2022. Disponível em: <https://covid.cdc.gov/covid-data-tracker/#variant-proportions>. Acesso em: 06 jan. 2022.

EYRE, David W. *et al.* Quantitative SARS-CoV-2 anti-spike responses to Pfizer–BioNTech and Oxford–AstraZeneca vaccines by previous infection status. **Clinical Microbiology And Infection**, [S. L], v. 27, p. 7-14, 07 jun. 2021.

FASTER CURES. Milken Institute. **COVID-19 VACCINE TRACKER**. 2022. Disponível em: <https://www.covid-19vaccinetracker.org/>. Acesso em: 06 jan. 2022.

FOLEGATTI, Pedro M *et al.* Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. **The Lancet**, [s. l], v. 396, p. 467-478, 20 jul. 2020. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31604-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31604-4)

GAO, Qiang *et al.* Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. **Science**, [S.L.], v. 369, n. 6499, p. 77-81, 6 maio 2020. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.abc1932>.

GONZALEZ-PEREZ, Maria *et al.* The BCG Vaccine for COVID-19: first verdict and future directions. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 12, p. 1-15, 8 mar. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2021.632478>.

GUI, Miao *et al.* Cryo-electron microscopy structures of the SARS-CoV Spike glycoprotein reveal a prerequisite conformational state for receptor binding. **Cell Research**, [S.L.], v. 27, n. 1, p. 119-129, 23 dez. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2016.152>.

HACISULEYMAN, Ezgi *et al.* Vaccine Breakthrough Infections with SARS-CoV-2 Variants. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 384, n. 23, p. 2212-2218, 10 jun. 2021. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa2105000>.

HARTMAN, Holly *et al.* Absorbance summation: A novel approach for analyzing high-throughput ELISA data in the absence of a standard. **Plos One**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 1-12, 08 jun. 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198528J>

HEDMAN, K. *et al.* Avidity of IgG in serodiagnosis of infectious diseases. **Reviews In Medical Microbiology**, [s. l.], v. 4, p. 123-129, jul. 1993.

HERZBERG, Jonas *et al.* SARS-CoV-2-antibody response in health care workers after vaccination or natural infection in a longitudinal observational study. **Vaccine**, [S. L.], In Press, Corrected Proofs, 3 dez. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.11.081>

HODCROFT, Emma B. **Overview of Variants in Countries**. 2022. Disponível em: <https://covariants.org/per-country>. Acesso em: 06 jan. 2022.

HUANG, Yuan *et al.* Structural and functional properties of SARS-CoV-2 Spike protein: potential antiviral drug development for covid-19. **Acta Pharmacologica Sinica**, [S.L.], v. 41, n. 9, p. 1141-1149, 3 ago. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>.

JONAS VALENTE. Agência Brasil. **Covid-19: Brasil tem 143 casos da variante Delta do novo coronavírus**: foram registradas nove mortes de pessoas infectadas com a cepa. 2021. Editada por: Aline Leal. Disponível em: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2021-07/covid-19-brasil-tem-143-casos-da-variante-delta-do-novo-coronavirus>. Acesso em: 24 jul. 2021.

KAUFMANN, Stefan H. E. *et al.* Vaccination Against Tuberculosis: revamping bcg by molecular genetics guided by immunology. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 11, 27 fev. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.00316>.

KLEINNIJENHUIS, Johanneke *et al.* Bacille Calmette-Guérin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 109, n. 43, p. 17537-17542, 17 set. 2012. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1202870109>.

KRAMMER, Florian *et al.* SARS-CoV-2 vaccines in development. **Nature**, [S.L.], v. 586, n. 7830, p. 516-527, 23 set. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2798-3>.

MINIC, Rajna; ZIVKOVIC, Irena. Optimization, Validation and Standardization of ELISA. In: MÓZSIK, Gyula. **Norovirus**. London: Intechopen, 2021.

MULLIGAN, Mark J. *et al.* Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults. **Nature**, [S. L.], v. 586, p. 589-593, 12 ago. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2639-4>

OUR WORLD IN DATA. Global Change Data Lab. **Share of SARS-CoV-2 sequences that are the omicron variant, Sep 20, 2021 to Jan 10, 2022**. 2022a. Disponível em: <https://ourworldindata.org/grapher/covid-cases-omicron?tab=chart&country=~BRA>. Acesso em: 15 jan. 2022.

OUR WORLD IN DATA. Global Change Data Lab. **Vaccinations and COVID-19 – Data for Israel**. 2022b. Disponível em: <https://ourworldindata.org/vaccination-israel-impact>. Acesso em: 06 jan. 2022.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **COVID-19 Daily Update: 4 January 2022**. 2022. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/55553>. Acesso em: 06 jan. 2022.

PINTO, Dora *et al.* Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV antibody. **Nature**, [S.L.], v. 583, n. 7815, p. 290-295, 18 maio 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2349-y>.

PLANAS, Delphine *et al.* Sensitivity of infectious SARS-CoV-2 B.1.1.7 and B.1.351 variants to neutralizing antibodies. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 27, n. 5, p. 917-924, 26 mar. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-021-01318-5>.

POLACK, Fernando P. *et al.* Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 383, n. 27, p. 2603-2615, 31 dez. 2020. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa2034577>.

PREMKUMAR, Lakshmanane *et al.* The receptor-binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. **Science Immunology**, [s. l.], v. 5, n. 48, p. 1-9, 26 jun. 2020. DOI: 10.1126/sciimmunol.abc8413

RAMASAMY, Maheshi N *et al.* Safety and immunogenicity of ChAdOx1 nCoV-19 vaccine administered in a prime-boost regimen in young and old adults (COV002): a single-blind, randomised, controlled, phase 2/3 trial. **The Lancet**, [S.L.], v. 396, n. 10267, p. 1979-1993, dez. 2020. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)32466-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(20)32466-1).

R&D SYSTEMS. **ELISA development guide**: a guide for the use of antibodies in elisa development. Disponível em: <https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/edbapril02.pdf>. Acesso em: 22 dez. 2021.

SADOFF, Jerald *et al.* Interim Results of a Phase 1–2a Trial of Ad26.COV2.S Covid-19 Vaccine. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 384, n. 19, p. 1824-1835, 13 maio 2021. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa2034201>.

SANJUÁN, Rafael *et al.* Mechanisms of viral mutation. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [S.L.], v. 73, n. 23, p. 4433-4448, 8 jul. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-016-2299-6>.

SHANG, Jian; WAN, Yushun; LUO, Chuming; YE, Gang; GENG, Qibin; AUERBACH, Ashley; LI, Fang. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 117, n. 21, p. 11727-11734, 6 maio 2020. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2003138117>.

SINO BIOLOGICAL. **SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Spike RBD Antibody Titer Assay Kit (Mouse)**. Disponível em: <https://www.sinobiological.com/elisa-kits/coronavirus-sars-cov-2-Spike-antibody-titer-assay-kit006>. Acesso em: 22 jul. 2021.

MOGHADAS, Seyed M. *et al.* The Impact of Vaccination on Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreaks in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 73, n. 12, p. 2257-2264, 30 jan. 2021. doi: 10.1093/cid/ciab079

TANRIOVER, Mine Durusu *et al.* Efficacy and safety of an inactivated whole-virion SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac): interim results of a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial in turkey. **The Lancet**, [S.L.], v. 398, n. 10296, p. 213-222, jul. 2021. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)01429-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(21)01429-x)

TEE, Kang Lan *et al.* Purification of recombinant SARS-CoV-2 spike, its receptor binding domain, and CR3022 mAb for serological assay. **Biorxiv**, [S.L.], p. 1-30, 2 ago. 2020. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/2020.07.31.231282>.

VAN DOREMALEN, Neeltje *et al.* ChAdOx1 nCoV-19 vaccine prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques. **Nature**, [S.L.], v. 586, n. 7830, p. 578-582, 30 jul. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2608-y>.

VAZ, Adelaide J.; MACHADO, Isabel Daufenback; BUENO, Edneia Casagrande. Imunoensaios utilizando conjugados. In: VAZ, Adelaide J. *et al.* **Imunoensaios: fundamentos e aplicações**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018. Cap. 7. p. 110-118.

VOGEL, Annette B. *et al.* BNT162b vaccines protect rhesus macaques from SARS-CoV-2. **Nature**, [S.L.], v. 592, n. 7853, p. 283-289, 1 fev. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-021-03275-y>.

WARITANI, Takaki *et al.* An ELISA protocol to improve the accuracy and reliability of serological antibody assays. **Methodsx**, [S. L.], v. 4, p. 153-165, 30 mar. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mex.2017.03.002>

WILHELM, Alexander *et al.* Reduced Neutralization of SARS-CoV-2 Omicron Variant by Vaccine Sera and Monoclonal Antibodies. Preprint, submetido em 13 dez. 2021. <https://doi.org/10.1101/2021.12.07.2126743>

World Health Organization. **WHO Technical Report Series, No. 927, 2005**. WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines. 2005. Disponível em: https://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/nonclinical_evaluation/ANNEX%201Nonclinical.P31-63.pdf?ua=1. Acesso em: 07 jan. 2022.

World Health Organization. WHO Director-General's remarks at the media briefing on 2019-nCoV on 11 February 2020. **World Health Organization**, 2020a. Disponível em: <<https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020>>. Acesso em: 18 de jul. de 2021.

World Health Organization. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) Situation Report – 51. 11 Mar. 2020. World Health Organization, 2020b. Disponível em: <<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>>. Acesso em: 18 de jul. de 2021.

World Health Organization. COVID-19 weekly epidemiological update, edition 48, 13 Jul. 2021. World Health Organization, 2021a. Disponível em: <<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>>. Acesso em: 18 de jul. de 2021.

World Health Organization. Tracking SARS-CoV-2 variants. **World Health Organization**, 2022. Disponível em: <<https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>>. Acesso em: 06 de jan. de 2022.

WU, Aiping; PENG, Yousong; HUANG, Baoying; DING, Xiao; WANG, Xianyue; NIU, Peihua; MENG, Jing; ZHU, Zhaozhong; ZHANG, Zheng; WANG, Jiangyuan. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. **Cell Host & Microbe**, [S.L.], v. 27, n. 3, p. 325-328, mar. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2020.02.001>.

WU, Fan *et al.* Evaluating the Association of Clinical Characteristics With Neutralizing Antibody Levels in Patients Who Have Recovered From Mild COVID-19 in Shanghai, China. **Jama Internal Medicine**, [S.L.], v. 180, n. 10, p. 1356, 1 out. 2020. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.4616>.

YUAN, Meng *et al.* A highly conserved cryptic epitope in the receptor binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. **Science**, [S.L.], v. 368, n. 6491, p. 630-633, 3 abr. 2020. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.abb7269>.

ŽAK, Magdalena M. *et al.* Development and characterization of a quantitative ELISA to detect anti-SARS-CoV-2 spike antibodies. **Heliyon**, [S.L.], v. 7, n. 12, p. 1-7, dez. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08444>.

ZHOU, Peng *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, [S.L.], v. 579, n. 7798, p. 270-273, 3 fev. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>

ZHU, Na *et al.* A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 382, n. 8, p. 727-733, 20 fev. 2020. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa2001017>.

ANEXO A – TCLE



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
 Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
 Centro de Ciências Biológicas - Divisão de Imunologia
 88049-900, Campus Universitário, Florianópolis, SC, Brasil

AVALIAÇÃO DO IMPACTO NO APARELHO RESPIRATÓRIO A LONGO PRAZO NO ÂMBITO DA COVID-19: UM ESTUDO DE COORTE

A Universidade Federal de Santa Catarina está empenhada em investigar as repercussões da COVID-19 no organismo a curto e longo prazo, envolvendo as questões inflamatórias e para tanto necessitamos de voluntários saudáveis para obter amostras de sangue para comparação.

O(a) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a) saudável, em uma pesquisa que tem como objetivo avaliar o estado de saúde de pessoas após a COVID-19 e as possíveis consequências respiratórias decorrentes desta infecção que podem ser hiper-reatividade brônquica, bronquiolite e fibrose pulmonar. No período de dois anos, pacientes com COVID-19 serão recrutados no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC) e acompanhados através de exames incluindo de sangue para avaliação da presença de inflamação. Paralelamente, voluntários saudáveis serão recrutados no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP/UFSC) para coleta de sangue, apenas.

Ao ingressar no estudo, o(a) senhor(a) doará sangue para exames de inflamação nas células e plasma. Os benefícios e as vantagens em participar dessa pesquisa serão que, com os dados coletados por meio das avaliações do estudo, os profissionais da saúde poderão analisar os marcadores inflamatórios presentes nas células e plasma. Se desejar, o(a) senhor(a) terá acesso a resultados das avaliações. A coleta de sangue poderá causar algum desconforto ou dor no local de introdução da agulha, porém de caráter transitório, e será realizada por profissional habilitado para tal. O(a) senhor(a) poderá recusar a coleta de sangue ou retirar-se do estudo a qualquer momento.

Esta pesquisa está pautada na resolução 466/12, de acordo com o Conselho Nacional de Saúde (CNS). Durante todo o período da pesquisa, os participantes terão direito a esclarecimento de dúvidas, bastando para isso entrar em contato com os pesquisadores ou com o Conselho de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH). Os convidados terão garantido seu direito de não aceitar participar ou de retirar sua permissão a qualquer momento, sem nenhum tipo de penalização por sua decisão. Além disso, participantes e acompanhantes estarão isentos de despesas decorrentes da participação na pesquisa. Eventuais despesas decorrentes exclusivamente da participação no projeto de pesquisa serão ressarcidas mediante comprovação. Participantes que sofrerem danos decorrentes das avaliações do estudo terão direito a assistência integral que será prestada pelo Núcleo de Pesquisa em Asma e Inflamação das Vias Aéreas e pelo HU/UFSC. Ao assinar este termos, o Sr.(a) não está renunciando ao direito de indenização adquirido por vias legais. As informações desta pesquisa são confidenciais, sendo divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos participantes (a não ser entre os pesquisadores) e sendo assegurado o sigilo sobre sua participação.

População de estudo

Nós recrutaremos 30 indivíduos adultos saudáveis entre 18 e 50 anos. Se você concordar em participar no estudo, nós utilizaremos os glóbulos brancos que serão separados do sangue doado.

O sangue que você está doando servirá para a obtenção de leucócitos e plasma. Se você for elegível, coletaremos **10mL de sangue venoso** e seus os glóbulos brancos serão utilizados para experimentos no laboratório. As células serão colocadas no tubo de ensaio e serão expostas a vírus e bactérias ou produtos patogênicos. Assim, podemos estudar os aspectos relacionados a defesa contra o coronavírus. Nós pedimos também sua permissão para mantermos suas células e plasma em condições apropriadas para uso no futuro. Essas amostras serão armazenadas por 10 anos.

- ____ SIM, você pode armazenar minhas amostras para a pesquisa futura.
____ NÃO, você não pode armazenar minhas amostras para a pesquisa futura.

As amostras biológicas (soro, células e sobrenadantes de células) serão estocadas num freezer -80°C localizado no laboratório do Coordenador do projeto por 10 anos. Apenas o coordenador terá acesso a estas amostras. Nós mediremos os mediadores inflamatórios nestas amostras para estudar a resposta imune humana durante a COVID19. Entretanto, nenhuma pesquisa com as amostras estocadas será realizada sem antes ter a aprovação pelo comitê de ética em pesquisas com seres humanos da UFSC.

Riscos/Desconfortos:

A retirada de sangue é um procedimento padrão rotineiro com riscos mínimos envolvidos. Você pode experimentar algum desconforto ligeiro no local da entrada da agulha e pode haver alguma lesão. Além disso, há um risco muito pequeno de você desmaiar ou ter infecção no local da entrada da agulha. Você tem a garantia de plena liberdade de recusar-se a participar, ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma. **A participação no estudo não é obrigatória e caso não deseje participar ou se quiser abandonar o estudo, receberá a mesma atenção da nossa equipe.** Sempre existe a possibilidade remota da quebra de sigilo, mesmo que involuntário e não intencional, cujas consequências serão tratadas nos termos da lei.

Garantia de sigilo e confidencialidade:

Seus registros médicos na UFSC são confidenciais. O sigilo e a privacidade dos participantes da pesquisa estão garantidos durante todas as fases desta pesquisa. Quando os resultados de um estudo da UFSC são relatados em jornais médicos ou em reuniões científicas, as pessoas que fazem parte do exame não são identificadas. Na maioria dos casos a UFSC não liberará nenhuma informação sobre sua participação na pesquisa sem sua permissão escrita. Entretanto, você deve saber que nós podemos liberar alguma informação de seu registro médico sem sua permissão, por exemplo, se for requerido por oficiais da lei ou outras pessoas autorizadas.

Agradecemos a sua participação e colaboração,

Prof. Dra. Rosemeri Maurici

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), HU/UFSC, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, Santa Catarina (SC) – CEP 88040-970.

Telefones: +55 (48) 3721-9014; +55 (48) 98805-4510.

Prof. Dr. André Báfica,

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), MIP/UFSC, Campus Universitário, Trindade, Florianópolis, Santa Catarina (SC) – CEP 88040-970.

Telefones: +55 (48) 3721-2950; +55 (48) 99696-0079.

Se o(a) senhor(a) tiver alguma dúvida ou consideração sobre a ética desta pesquisa, entre em contato com o CEPESH da UFSC.

Endereço: Rua Desembargador Vitor Lima, nº 222, Prédio da Reitoria II, 4º andar, sala 401, Trindade, Florianópolis, SC. Telefone: +55 (48) 3721-6094.

CONSENTIMENTO EM PARTICIPAR

Declaro que fui informado(a) sobre todos os procedimentos da pesquisa, que recebi de forma clara e objetiva todas as explicações pertinentes ao estudo e que todos os meus dados coletados serão sigilosos. Tive tempo para tomar a decisão, bem como chance de fazer questionamentos sobre o estudo. Minhas dúvidas foram esclarecidas. Estou ciente de que posso interromper a participação no estudo em qualquer momento.

Nome do(a) Participante por Extenso

Assinatura do(a) Participante	Data

Assinatura do(a) Pesquisador(a)	Data

Nota: O presente Termo terá duas vias, uma ficará à guarda dos pesquisadores e a outra via será de posse do(a) próprio(a) participante da pesquisa.

ANEXO B – POP ELISA murino

	Protocolo Operacional Padrão	Código	001	
		Edição	1	
	Detecção de IgG anti-RBD por ELISA em soro de camundongos	Implementado em	24/05/2021	
		Página	1 de 4	

Objetivo:

Orientar e execução do teste de ELISA para detecção de IgG anti-RBD em soro de camundongos.

Materiais e Reagentes:

- Placa simples para diluição;
- Placa de alta adsorção para ELISA (Corning);
- Tubos do tipo Falcon de 15 e 50 mL;
- RBD recombinante;
- PBS 1X;
- PBS 1X + 0,05% de Tween 20 (500 mL de PBS + 250 µL de Tween 20);
- PBS 1X + 2% de BSA + 0,05% de Tween 20 (50 mL de PBS + 1 g de BSA + 25 µL de Tween);
- Anticorpo secundário anti-mouse IgG conjugado a HRP;
- TMB (substrato para peroxidase);
- HCl 1 N (45,8 mL de H₂O destilada + 4,2 mL de HCl 37%);
- Micropipetas e ponteiras;
- Espectrofotômetro com filtro para leitura em 450 nm.

Controle de Qualidade:

Manter no mínimo 2 soros controle positivos, 5 soros controle negativos e 2 brancos por placa.

Descrição do Procedimento:

Sensibilização

1. Adicionar 50 µL por poço de solução de RBD em PBS na concentração de 1 µg/mL;
2. Rotacionar a placa por 1 min ~300 g para garantir que o fundo dos poços sejam cobertos homogeneamente com a solução protéica;
3. Incubar *overnight*, em geladeira (2-8°C);
4. Descartar a solução de proteína e bater a placa em papel absorvente até ficar bem seca;

Bloqueio

5. Adicionar 150 µL por poço da solução de bloqueio (PBS + 2% de BSA + 0,05% de Tween 20) à placa;

Elaborado por	Revisado por	Aprovado por
Nicoli De Bona Heck	Daniel A. G. B. Mendes	André Luiz B. Báfica
14/05/2021	19/05/2021	24/05/2021

	Protocolo Operacional Padrão	Código	001
		Edição	1
	Detecção de IgG anti-RBD por ELISA em soro de camundongos	Implementado em	24/05/2021
		Página	2 de 4

6. Incubar em temperatura ambiente por 1 hora;

Incubação com as amostras

7. Centrifugar as amostras a 14.000 g por 10 min para retirar resíduos de fibrina (podem interferir na reação);
8. Diluir os soros em PBS + 2% de BSA + 0,05% de Tween 20 em placas simples para diluição:
 - **Triagem:** Diluir amostras 1:100.
9. Descartar o PBS + 2% de BSA + 0,05% de Tween 20 e bater a placa em papel absorvente até ficar bem seca;
10. Transferir 50 µL dos soros diluídos para a placa de ELISA;
11. Incubar por 2 h a temperatura ambiente;
12. Lavar a placa 3x com aproximadamente 200 µL de solução de lavagem/poço (PBS 1x + 0,05% de Tween 20), usando uma pisseta;
13. Bater a placa em papel absorvente até ficar bem seca;

Incubação com o anticorpo secundário

14. Preparar o anticorpo secundário anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (HRP) (Cell Signaling cód.: 7076S 1:5.000) em PBS + 2% de BSA + 0,05% de Tween 20;
15. Adicionar 50 µL/poço da solução de anticorpo secundário diluída;
16. Incubar por 1,5 horas a temperatura ambiente;
17. Lavar a placa 3x com aproximadamente 200 µL de solução de lavagem/poço (PBS 1x + 0,05% de Tween 20), usando uma pisseta;
18. Bater a placa em papel absorvente até ficar bem seca;

Adição do substrato

19. Adicionar 50 µL/poço do substrato TMB Scienco;

Elaborado por	Revisado por	Aprovado por
Nicoli De Bona Heck	Daniel A. G. B. Mendes	André Luiz B. Báfica
14/05/2021	19/05/2021	24/05/2021

	Protocolo Operacional Padrão	Código	001	
		Edição	1	
	Detecção de IgG anti-RBD por ELISA em soro de camundongos	Implementado em	24/05/2021	
		Página	3 de 4	

20. Contar 10 minutos a partir da adição no primeiro poço;
 → monitorar a reação, comparando o branco com o controle negativo e positivo;

Parada da reação

21. Adicionar 50 µL/poço de HCl 1 N para parar a reação;
 22. Ler a absorbância no comprimento de onda de 450 nm em espectrofotômetro.

Comentários:

- Fazer todas as incubações em câmara úmida (pote plástico com algodão ou papel molhado no fundo, a fim de evitar perda do líquido por evaporação);
- Utilizar o TMB da Scienco (cód.: S1TMB) que desenvolve a reação enzimática mais lentamente;
- O ponto de corte será calculado através da média das amostras controle negativas + 3x o seu desvio padrão.

Normas de segurança:

Utilizar luvas de procedimento e jaleco para todas as etapas do procedimento.

Elaborado por	Revisado por	Aprovado por
Nicoli De Bona Heck	Daniel A. G. B. Mendes	André Luiz B. Báfica
14/05/2021	19/05/2021	24/05/2021

	Protocolo Operacional Padrão	Código	001	
		Edição	1	
	Detecção de IgG anti-RBD por ELISA em soro de camundongos	Implementado em	24/05/2021	
		Página	4 de 4	

ANEXO A:

Sugestão de desenho de placa para Triagem:



Soro controle positivo 1	Soro controle positivo 2	Soro Controle negativo 1	Soro Controle negativo 2	Soro Controle negativo 3	Soro Controle negativo 4	Soro Controle negativo 5	Branco (Sem soro)	Branco (Sem soro)	Soro teste 1	Soro teste 2	Soro teste 3
Soro teste 4	...										

Elaborado por	Revisado por	Aprovado por
Nicoli De Bona Heck	Daniel A. G. B. Mendes	André Luiz B. Báfica
14/05/2021	19/05/2021	24/05/2021

ANEXO C – POP ELISA humano

	Protocolo Operacional Padrão	Código	001	
		Edição	1	
	Detecção de IgG anti-SARS-CoV-2 por ELISA em soro humano	Implementado em	09/08/2021	
		Página	1 de 4	

Objetivo:

Orientar e execução do teste de ELISA para detecção de IgG anti-SARS-CoV-2 em soro humano.

Materiais e Reagentes:

- Placa simples para diluição;
- Placa de alta adsorção para ELISA (*Nunc Maxisorp*);
- Tubos do tipo Falcon de 15 e 50 mL;
- Spike recombinante;
- PBS 1X;
- PBS 1X + 0,05% de Tween 20 (500 mL de PBS + 250 µL de Tween 20);
- PBS + 1% de BSA + 3% de Leite + 0,05% de Tween 20 (50 mL de PBS + 1 g de BSA + 25 µL de Tween);
- Anticorpo secundário anti-human IgG conjugado a HRP;
- TMB (substrato para peroxidase);
- HCl 1 N (45,8 mL de H₂O destilada + 4,2 mL de HCl 37%);
- Micropipetas e ponteiros;
- Espectrofotômetro com filtro para leitura em 450 nm.

Controle de Qualidade:

Manter no mínimo 2 soros controle positivos, 8 soros controle negativos e 2 brancos por placa.

Descrição do Procedimento:

Sensibilização

1. Adicionar 50 µL por poço de solução de antígeno em PBS
 - Spike na concentração de 3 µg/mL;
 - RBD na concentração de 1 µg/mL;
2. Rotacionar a placa por 1 min ~300 g para garantir que o fundo dos poços sejam cobertos homogeneamente com a solução protéica;
3. Incubar *overnight*, em geladaria (2-8°C);
4. Descartar a solução de proteína;
5. Lavar a placa 3x, com o auxílio de uma pisseta, com \cong 200 µL de PBS+tween/poço, com intervalo de 1 min entre as lavagens e bater a placa em papel absorvente até ficar bem seca;

Elaborado por	Revisado por	Aprovado por
Nicoli De Bona Heck	Daniel A. G. B. Mendes	André Luiz B. Báfica
05/08/2021	06/08/2021	09/08/2021

	Protocolo Operacional Padrão	Código	001	
		Edição	1	
	Detecção de IgG anti-SARS-CoV-2 por ELISA em soro humano	Implementado em	09/08/2021	
		Página	2 de 4	

Bloqueio

6. Adicionar 150 µL por poço da solução de bloqueio (PBS + 1% de BSA + 3% de Leite + 0,05% de Tween 20) à placa;
7. Incubar em temperatura ambiente por 2 horas;
8. Lavar a placa 3x, com o auxílio de uma pisseta, com $\cong 200$ µL de PBS+tween/poço, com intervalo de 1 min entre as lavagens e bater a placa em papel absorvente até ficar bem seca;

Incubação com as amostras

9. Centrifugar as amostras a 14.000 g por 10 min para retirar resíduos de fibrina (podem interferir na reação);
10. Diluir os soros em PBS + 1% de BSA + 3% de Leite + 0,05% de Tween 20 em placas simples para diluição:
 - ➔ Diluir amostras 1:100.
11. Descartar PBS + 1% de BSA + 3% de Leite + 0,05% de Tween 20;
12. Lavar a placa 3x, com o auxílio de uma pisseta, com $\cong 200$ µL de PBS+tween/poço, com intervalo de 1 min entre as lavagens e bater a placa em papel absorvente até ficar bem seca;
13. Transferir 50 µL dos soros diluídos para a placa de ELISA;
14. Incubar por 2 h a temperatura ambiente;
15. Lavar a placa 5x, com auxílio de uma pisseta, com $\cong 200$ µL de PBS+tween/poço, com intervalo de 1 min entre as 4 primeiras lavagens e 5 min na última e bater a placa em papel absorvente até ficar bem seca;

Incubação com o anticorpo secundário

16. Preparar o anticorpo secundário a anti-human IgG-horseradish peroxidase (HRP) (Invitrogen cód.: A18811 1:5.000) em PBS + 1% de BSA + 3% de Leite + 0,05% de Tween 20;

Elaborado por	Revisado por	Aprovado por
Nicoli De Bona Heck	Daniel A. G. B. Mendes	André Luiz B. Báfica
05/08/2021	06/08/2021	09/08/2021

	Protocolo Operacional Padrão	Código	001	
		Edição	1	
	Detecção de IgG anti-SARS-CoV-2 por ELISA em soro humano	Implementado em	09/08/2021	
		Página	3 de 4	

17. Adicionar 50 µL/poço da solução de anticorpo secundário diluída;

18. Incubar por 1,5 horas a temperatura ambiente;

19. Lavar a placa 5x, com auxílio de uma pisseta, com $\cong 200$ µL de PBS+tween/poço, com intervalo de 1 min entre as 4 primeiras lavagens e 5 min na última e bater a placa em papel absorvente até ficar bem seca;

Adição do substrato

20. Adicionar 50 µL/poço do substrato TMB Scienco;

21. Contar 5 minutos a partir da adição no primeiro poço;

→ monitorar a reação, comparando o branco com o controle negativo e positivo;

Parada da reação

22. Adicionar 50 µL/poço de HCl 1 N para parar a reação;

23. Ler a absorbância no comprimento de onda de 450 nm em espectrofotômetro.

Comentários:

- Fazer todas as incubações em câmara úmida (pote plástico com algodão ou papel molhado no fundo, a fim de evitar perda do líquido por evaporação);
- Utilizar o TMB da Scienco (cód.: S1TMB) que desenvolve a reação enzimática mais lentamente;
- O ponto de corte será calculado através da média das amostras controle negativas + 3x o seu desvio padrão.

Normas de segurança:

Utilizar luvas de procedimento e jaleco para todas as etapas do procedimento.

Elaborado por	Revisado por	Aprovado por
Nicoli De Bona Heck	Daniel A. G. B. Mendes	André Luiz B. Báfica
05/08/2021	06/08/2021	09/08/2021

	Protocolo Operacional Padrão	Código	001	
		Edição	1	
	Detecção de IgG anti-SARS-CoV-2 por ELISA em soro humano	Implementado em	09/08/2021	
		Página	4 de 4	

ANEXO A:

 Sugestão de desenho de placa:

Soro controle positivo 1	Soro controle positivo 2	Soro Controle negativo 1	Soro Controle negativo 2	Soro Controle negativo 3	Soro Controle negativo 4	Soro Controle negativo 5	Soro Controle negativo 6	Soro Controle negativo 7	Soro Controle negativo 8	Branco (Sem soro)	Branco (Sem soro)
Soro teste 1	Soro teste 2	Soro teste 3	Soro teste 4	...							

Elaborado por	Revisado por	Aprovado por
Nicoli De Bona Heck	Daniel A. G. B. Mendes	André Luiz B. Báfica
05/08/2021	06/08/2021	09/08/2021