

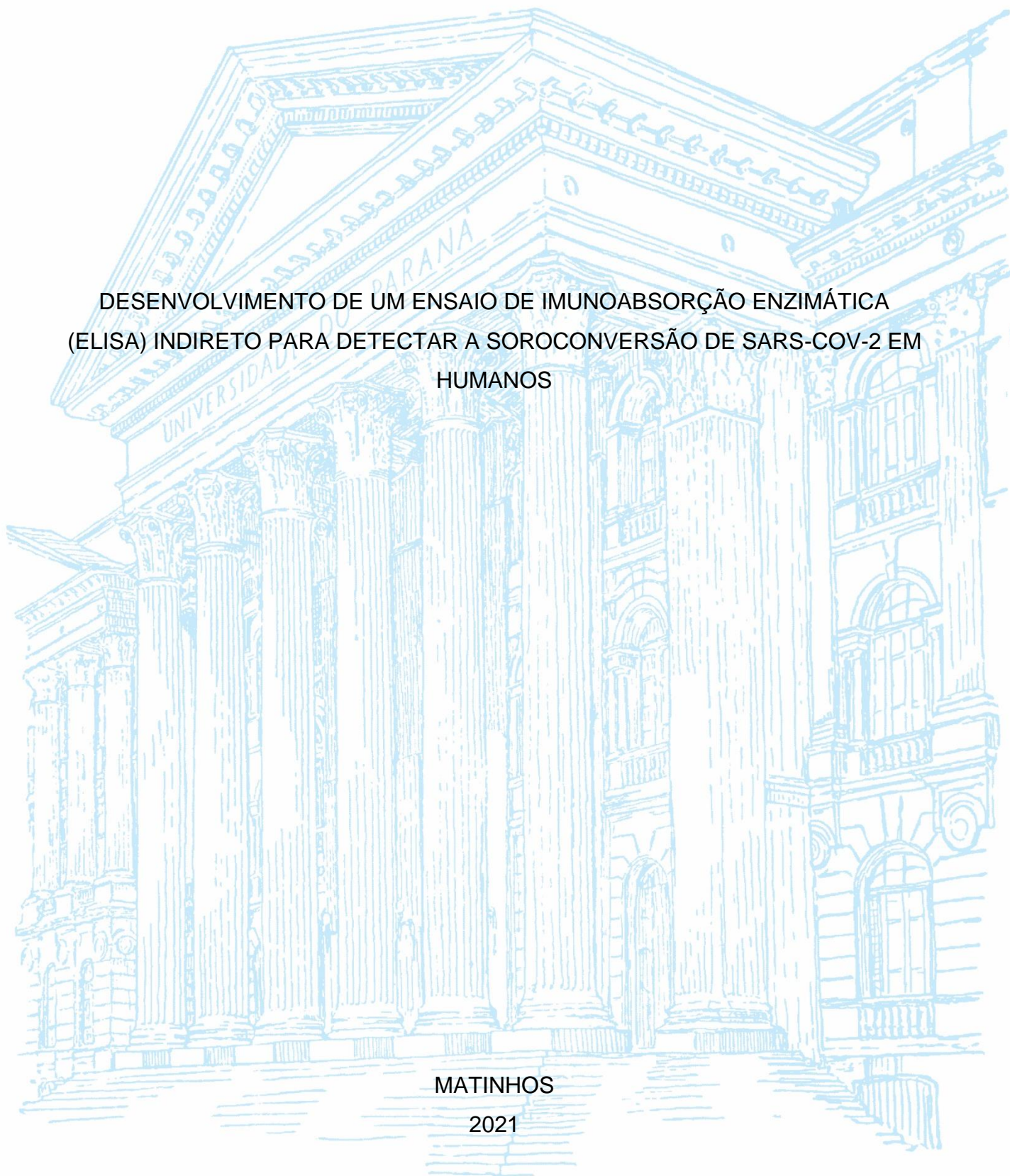
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARCELO DOS SANTOS CONZENTINO

DESENVOLVIMENTO DE UM ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA
(ELISA) INDIRETO PARA DETECTAR A SOROCONVERSÃO DE SARS-COV-2 EM
HUMANOS

MATINHOS

2021



MARCELO DOS SANTOS CONZENTINO

DESENVOLVIMENTO DE UM ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA
(ELISA) INDIRETO PARA DETECTAR A SOROCONVERSÃO DE SARS-COV-2 EM
HUMANOS

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Gestão Ambiental da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Gestão ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Fernandes Huergo

MATINHOS

2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço meu orientador e amigo Professor Dr. Luciano Fernandes Huergo primeiramente pelas excelentes aulas ministradas ao longo da minha graduação as quais despertaram meus interesses para pesquisa laboratorial em diferentes áreas, agradeço pela disponibilidade, orientação, apoio e pela amizade construída nessa trajetória. Agradeço sua paciência, seus ensinamentos e por todas as oportunidades em que me concedeu para o início da minha “estrada” acadêmica.

Agradeço ao Professor Dr. Karl Forchhammer e a Universidade de Turbigen pela doação do gene sintético capaz de expressar a proteína N. Agradeço a fundação Alexander von Humboldt pela doação de equipamentos.

A professora Dr. Fabiane G. Rego pelo fornecimento de amostras pré-pandêmicas.

Ao Hospital de Clínicas (CHC / UFPR) e Hospital Erasto Gaertner (HEG) pelo fornecimento de amostras controles positivos.

Agradeço a minha mãe, Leia, pelo amor e carinho que esteve presente em toda minha vida.

Agradeço especialmente meu pai, Valdir, que sempre me motivou a estudar, pelo amor e carinho, e por todos os seu gestos que possibilitaram a minha chegada e este momento, gostaria que você meu pai estivesse aqui para vivenciar está vitória. Muito obrigado, sua falta é muito grande para nossa família.

Agradeço minha companheira Ana Flávia, pelo apoio incondicional, compreensão, ajuda em todos os momentos e especialmente por seu companheirismo, carinho, amor durante esses anos.

Deixo meus profundos sentimentos a todas as famílias que perderam seus entes queridos por conta da COVID-19.

RESUMO

SARS-CoV-2 é um novo coronavírus membro da ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, gênero *Betacoronavirus*, em 2019 foi responsável por causar uma nova doença respiratória aguda conhecida como COVID-19, que se espalhou rapidamente fazendo com que a Organização Mundial da Saúde (OMS) decretasse como uma pandemia mundial em março de 2020. Para detectar a soroconversão de anticorpos anti-SARS-CoV-2 (agente etiológico da COVID-19) em humanos e realizar estudos epidemiológicos é necessário um teste sorológico de produção nacional e que tenha baixo custo. O objetivo deste estudo foi desenvolver um ensaio de Imunoabsorção Enzimática ELISA Indireto para detecção de anticorpos IgG anti-SARS-CoV-2 em amostras de soro e/ou plasma humano. A proteína recombinante do Nucleocapsídeo de SARS-CoV-2 fusionada a uma cauda e 6 histidinas foi expressa em células de *Escherichia coli* (BL21) e purificada por cromatografia de afinidade em coluna Hi-Trap-Chelating-Ni²⁺ (GE HEALTHCARE), em seguida foi analisada por SDS-PAGE. A proteína purificada foi utilizada para revestir placas de polistireno de 96 poços. Estas placas foram utilizadas para reação de ELISA indireto usando anti-IgG humano marcado com a enzima peroxidase HRP, as reações foram reveladas com substrato cromogênico. A sensibilidade do ensaio foi avaliada usando amostras de soro de 140 casos confirmados de COVID-19. A especificidade foi determinada testando 210 amostras de controles negativos pré-pandêmicos de soro humano. Os valores de densidade óptica bruta (OD_{450nm}) foram determinados e expressos como porcentagem de uma amostra referência ao longo da validação do método. A análise da curva de Características de Operação do Receptor (ROC) e a Análise de Área sob Curva (AUC) foram realizadas para avaliar o desempenho do ELISA desenvolvido. O valor de corte do ELISA Indireto validado foi definido em 12,5% do sinal em relação a referência, a sensibilidade do ensaio foi de 90% (IC 95%: 83,79% - 94,42%) e a especificidade foi de 98,1% (IC 95%: 95,20% - 99,48%). A ROC apresentou valor de AUC de 0,965 (IC 95%: 94,16% - 98,78%). A acurácia do ensaio desenvolvido foi similar a obtida em kits comerciais.

Palavras-chave: SARS-CoV-2. COVID-19. ELISA. Proteína do Nucleocapsídeo. Teste imunológico

ABSTRACT

SARS-CoV-2 is a novel coronavirus member of the order *Nidovirales*, family *Coronaviridae*, genus *Betacoronavirus*, in 2019 it was responsible for causing a new acute respiratory disease known as COVID-19, which spread rapidly making the World Health Organization (WHO) to declare it as a global pandemic in March 2020. To detect seroconversion of anti-SARS-CoV-2 antibodies (etiological agent of COVID-19) in humans and conduct epidemiological studies, a nationally produced, low-cost serological test is required. The aim of this study was to develop an Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay ELISA for the detection of anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies in human serum and/or plasma samples. Recombinant 6xHis-labeled SARS-CoV-2 nucleocapsid protein was expressed in *Escherichia coli* (BL21) cells and purified by Hi-Trap-Chelating column affinity chromatography (GE HEALTHCARE), then analyzed by SDS-PAGE. The purified protein was used to coat 96-well polystyrene plates (OLEN) at a concentration of 2 ng/ μ L per well. An indirect ELISA was performed using peroxidase labelled anti-human-IgG secondary antibody and HPR chromogenic substrate. The sensitivity of the assay was evaluated using serum samples from 140 confirmed cases of COVID-19. Specificity was determined by testing 210 samples from pre-pandemic negative human serum controls. Raw optical density (OD450) values were calculated and expressed as a percentage of a control sample. Receiver Operating Characteristics (ROC) curve analysis and Area Under Curve (AUC) analysis were performed to evaluate the performance of the developed ELISA. The cutoff value of the assay was set at 12.5%, the sensitivity was 90% (95% CI: 83.79% - 94.42%) and specificity 98.1% (95% CI: 95.20% - 99.48%). The ROC showed an AUC value of 0.965 (95% CI: 94.16% - 98.78%). The accuracy of the developed assay was similar to that obtained in commercial kits.

Palavras-chave: SARS-CoV-2. COVID-19. ELISA. Nucleocapsid protein. Immunological test.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PARTÍCULA VIRAL DOS MEMBROS DA FAMÍLIA CORONAVIRIDAE.....	15
FIGURA 2: ARQUITETURA DO GENOMA SARS-CoV-2.....	17
FIGURA 3: MECANISMO DE ENTRADA SARS-CoV-2.....	19
FIGURA 4: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS MÉTODOS DISPONÍVEIS PARA DETECÇÃO DE SARS-CoV-2.....	23
FIGURA 5: REPRESENTAÇÃO GERAL DO ELISA INDIRETO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA ANTÍGENO RECOMBINANTE SARS-COV-2.	27
FIGURA 6: PERFIL ELETROFORÉTICO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA N-SARS-COV-2 EM <i>E.COLI</i> /BL21.....	38
FIGURA 7: PERFIL ELETROFORÉTICO DAS FRAÇÕES OBTIDAS DURANTE A PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA N-SARS-CoV-2.....	39
FIGURA 8: COMPARAÇÃO DO PERFIL DE DILUIÇÃO CONTROLE POSITIVO E CONTROLE NEGATIVO NO ELISA INDIRETO.	40
FIGURA 9: RESPOSTA DA DENSIDADE ÓPTICA BRUTA EM RELAÇÃO A DILUIÇÃO RECÍPROCA.....	41
FIGURA 10: ANÁLISES CARACTERÍSTICAS DE OPERAÇÃO DO RECEPTOR (ROC).....	44
FIGURA 11: COMPARAÇÃO ENTRE OS CASOS DE COVID-19 LEVE E HOSPITALIZADOS.	45
FIGURA 12: ÁREA SOB CURVA (AUC).	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: COMPOSIÇÃO DO GEL DE SEPARAÇÃO PARA ANÁLISE DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA SOB CONDIÇÃO DESNATURANTE (SDS-PAGE).....	35
TABELA 2: COMPOSIÇÃO DO GEL DE EMPILHAMENTO PARA ANÁLISE DE ELETROFORESE (SDS-PAGE)	35
TABELA 3: CONTROLE DE ESTABILIDADE PLACAS DE ELISA INDIRETO E MÉDIA OD450 DE SORO DE PACIENTE POSITIVO PARA SARS-CoV-2 COM COVID-19.....	43

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: COMPARAÇÃO ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE COM ENSAIOS INTERNOS DESCRITOS NA LITERATURA.....	47
QUADRO 2: COMPARAÇÃO ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE, PPV E NPV EM PREVALÊNCIA 5% COM ENSAIOS COMERCIAIS APROVADOS PELA FDA (EUA)	49

LISTA DE ABREVIATURAS

µg - Micrograma

µL - Microlitro

ECA2 - Enzima Conversora da Angiotensina 2

AUC - Do inglês *Area Under Curve*

BSA - Soro albumina bovina

CoVs – Coronavírus

CRISPR - Do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

CV% - Coeficiente de variação em porcentagem

DNA - Ácido desoxirribonucleico

E - Proteína do envelope

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (do inglês *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*)

g - Força centrífuga

HPR - Do inglês *Horseradish Peroxidase*

IC - Intervalo de confiança

ICTV - Do inglês *International Committee on Taxonomy Viruses*

IPTG - Isopropil β-d-1-tiogalactopiranósido

kDa - Quilo Dalton

LB - Meio de cultura Luria Bertani

m - Massa

M - Molar

M - Proteína de membrana

mL - Mililitro

mM - Milimolar

mRNAs- RNAs mensageiros

N - Proteína do nucleocapsídeo

ng - Nanograma

nm - Nanômetro

NPV - Do inglês *Negative Predictive Values*

NSPs – Proteínas não estruturais

OD - Densidade óptica (do inglês *Optical Density*)

ORF - Quadros de leitura aberta (do inglês *Open Reading Frame*)

PPV - Do inglês *Positive Predictive Values*

qRT-PCR - Reação em cadeia de polimerase após transcrição reversa quantitativa

RBD – Domínio de ligação ao receptor

RNA - Ácido Ribonucleico

ROC curve - Do Inglês *Receiver Operating Characteristic Curve*

rpm - Rotação por minuto

RT-LAMP - Do inglês *Loop-mediated Isothermal Amplification*

S - Do inglês *Spike*

S1 - Subunidade 1

S2- Subunidade 2

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio (do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

TBST - Do inglês *Tris-Buffered Saline 0,1 Tween 20 Detergent*

TMB - 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

TMPRSS2 – Do inglês *Transmembrane Serine Protease 2*

v – Volume

V- Volts

SUMÁRIO

RESUMO	3
ABSTRACT	4
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	5
LISTA DE TABELAS	6
LISTA DE QUADROS	6
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 CORONAVÍRUS FILOGENIA	14
2.2 ORGANIZAÇÃO GENÔMICA E REPLICAÇÃO DO SARS-CoV-2	16
2.3 EPIDEMIOLOGIA E SINAIS CLÍNICOS	20
2.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	22
2.4.1 ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA)	25
3 JUSTIFICATIVA	29
4 OBJETIVO GERAL	30
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
5 MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.1 CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO VIA GENERAL BIOSYSTEMS	31
5.1.1 PREPARO DE CÉLULAS TERMOCOMPETENTES	31
5.1.2 TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO	32
5.1.3 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE N DO SARS-COV-2 EM <i>E. COLI</i> BL21 (ΔDE3)	32
5.2 LISE CELULAR E PURIFICAÇÃO PROTÉICA	33
5.2.1 DOSAGEM DE PROTEÍNA	34
5.2.2 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA SOB CONDIÇÃO DESNATURANTE (SDS-PAGE)	34
5.3 AMOSTRAS HUMANAS	35
5.4 ELISA INDIRETO	36
5.5 ANÁLISE DE DADOS	37
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38

	10
6.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA N DO SARS-COV-2	38
6.2 PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES PARA REALIZAÇÃO DE ELISA INDIRETO	39
6.3 VARIAÇÃO INTER E INTRA-ENSAIO	41
6.4 VALIDAÇÃO DO ELISA INDIRETO PARA DETECÇÃO SOROLÓGICA DE IgG ANTI-SARS-COV-2	43
6.5 AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE COM ENSAIOS COMERCIAIS E INTERNOS E VALORES PREDITIVOS POSITIVO E NEGATIVO	46
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
REFERÊNCIAS	51
ANEXO 1 – DADOS BRUTOS DE VALIDAÇÃO CASOS COVID-19	58
ANEXO 2 – DADOS BRUTOS VALIDAÇÃO CONTROLE PRÉ-PANDÊMICOS	62
ANEXO 3 – ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA PRÉ-PRINT medRxiv	67
ANEXO 4 – MEMORIAIS	75

1 INTRODUÇÃO

No final de dezembro de 2019, o surgimento de um novo coronavírus na cidade de Wuhan, localizada na província de Hubei, República Popular da China, se tornou responsável por provocar uma nova doença respiratória aguda, conhecida como doença do coronavírus 2019 (COVID-19) que se espalhou rapidamente pelo mundo fazendo com que a Organização Mundial da Saúde (OMS) decretasse em março de 2020, essa doença como uma pandemia mundial. Estima-se que 25,6% dos casos desenvolvem sintomas severos da doença, com uma taxa de mortalidade de 3,6 % (FU et al., 2020). De acordo com o website da Universidade John Hopkins (<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>) a eclosão da nova doença COVID-19 espantou o mundo ao contagiar mais de 44 milhões de pessoas e provocar 1.170.000 mortes em 20/10/2020,

Após o surto da enfermidade esforços concentrados de pesquisadores em todos os continentes, em cooperação com a OMS, identificaram o agente etiológico responsável pela COVID-19. Trata-se de um novo coronavírus (CoV) nomeado de SARS-CoV-2 (ZHU et al., 2020). Os Coronavírus (CoVs) são importantes patógenos virais com RNA (ácido ribonucleico) simples, polaridade positiva, ou seja, que servem diretamente para síntese proteica, pertencentes à família *Coronaviridae*. Este grupo de vírus é caracterizado por apresentar uma significativa variabilidade genética e alta taxa de recombinação que permite que sejam facilmente distribuídos a uma grande variedade de hospedeiros, tais como camelos, morcegos, camundongos, cães, gatos e humanos causando doenças respiratórias e entéricas graves (TU et al., 2020).

No que concerne à contaminação em humanos, os CoVs habitualmente causam resfriados, mas são capazes de provocar pneumonia e gastroenterite. A maioria dos CoVs relevantes clinicamente pertencem aos gêneros *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus* (LLANES et al., 2020; WU et al., 2020). O SARS-CoV-2 é o sétimo membro da família *Coronaviridae* que infecta humanos, e como o SARS-CoV e MERS-CoV é responsável pela infecção do trato respiratório inferior e pode causar Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG).

O surto da doença fez com que a OMS tomasse medidas drásticas para controlar a sua disseminação, incluindo a quarentena de milhões de pessoas, o distanciamento social e recomendou a realização de testes de diagnóstico em massa

na população como uma estratégia de combate à doença COVID-19, com o propósito de planejamento de estratégias de auxílio a regiões mais comprometidas pelo vírus e conhecimento do verdadeiro número de infectados.

Para casos confirmados de COVID-19, os sintomas comuns relatados incluem febre, tosse, mialgia ou fadiga. Contudo, esses sintomas não são exclusivos da COVID-19 em razão de serem semelhantes à outras doenças causadas por vírus (JIANG et al., 2020). Outra dificuldade enfrentada é a capacidade do vírus infectar pessoas por meio de portadores assintomáticos, podendo passar despercebido e se proliferando rapidamente dificultando a elaboração de estratégias para a contenção da doença (LI et al., 2020).

Na atualidade, a reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa em tempo real (qRT-PCR), imagem de tomografia computadorizada e alguns parâmetros hematológicos são as principais ferramentas para o diagnóstico clínico (JIN et al., 2020). Porém, devido à alta demanda mundial por insumos para diagnosticar a COVID-19, o mercado rapidamente careceu de kits diagnósticos e outros produtos relacionados, aumentando a necessidade do desenvolvimento de testes imunológicos. Os testes imunológicos detectam a presença de anticorpos (geralmente IgM e/ou IgG) em amostras de soro ou plasma humano alguns dias após a infecção, apontando também os indivíduos que já foram infectados, mesmo aqueles sendo assintomáticos. Anticorpos IgM são indicadores de infecção aguda enquanto IgG são observados durante a segunda semana de infecção ou estágios finais e/ou pós recuperação (JAYAMOHAN et al., 2020).

Apesar de os testes imunológicos dependerem do paciente já ter tido contato prévio com o vírus e o sistema imunológico apresentado resposta humoral específica contra o patógeno, anticorpos produzidos em resposta a exposição ao SARS-CoV-2, estes podem ser aplicados em escala massiva e são mais em conta e mais rápidos que o qRT-PCR que exige instalações de laboratório mais complexas com níveis restritivos de biossegurança e maior qualificação técnica (XIAO; WU; LIU, 2020). O qRT-PCR possibilita a detecção e a caracterização genética do vírus a partir do RNA viral encontrado principalmente em amostras do trato respiratório superior, oferecendo um nível de especificidade maior que os diagnósticos imunológicos principalmente nos estágios iniciais da infecção viral determinando a detecção e tipagem viral, no entanto

o RNA viral não permanece sempre detectável e pode não ser mais identificado após o estágio final da doença (JAYAMOHAN et al., 2020).

Independentemente de o crescente desenvolvimento de testes comerciais de detecção e quantificação de anticorpos contra o novo coronavírus SARS-CoV-2, estes em grande maioria são importados e apresentam elevados custos para serem utilizados em escala. Desta maneira, o desenvolvimento e aplicação de um meio de diagnóstico nacional que seja capaz de detectar anticorpos contra SARS-CoV-2, e tenha capacidade de atingir populações de maior vulnerabilidade socioeconômica é de extrema importância. Desta forma, o presente estudo tem como objetivo utilizar proteínas recombinantes para desenvolver um diagnóstico imunológico do tipo Imunoabsorção enzimática (ELISA) Indireto para detecção de IgG em amostras de soro e/ ou plasma humano, capazes de reconhecer antígenos do SARS-CoV-2.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CORONAVÍRUS FILOGENIA

A denominação “coronavírus” tem origem na palavra latina *corona* que significa coroa, em razão de sua morfologia viral apresentar quando vista sob microscopia eletrônica, aspecto sugestivo de coroa. Visto que, parece ser coroada por um anel característico de pequenas espículas salientes (SPAAN et al., 1988). De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), os coronavírus (CoVs) fazem parte da família *Coronaviridae* e encontra-se inserido na ordem *Nidovirales* que é composta pelos gêneros *Coronavirus* e *Torovirus*.

O gênero *Coronavirus* é subdividido em quatro subgêneros com base em suas particularidades filogenéticas, antigênicas como também investigações genotípicas: *Alphacoronavirus*; *Betacoronavirus*; *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus* (CHAN et al., 2015; CUI; LI; SHI, 2019; HARAPAN et al., 2020; ZUMLA et al., 2016). No caso do gênero *Betacoronavirus*, o ICTV atualmente o divide em cinco subgêneros, *Embecovirus*, *Sarbecovirus*, *Merbecovirus*, *Nobecovirus* e *Hibecovirus*, fundamentado a partir de análises filogenéticas de domínios de proteínas conservadas.

Sete CoVs são reconhecidos como causa comum de infecções do trato respiratório e, em menor proporção, no trato inferior em seres humanos, entre eles, os *Alphacoronavirus* NL63, 229E, *Embecovirus* OC43, HKU1 que ocasionam doença respiratória superior leve em indivíduos imunocompetentes e infecção do trato gastrointestinal. No entanto, nas últimas décadas, três CoVs altamente patogênicos emergiram na população humana como resultado de eventos de transbordamento de vida selvagem, sendo capazes de transmitir e causar doenças respiratórias graves. O primeiro, SARS-CoV em 2003 responsável pela Síndrome Respiratória Aguda Grave pertencente ao *Sarbecovirus* e o segundo *Merbecovirus* MERS-CoV em 2012 pela Síndrome Respiratória do Oriente Médio demasiadamente patogênicos, dado que levantaram preocupações significativas de saúde pública em consequência da sua emergência zoonótica, causando alta mortalidade em humanos (CUI; LI; SHI, 2019; HELMY et al., 2020).

E por último identificado no final de 2019, o *Sarbecovirus* SARS-CoV-2 de origem zoonótica responsável pela infecção respiratória inferior provocando

síndromes de dificuldade respiratória aguda. Inicialmente, o SARS-CoV-2 causador da pandemia da COVID-19, descoberto na cidade de Wuhan, foi designado como 2019-nCoV e posteriormente foi nomeado pelo ICTV como SARS-CoV-2 devido às suas relações taxonômicas e genômicas altamente homólogas ao SARS-CoV (GORBALENYA et al., 2020; YIN, 2020).

Os Betacoronavirus, como todos os outros membros da família *Coronaviridae* apresentam-se envelopados, pleomórficos, sensivelmente arredondados, com aproximadamente 100nm a 160nm de diâmetro (CUI; LI; SHI, 2019). A estrutura genômica em geral de todos eles são semelhantes, sendo constituídos de RNA de fita simples de sentido positivo com aproximadamente 30.000 nucleotídeos, que é o maior genoma para um vírus de RNA e codificam quatro a seis proteínas estruturais, dependendo da espécie viral (LLANES et al., 2020) (FIGURA 1).

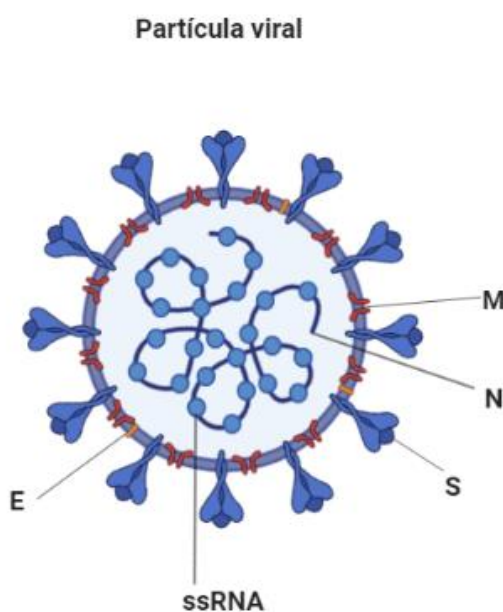


FIGURA 1: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PARTÍCULA VIRAL DOS MEMBROS DA FAMÍLIA CORONAVIRIDAE.

Os coronavírus formam partículas esféricas, pleomórficas e envelopadas com aspecto sugestivo de “coroa” de aproximadamente 100-160 nm de diâmetro, contendo um genoma de RNA de fita simples (ssRNA) de sentido positivo em torno de 30 kb de tamanho, envolvendo em média 4 proteínas estruturais M, N, S e E.

Fonte: O AUTOR (2021).

O *novo coronavírus* como ficou reconhecido popularmente, compartilha aproximadamente 79% da identidade genética com o SARS-CoV e aproximadamente 50% com o MERS - CoV (WANG et al., 2020). Como os demais membros de sua

família, o SARS CoV-2 é formado por um RNA de fita simples de sentido positivo com um genoma compreendendo em média 30.000 bases nucleotídicas, sua composição genômica seguiu as mesmas diretrizes específicas dos genes para CoV conhecidos.

2.2 ORGANIZAÇÃO GENÔMICA E REPLICAÇÃO DO SARS-CoV-2

No decorrer do seu ciclo de vida intracelular, o SARS-CoV-2 expressa e replica seu RNA genômico para reproduzir cópias completas que serão incorporadas às novas partículas virais, o genoma é dividido em diversos quadros de leitura aberta (ORF, do inglês *Open Reading Frame*), os ORFs (1a e 1b) localizados próximo a extremidade 5' UTR do RNA codifica 16 proteínas não estruturais (NSPs) que são necessárias para sua replicação e patogênese, enquanto que no terço restante referente ao terminal 3' UTR do genoma se encontram os genes que sintetizam as proteínas acessórias e proteínas estruturais, que compõe o vírion. As proteínas estruturais incluem: *Spike* (S), Envelope (E), Membrana (M) e Nucleocapsídeo (N) que são importantes para subtipagem do vírus, resposta às vacinas e no desenvolvimento de antígenos para diagnósticos sorológicos (HELMY et al., 2020; NAQVI et al., 2020; UDDIN et al., 2020) (FIGURA 2). Os genes que codificam as proteínas estruturais comuns aos CoV conhecidos, estão ordenados na seguinte ordem 5' - S – E – M – N - 3', intercalados com outros ORFs que codificam proteínas acessórias e NSPs específicas (LAI; CAVANAGH, 1997).

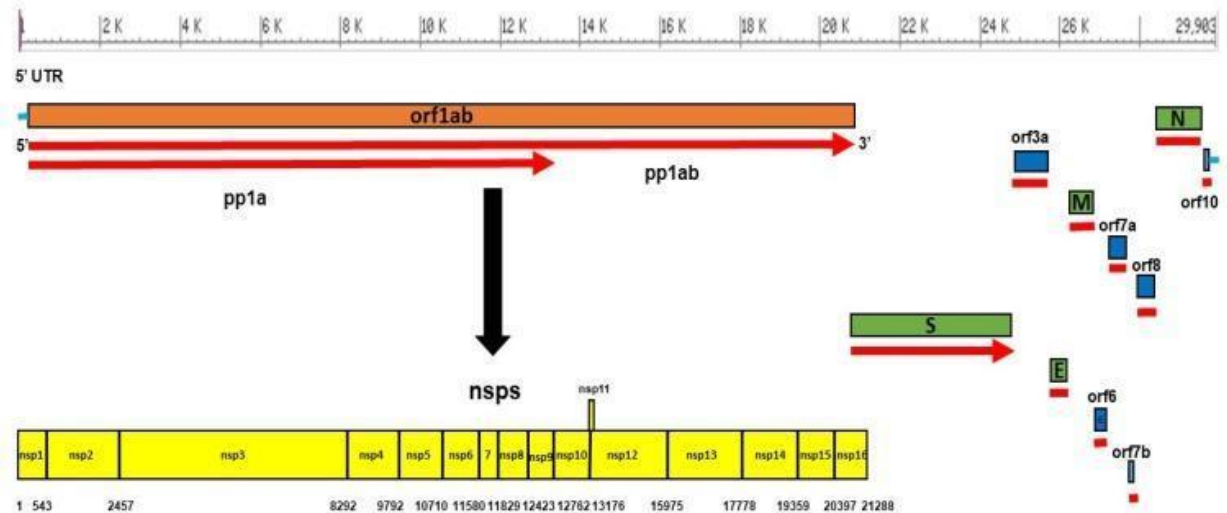


FIGURA 2: ORGANIZAÇÃO DO GENOMA SARS-CoV-2.

Os dois terços que constituem a extremidade 5' do genoma, consiste em ORFs, (1a e 1b), que codificam 16 proteínas não estruturais através dos genes pp1a e pp1ab (em amarelo). O restante do genoma, inclui quatro genes (em verde) responsáveis por codificar as proteínas estruturais: spike (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N) e seis genes acessórios (em azul) que codificam seis proteínas acessórias (orf3a, orf6, orf7a, orf7b, orf8 e orf10).

Fonte: HELMY et al., 2020.

Devido a presença de espículas no envelope, esse vírus apresenta a morfologia de uma coroa, conferindo o nome ao vírus. A glicoproteína (S) se sobressai dentre as proteínas estruturais como alvo terapêutico mais importante, em razão de ser a responsável pela ligação aos receptores celulares da célula hospedeira. Essas espículas características são essenciais para infecção da célula hospedeira, tanto pela ligação aos receptores celulares, como também pela posterior fusão da bicamada lipídica do envelope com a membrana celular do hospedeiro. A proteína S compreende duas subunidades funcionais, a subunidade S1 em qual compreende o domínio de ligação ao receptor (RBD) que estabelece especificamente a ligação da superfície ao receptor celular ECA2 (*Enzima conversora da Angiotensina 2*), facilitando a ligação viral à superfície das células, enquanto a subunidade S2 facilita a fusão viral com a membrana celular, possibilitando a entrada do vírus na célula alvo (HOFFMANN et al., 2020; UDDIN et al., 2020).

A proteína de membrana do Envelope (E), é um grupo de proteínas estruturais virais conservadas entre os *Betacoronavirus*, são relativamente pequenas e auxiliam a montagem e liberação dos vírions, sendo o seu menor constituinte. Compõe em sua

estrutura curta e integral aproximadamente 76-109 aminoácidos, variando de 8,4 a 12 kDa de tamanho (KUO; HURST; MASTERS, 2007; SCHOEMAN; FIELDING, 2019).

O componente estrutural mais abundante dos *Betacoronavirus* é a glicoproteína (M), que compreende em sua estrutura cerca de 230 aminoácidos de comprimento e é caracterizada por possuir três domínios que abrangem a membrana bicamada com três locais potenciais de N-glicosilação: um ectodomínio curto N (amino) – terminal situado fora da membrana do vírion, curtas regiões transmembrana hidrofílicas de extensão tripla e um endodomínio C (carboxi) – terminal em direção ao citoplasma da partícula viral (J ALSAADI; JONES, 2019).

A proteína (N) é uma proteína viral altamente imunogênica e abundantemente expressa no decorrer da infecção. Após infectar a célula hospedeira, a proteína N entra na célula junto com o RNA viral para facilitar sua replicação e processar a montagem e liberação da partícula viral (ZENG et al., 2020). A função primária da proteína N é a ligação ao genoma do RNA viral empacotando em uma longa estrutura de nucleocapsídeo helicoidal permitindo dessa maneira regular a síntese do RNA viral na replicação, transcrição e modulando o metabolismo das células infectadas (KANG et al., 2020). Destaca-se a aplicabilidade de a proteína N ser utilizada como uma ferramenta de diagnóstico na detecção precoce da infecção por SARS-CoV-2 em pacientes devido à sua alta imunogenicidade. Isto ocorre, em virtude, de a proteína N ser antigênica e amplamente expressa durante a infecção viral, podendo ser detectável logo no primeiro dia depois da infecção; também é um excelente alvo para ser usado como antígeno em ensaios imunológicos para verificação de anticorpos em casos de infecção leves e assintomáticas, devido à sua alta especificidade e alta afinidade de ligação (KANG et al., 2020; SHANG et al., 2005).

Como um integrante da ordem *Nidovirales*, a infecção por SARS-CoV-2 pode ser contraída de animais e outros seres humanos, como um microrganismo intracelular obrigatório o SARS-CoV-2 explora a maquinaria da célula alvo para sua própria replicação e disseminação. A comunidade científica descreveu que esse vírus pode adentrar no corpo humano através de seus receptores ECA2, que são encontrados em diferentes órgãos como: coração, pulmões, rins e trato gastrointestinal, facilitando desta maneira a entrada do vírus nas células hospedeiras (ASTUTI; YSRAFIL, 2020). O procedimento de entrada do SARS-CoV-2 na célula alvo inicia por meio da ligação da glicoproteína S ao receptor, esta ligação ocorre no RBD

da subunidade S1 que pode interagir fortemente com a ECA2 humana, enquanto a subunidade S2 medeia a fusão subsequente da membrana para permitir que o vírus entre no citoplasma do hospedeiro. Após a ligação do receptor ECA2, a proteína S é consequentemente clivada e ativada pela protease da superfície da célula hospedeira, *serina protease transmembranar 2* (TMPRSS2), a ativação da proteína S leva a modificações conformacionais permitindo a fusão da membrana, depois de fundido a membrana o SARS-CoV-2 irá liberar seu material genômico no citoplasma que será posteriormente traduzido (HARTENIAN et al., 2020) (FIGURA 3).

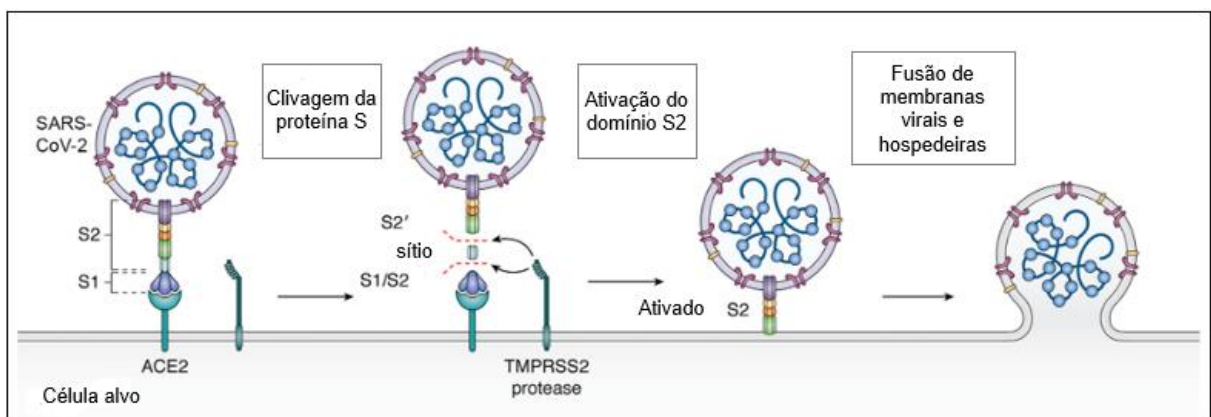


FIGURA 3: MECANISMO DE ENTRADA SARS-CoV-2.

A proteína Spike do SARS-CoV-2 interage fortemente com o receptor da célula hospedeira ECA2 e é subsequentemente clivada nas subunidades S1 e S2 através da protease TMPRSS2, permitindo a ativação do domínio S2 que posteriormente conduz a fusão da membrana viral junto à da célula hospedeira.

Fonte: Adaptado de HARTENIAN et al., 2020. Tradução o autor.

Em seguida da liberação e descapsidação do RNA viral para o citoplasma, a replicação começa a tradução do ORF1a e ORF1b em poliprotéínas pp1a e pp1ab que subsequentemente são processadas por proteases virias internas. A clivagem da poliproteína reproduz proteínas replicases maduras, que se agrupam em um complexo de replicação-transcrição que se alicia na síntese de RNA de fita negativa. São produzidos RNAs de fita negativa subgenômica de comprimento total e fitas múltiplas que servem de modelo para a geração de genomas de RNA de fita positiva, o primeiro serve de molde para novos RNAs gênicos de comprimento total e o último para a síntese dos mRNAs necessários para expressar os genes de proteínas estruturais e acessórias que residem no terminal 3' do genoma (ORTIZ-PRADO et al., 2020). A montagem dos vírions é imediatamente seguida com o acúmulo de novo RNA

gênomico e componentes estruturais, a proteína N se enovela junto com o RNA do genoma, formando estruturas helicoidais. Posteriormente a glicoproteína M que é localizada nas membranas intracelulares do compartimento intermediário interage com as outras proteínas virais (S, E e N) para autorizar a eclosão de vírions, após a montagem os vírions são transportados em vesículas e eventualmente liberados por exocitose (ORTIZ-PRADO et al., 2020).

2.3 EPIDEMIOLOGIA E SINAIS CLÍNICOS

A invasão e atividades antrópicas em florestas tropicais está entre os principais fatores que contribuem para o transbordamento zoonótico, como por exemplo, a transferência de um vírus de origem animal à uma população humana. A invasão e alteração de ecossistemas diminuem a diversidade de espécies e reduzem os ecossistemas locais, renovando os nichos ecológicos existentes nos ciclos de transmissão de doenças (RAHMAN et al., 2020).

Atividades antrópicas como comércio de animais selvagens proporciona o contato de animais, caçadores, comerciantes e consumidores. Há forte suspeita de que o SARS-CoV-2 se originou em um mercado de animais selvagens na cidade Wuhan, China, dando origem à sequência de transmissões. Portanto, a ligação epidemiológica dos casos iniciais da pandemia de COVID-19 com animais selvagens sugere a origem zoonótica do SARS-CoV-2. Após ser identificado e caracterizado foi revelado sua alta similaridade com o SARS-CoV e subsequentemente análise filogenética dos genes estruturais revelou que o SARS-CoV-2 está intimamente relacionado a CoVs isolados de morcegos-ferradura. Acredita-se que o parente mais próximo seja um *Betacoronavirus* denominado Bat-CoV-RaTG13 descoberto em 2013, que teve sua sequência genômica disponibilizada publicamente somente em março de 2020, após o início da pandemia de COVID-19 (LAI et al., 2020; ELLIS et al., 2021).

Considerando que os morcegos-ferradura são reservatórios naturais de CoVs semelhantes a SARS e normalmente requerem uma espécie intermediária antes de se adaptarem para a disseminação em humanos, o SARS-CoV-2 pode ter sido originado de morcegos, enquanto outros hospedeiros amplificadores podem ter

desempenhado uma função na transmissão da doença aos humanos, como foi notado, por exemplo, em SARS-CoV e MERS-CoV que se originaram de morcegos. Contudo, gato civet e camelos atuam como hospedeiros intermediários de SARS-CoV e MERS-CoV respectivamente (DHAMA et al., 2020).

Hospedeiros intermediários evidentemente desempenham papel crítico na transmissão de espécies cruzadas, visto que podem facilitar o aumento do contato entre um vírus e um novo hospedeiro e são capazes de permitir a adaptação adicional necessária para uma replicação eficaz no novo hospedeiro (HARAPAN et al., 2020). Foi sugerido o pangolim como uma possibilidade de hospedeiro intermediário devido à alta semelhança genética de um CoV específico com o SARS-CoV-2, isolado de animais doentes; contudo as análises filogenéticas de uma sequência específica de aminoácidos na proteína S do SARS-CoV-2 não sustentaram a hipótese de infecção diretamente do pangolin-CoV-2020 (LIU et al., 2020b).

A transmissão de pessoa para pessoa tem sido o principal veículo da infecção e propagação da pandemia. A principal via de transmissão do SARS-CoV-2 é respiratória e ocorre através do contato direto ou indireto da mucosa por intermédio de gotículas expelidas ao falar ou espirrar de pacientes infectados (GUO et al., 2020a). Além disso, o vírus é capaz de ser disseminado por meio do contato direto com superfícies contaminadas, uma vez que consegue permanecer viável por horas em condições atmosféricas favoráveis (SINGHAL, 2020). Contudo, evidências crescentes indicam que o vírus infeccioso pode ser encontrado em aerossóis e em amostras de ar exalado. Em certas circunstâncias incluindo durante procedimentos de geração de aerossol ou em ambientes internos ausente de ventilação, o vírus pode ser transmitido à distância por meio de micro gotículas de aerossóis (MEYEROWITZ et al., 2020).

Seres humanos de todas as idades são suscetíveis a infecção pelo SARS-CoV-2 e pode haver uma variedade de sintomas que um paciente com COVID-19 pode apresentar; o paciente infectado pode ser classificado como assintomático ou sintomático, portador ou infeccioso, de pródromo leve a excessivamente sintomático, conforme o estado de sua imunidade. No entanto, homens mais velhos acima de 60 anos de idade com comorbidades como resultados de função imunológica mais fraca são mais propensos a desenvolver doenças respiratórias graves que requerem hospitalização (SINGH et al., 2020; HU et al., 2020). As manifestações clínicas da infecção por SARS-CoV-2 incluem no início da doença, febre, tosse seca, dispneia e

mialgia. Dentre os sintomas, a febre é a mais relatada, os sintomas menos comuns incluem: dor de cabeça, tontura, dor abdominal, diarreia, náuseas e vômito e alteração do olfato e paladar (JIANG et al., 2020).

2.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico clínico para a infecções por coronavírus humanos, especialmente o SARS-CoV-2, é extremamente difícil em consequência da similaridade dos sintomas clínicos provocados por outras doenças respiratórias de origem viral. Para isto, a identificação do agente etiológico e a soro-vigilância de anticorpos contra o vírus é importante para o encaminhamento terapêutico e estratégias de controle e prevenção, principalmente em ambientes de maiores vulnerabilidades (LI et al., 2020). Diversas metodologias laboratoriais têm sido empregadas e desenvolvidas para o diagnóstico da COVID-19, técnicas tradicionais como detecção de anticorpos e técnicas mais sofisticadas de detecção de antígenos têm sido utilizadas para detecção viral. A detecção da infecção por SARS-CoV-2 pode ser realizada através de dois métodos complementares: (1) detecção do RNA viral por RT-PCR ou antígenos virais em amostras do trato respiratório superior ou (2) detecção da resposta imune ao vírus, investigando de preferência as respostas de anticorpos IgM e/ ou IgG (CARTER et al., 2020; RAI et al., 2021) (FIGURA 4).

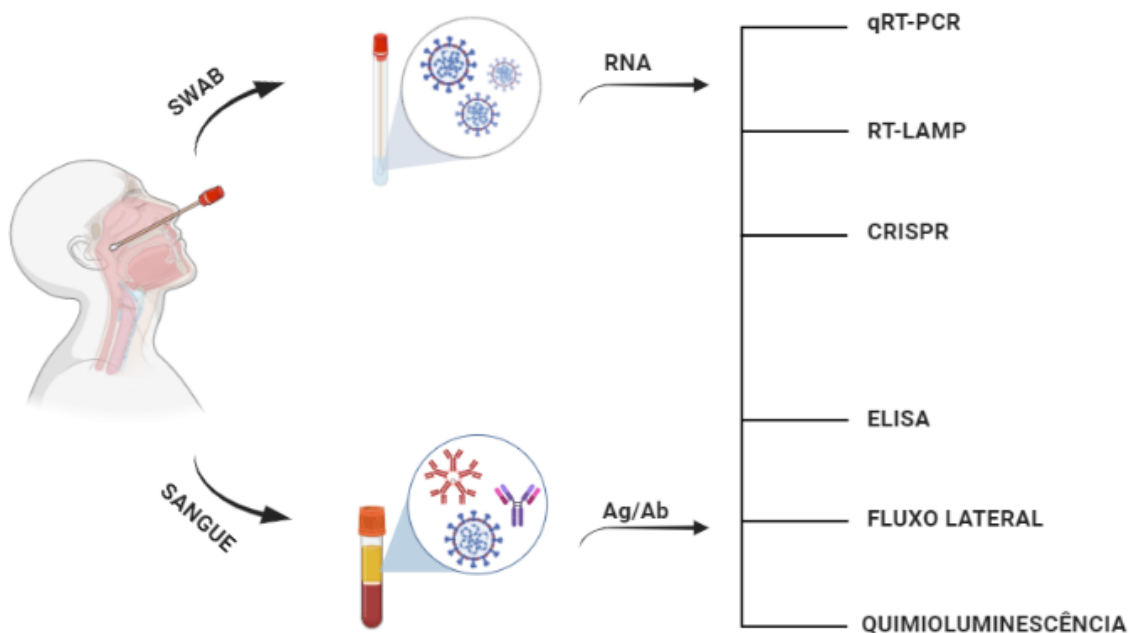


FIGURA 4: REPRESENTAÇÃO EQUEMÁTICA DOS MÉTODOS DISPONÍVEIS PARA DETECÇÃO DE SARS-CoV-2.

O diagnóstico laboratorial para infecções do SARS-CoV-2 pode ser realizado por dois métodos complementares: detecção do RNA viral ou antígenos virais em amostras do trato respiratório superior, as formas existentes para este formato incluem: qRT-PCR, RT-LAMP e CRISPR e testes rápidos para pesquisa de antígenos; ou a detecção da resposta imune ao vírus, investigando de preferência as respostas de anticorpos IgM e/ ou IgG, as formas existentes para este formato incluem: ELISA, IMUNOCROMATOGRAFIA DE FLUXO LATERAL e QUIMIOLUMINESCÊNCIA.

Fonte: O AUTOR (2021).

Durante a fase aguda da infecção não é recomendado o uso de diagnósticos sorológicos, nesta fase os métodos apresentam menor sensibilidade devido ao tempo necessário para induzir a resposta imunológica. Consequentemente, após a primeira publicação da sequência genômica do SARS-CoV-2 em janeiro de 2020, grande variedade de testes de diagnósticos moleculares foi desenvolvido para detectar o genoma viral (ELLIS et al., 2021).

Por consequência a OMS definiu como o padrão ouro de detecção do SARS-CoV-2, o ensaio Reação em Cadeia da Polimerase após Transcrição Reversa (qRT-PCR), que detecta o RNA viral. O qRT-PCR possibilita a detecção e a caracterização genética do vírus garantindo alta sensibilidade para o diagnóstico da infecção aguda por SARS-CoV-2, em arranjo com a técnica de sequenciamento de DNA a qRT-PCR

oferece um nível de especificidade maior que os diagnósticos imunológicos durante a fase aguda da doença determinando a detecção e genotipagem viral (JAYAMOHAN et al., 2020). De acordo com uma revisão de 112 ensaios de detecção molecular disponíveis atualmente realizada por Carter et al., (2020), 90% dos ensaios disponíveis utilizam tecnologia baseada em PCR ou qRT-PCR, 6% utilizam tecnologias de amplificação isotérmica (RT-LAMP), 2% são baseados em tecnologias de hibridização e 2% utilizam tecnologias com base em CRISPR.

Ainda que a detecção viral baseada em qRT-PCR tenha sido amplamente usada no diagnóstico da COVID-19, ela não pode ser utilizada para monitorar o progresso dos estágios da doença e não pode ser aplicada a uma abrangente identificação da infecção de precedentes anteriores, uma vez que o RNA viral não permanece sempre detectável e pode não ser mais identificado. Desta forma, a detecção de anticorpos contra um vírus em indivíduos que já foram infectados através de diagnósticos sorológicos, torna-se extremamente importante na vigilância epidemiológica da doença (RAI et al., 2021).

Os desafios mencionados garantem o desenvolvimento de testes simples com base na detecção de anticorpos humanos gerados em resposta à infecção viral, diagnósticos sorológicos, como por exemplo, ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) são capazes de monitorar a resposta do hospedeiro detectando a presença de anticorpos (IgM e/ ou IgG) em amostras de plasma e/ ou soro humano, capazes de reconhecer antígenos do SARS-CoV-2. Os testes imunológicos, são importantes ferramentas na identificação de indivíduos que já foram infectados com o SARS-CoV-2, como também avaliar a eficácia das vacinas em andamento fornecendo uma avaliação das trajetórias de resposta de anticorpos de curto prazo (dias e semanas) e de longo prazo (anos ou permanência), como também a abundância e diversidade de anticorpos. Além disso, a detecção de anticorpos humanos permite rastrear pessoas infectadas, mesmo aquelas que não apresentaram sintomas, ou seja, casos assintomáticos da doença (CHENG et al., 2020; SETHURAMAN; JEREMIAH; RYO, 2020).

Os imunoenaios do tipo ELISA apresentam um alto nível de sensibilidade e especificidade em contraste, com os ensaios baseados em RNA viral, o requisito de qualidade de amostra é menos rigoroso. Outro fator importante, com a microplaca padrão de 96 poços e dispositivos automatizados para ensaios ELISA a capacidade

de teste é exponencialmente aumentada em relação aos testes moleculares de RNA e com um tempo de resposta superior (2-3 horas) (XIAO; WU; LIU, 2020).

A determinação da exposição ao SARS-CoV-2 depende extensivamente da detecção de anticorpos IgM e/ ou IgG, que normalmente são específicos para os antígenos virais imunogênicos. Os antígenos mais comuns para uso em diagnósticos sorológicos são as proteínas estruturais N e proteína S (subunidades S1, S2 E RBD). A proteína N é a mais abundante e pode ser facilmente expressa em células de *E.coli*. Em contrapartida, a subunidade S1 é utilizada para a ligação ao receptor através do RBD, que é provavelmente um alvo primário para anticorpos neutralizantes e a proteína S é fortemente glicosilada, sendo tradicionalmente expressa em células de eucariotos (FØNS; KROGFELT, 2020).

Anticorpos da classe IgM são indicadores de infecção aguda enquanto níveis mais elevados de IgG são observados durante a segunda semana de infecção ou estágios finais ou pós recuperação. A cinética geral da resposta dos anticorpos contra SARS-CoV-2 é análoga àquela para SARS-CoV, que são caracterizadas por soroconversão robusta (IgM e IgG) 5 a 14 dias após o início dos sintomas e concentrações constantes por semanas e até meses após a infecção e eliminação viral (POLAND; OVSYANNIKOVA; KENNEDY, 2020). As tecnologias para essas indicações incluem o ELISA, ensaio de fluxo lateral imunocromatográfico, bioensaio de neutralização e quimiossensores específicos (CARTER et al., 2020).

2.4.1 ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA)

O Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), do inglês (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), é atualmente um dos ensaios imunológicos mais amplamente comercializado. Foi descrito originalmente por Engvall e Perlmann (1971) e é considerado o padrão ouro dos ensaios imunológicos nos dias de hoje. Este método de diagnóstico é baseado no conceito de reações entre antígeno e anticorpo, representando a interação através dos anticorpos produzidos pelas células B ao patógeno invasor (antígeno). Esta resposta imunológica específica desempenha um papel importante na proteção do corpo contra invasores, dessa forma, ao investigar essa reação, o ensaio ELISA proporciona uma análise quantitativa e qualitativa que é

altamente sensível e específica aos antígenos, que incluem: proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos, entre outros (SAKAMOTO et al., 2018).

Os ensaios ELISA geralmente são realizados em microplaca de superfície inerte de poliestireno de 96 poços, este formato permite que várias amostras sorológicas sejam medidas em um único experimento. Um protocolo ELISA de forma simplificada consiste em: (1) a adsorção de um antígeno e/ ou anticorpo a uma base sólida; (2) adição da amostra a ser investigada; (3) subsequente incubação do complexo de reação e separação dos reagentes não ligados por lavagem; (4) adição do anticorpo com marcador enzimático e substrato para o desenvolvimento da cor; e (5) a leitura visual ou espectrofotométrica dos resultados do ensaio (CERDA-KIPPER; MONTIEL; HOSSEINI, 2019).

O ELISA agrega a especificidade da ligação antígeno-anticorpo com a sensibilidade de uma reação enzimática, proporcionando a detecção de quantidades amostrais com alta confiabilidade. Sendo aplicado em diversas áreas, incluindo: indústria de alimentos, diagnóstico, toxicologia e monitoramento e drogas. No domínio do diagnóstico, a técnica tem mostrados grande capacidade de aplicações em escala global na detecção de diferentes tipos de doenças em humanos e animais. Inúmeros kits comerciais de ELISA são desenvolvidos e comercializados para detecção de HIV, Influenza, Dengue, Ebola, doença de Chagas, entre outros (CERDA-KIPPER; MONTIEL; HOSSEINI, 2019).

O formato mais usado é o ELISA Indireto, esta abordagem é normalmente usada para quantificação de anticorpos ou determinação de títulos. Basicamente, o antígeno que será utilizado vai ser revestido na fase sólida da microplaca, seguida pela incubação do anticorpo primário. Os complexos antígeno-anticorpo formados são subsequentemente detectados pela adição do anticorpo secundário com marcador enzimático, que se liga especificamente ao anticorpo primário. Assim que o substrato enzimático cromogênico for adicionado aos poços da microplaca, os níveis de cor serão então desenvolvidos dependendo da quantidade de complexo antígeno-anticorpo formado. A intensidade das cores desenvolvidas serão proporcionais à concentração dos anticorpos na amostra. A absorbância da cor final pode ser medida por um leitor de microplacas ELISA em um comprimento de onda apropriado, e a concentração ou os resultados contendo o analito investigado pode ser interpolado a partir da curva padrão com base nos valores obtidos da leitura da absorbância

(CROWTHER, 2009) (FIGURA 5). Este processo pode ser realizado usando um software de computador operacional de leitor de ELISA, comumente utilizado o Graphpad Prism® para gerar curvas padrão típicas, que são representadas graficamente como a concentração de anticorpo versus o valor de absorbância média correspondente as replicatas.

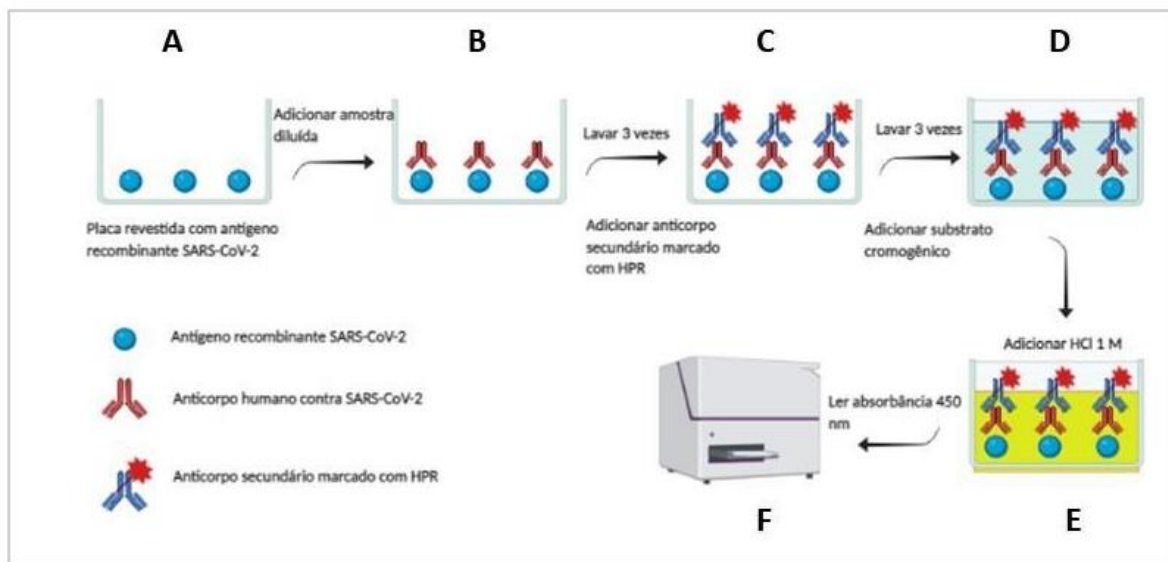


Figura 5: REPRESENTAÇÃO GERAL DO ELISA INDIRETO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA ANTÍGENO RECOMBINANTE SARS-CoV-2.

(A) Inicialmente o antígeno recombinante (em azul) é revestido à superfície dos poços, **(B)** a solução a ser investigada é adicionada, caso contenha anticorpos específicos contra aquele antígeno que foi adsorvido ocorrerá a formação do complexo antígeno-anticorpo (em azul e vermelho), **(C)** após realizar as lavagens, é adicionado o anticorpo secundário marcado com HPR que se ligará especificamente ao anticorpo primário do complexo formado da etapa anterior, **(D)** após efetuar as lavagens, o substrato enzimático cromogênico é adicionado, **(E)** se o substrato cromogênico for utilizado pela ação da reação enzimática (HPR) haverá o desenvolvimento de cor, **(F)** A intensidade da cor desenvolvida é proporcional a quantidade de anticorpo na amostra, a absorbância da cor final pode ser medida por um leitor de microplacas ELISA em um comprimento de onda apropriado (450nm).

Fonte: O AUTOR (2021).

Devido ao contexto da pandemia de COVID-19, imunoenaios ELISA têm sido amplamente utilizados em consequência de ter um menor tempo para fornecer os resultados quando comparado ao qRT-PCR e por ser mais simples em sua execução. No decorrer da pandemia foram desenvolvidos vários ensaios sorológicos comerciais e *in house* do tipo ELISA indireto para detectar a soroconversão de SARS-CoV-2, direcionados principalmente a dois alvos imunogênicos: proteína S (subunidades S1, S2 e RBD) e proteína N para a detecção de anticorpos (ALANDIJANY et al., 2020; AMANAT et al., 2020; FREEMAN et al., 2020; JÄÄSKELÄINEN et al., 2020;

KRÄHLING et al., 2021; LIN et al., 2020; LIU et al., 2020a, 2020b; PERERA et al., 2020; SAPKAL et al., 2020; TOZETTO-MENDOZA et al., 2021; ZHAO et al., 2020).

Dentre os ensaios comercialmente disponíveis, os mais utilizados que obtiveram aprovações de agências regulatórias para uso de emergência nos Estados Unidos e na União Europeia incluem: SARS-CoV IgG (Abbott, Chicago, IL, EUA), LIAISON SARS-CoV-2 S1/S2 IgG (DiaSorin, Salluggia, Itália), Elecsys, Anti-SARS-CoV-2 (Roche, Basel, Suíça) e o anti-SARS-CoV-2 ELISA (IgG; EUROIMMUN, Lübeck, Alemanha) (AINSWORTH et al., 2020). O desempenho de três desses ensaios foi analisado por Ainsworth et al., (2020) utilizando aproximadamente 1,500 controles, é importante mencionar que as amostras provenientes de pacientes com infecção por SARS-CoV-2 confirmadas em laboratório foram coletadas com no mínimo 20 dias após o início dos sintomas. A sensibilidade do ensaio Abbott foi de 92,7% e especificidade foi de 99,9%; para DiaSorin foi de 95% e especificidade de 98,7% e a sensibilidade do ensaio Roche foi de 97,2% com especificidade de 99,8%. Em conclusão, os autores ressaltaram que os ensaios Abbott, DiaSorin e Roche alcançaram a especificidade desejada e possui oportunidades de otimização da sensibilidade por meio de alterações nos limites e tempo de amostragem.

A crescente evolução no desenvolvimento de testes sorológicos ELISA no decorrer da pandemia do SARS-CoV-2 é esclarecido em razão das suas propriedades de aplicação, já que permitem, em primeiro lugar, estudar qualitativa e quantitativamente as respostas imunes contra o SARS-CoV-2, também tornam possível determinar a taxa precisa de infecção em uma área e, desta maneira, determinar a taxa precisa de mortalidade por infecção e por fim são capazes de indicar quem está imunizado e quem não está. Algumas empresas internacionais comercializam immunoensaios ELISA, apesar destes ensaios possuírem bom desempenho eles apresentam elevados preços. E países que não dispõem de uma oferta interna desses insumos e dependem exclusivamente de importações, como o Brasil, são aqueles que terão maiores dificuldades de impor testagem em massa para determinar de forma adequada a prevalência da doença na população. Desta maneira, o presente trabalho oferece como alternativa o desenvolvimento de tecnologias nacionais para produção de insumos biológicos e métodos de diagnóstico para detectar anticorpos dirigidos contra o SARS-CoV-2, agente etiológico da COVID-19.

3 JUSTIFICATIVA

Em consequência à escala global pandêmica atingida pela COVID-19, os insumos utilizados em testes de diagnósticos encontram-se em escassez em todos os países, e a elevada busca por kits diagnósticos tem elevado o preço destes insumos. No Brasil praticamente todos os insumos que estão sendo utilizados no diagnóstico da COVID-19 são importados, fazendo com que o país se torne cada vez mais dependente de tecnologias oriundas de outras nações. Como resultado, as incertezas econômicas aumentam a taxa cambial do dólar e euro ampliando os custos de testes para a população brasileira. Desta maneira, o desenvolvimento de tecnologias nacionais para suprir a dependência tecnológica brasileira é imprescindível. Sendo assim, a proposta deste trabalho foi produzir insumo biológico para desenvolver um diagnóstico imunológico ELISA Indireto para detecção de IgG contra SARS-CoV-2, a escolha deste método é esclarecida em razão de suas propriedades de aplicação, já que permitem, estudar qualitativa e quantitativamente as respostas imunes contra o SARS-CoV-2, também tornam possível determinar a taxa precisa de infecção por área e são capazes de indicar quem está imunizado e quem não está.

4 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver um Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) Indireto para detecção de IgG contra SARS-CoV-2.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expressar e purificar proteína Nucleocapsídeo do SARS-CoV-2;
- Padronizar um ensaio de Imunoabsorção enzimática ELISA Indireto utilizando proteína purificada;
- Validar o ELISA Indireto utilizando amostras positivas COVID-19 confirmadas pelo padrão ouro (qRT-PCR) e amostras negativas pré-pandêmicas;
- Avaliar a especificidade e sensibilidade do ensaio ELISA Indireto;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO VIA GENERAL BIOSYSTEMS

O plasmídeo recombinante contendo o gene sintético capaz de expressar a proteína do Nucleocapsídeo (N) de SARS-CoV-2, fusionada com uma sequência de aminoácidos contendo 6 histidinas na porção N-terminal de comprimento total (QHD43423.2), foi obtido através de uma colaboração internacional como o prof Dr. Karl Forchhammer da Universidade de Turbigen, com o qual o prof Dr. Luciano Fernandes Huergo tem um projeto em conjunto financiado pela fundação Alexander von Humboldt. O gene sintético foi construído e clonado em pET28a pela empresa General Biosystems e tem a sequência otimizada para expressão da proteína em *Escherichia coli*.

O vetor de expressão utilizado para expressar a proteína viral Nucleocapsídeo (N) foi o pET-28a (Novagen). Neste sistema, o gene de interesse é clonado atrás de um promotor reconhecido pela RNA polimerase do bacteriófago T7, permitindo rápida expressão e grande quantidade da proteína de interesse. Desta maneira, para que ocorra a expressão proteica é necessário que a bactéria usada como hospedeira produza a RNA polimerase do fago T7. Neste caso, a enzima está inserida na linhagem *E.coli* BL21 (λ DE3), que codifica para a RNA polimerase T7 sob o controle transcricional de um promotor lac. Desse modo o sistema poderá ser induzido na presença de um indutor como a lactose ou seu análogo (IPTG), após a indução ocorre a transcrição e a tradução da RNA polimerase do fago T7 que uma vez produzida passará a reconhecer promotores T7, e em sequência apenas os genes clonados serão transcritos.

5.1.1 PREPARO DE CÉLULAS TERMOCOMPETENTES

Para realizar a transformação bacteriana foram coletadas colônias isoladas de células de *E. coli* que haviam sido crescidas em placa de Petri contendo meio LA e pré-inoculadas em 5mL de meio LB, o pré-inóculo foi incubado sob agitação por aproximadamente de 16 horas a 37° C (overnight). No dia seguinte, o pré-inóculo foi transportado para um frasco *Erlenmeyer* de 1L contendo 100mL de LB e em seguida

a cultura foi incubado a 37° C até alcançar D.O₆₀₀ entre 0,3 e 0,4. A posteriori, a cultura foi transferida para tubos falcons e repousadas sob gelo por 30 minutos, o inóculo foi centrifugado a 2.000 g por 10 minutos a 4° C, após removido o sobrenadante o pellet de células foi ressuspense em 15mL de solução gelada estéril de CaCl₂ 0,1 M e mantidas no gelo por aproximadamente 30 minutos. As células ressuspendidas destinaram-se novamente a centrifugação por 2.000g durante 10 minutos a 4° C, após removido o sobrenadante o precipitado foi ressuspense em 2mL de solução gelada de CaCl₂ 0,1 M + 15% glicerol (v/v). Posteriormente, foram aliqotadas frações de 200µL e armazenadas a -80° C.

5.1.2 TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO

As alíquotas de células foram retiradas do freezer -80° C e mantidas sob gelo por 30 minutos. Foram adicionados 2µL do DNA plasmidial que expressa a proteína N prosseguindo no gelo por 30 minutos. A mistura foi submetida a choque térmico em um banho maria por 2 minutos a 42° C. Terminado, as células foram imediatamente ressuspendidas em 1mL de meio LB e recuperadas a 37° C por 40 minutos. Prontamente, estas células foram plaqueadas em meio LA incluindo antibióticos necessários.

5.1.3 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE N DO SARS-COV-2 EM *E.COLI* BL21 (λDE3)

A expressão da proteína N foi efetuada em células de *E.coli* BL21 (λDE3) abrangendo o plasmídeo recombinante pLHSarsCoV2-N. Aproximadamente 5 colônias de *E.coli* dispondo o vetor de expressão de interesse foram pré-inoculadas em 10mL de meio LB incluindo Canamicina 50 µg/ml e incubado sob agitação a 37° C. Após de 16 horas de crescimento o pré-inóculo foi transferido para o cultivo em larga escala em frasco Erlenmeyer autoclavado contendo 100mL de LB mais antibiótico, a cultura foi inoculada e mantida incubada sob agitação a 37° C, as células se preservaram em desenvolvimento pelo tempo necessário com intenção de que a D.O₆₀₀ se encontrasse por volta de 0,3 e 0,4. Após atingido esse tempo, a temperatura foi reduzida para 16°C durante 30 minutos, concluído o tempo de adaptação foi adicionado o indutor IPTG a uma concentração final de 0,5 mM. A cultura permaneceu

incubada por 16 horas sob agitação a 16°C (overnight), no dia seguinte o cultivo celular foi centrifugado a 3.800 g por 5 minutos, logo em seguida o sobrenadante foi descartado e as células foram imediatamente armazenadas a -20° C até o momento da purificação. Com finalidade de verificar a comprovação da expressão proteica, pouco antes da etapa de centrifugação foram alíquotadas frações para realizar eletroforese em gel de poliacrilamida sob condição desnaturante (SDS- PAGE).

5.2 LISE CELULAR E PURIFICAÇÃO PROTÉICA

O sedimento celular contendo o plasmídeo recombinante pLHSarsCoV2-N superexpresso foi lisado e purificado conforme descrito por Huergo (2006), por cromatografia de afinidade em uma coluna 5mL Hi-Trap-Chelating-Ni²⁺ (GE Healthcare). O sedimento celular correspondente a 100mL de cultivo foi ressuspensionado em 10mL de tampão de sonicação (50mM Tris-HCl pH8; 100mM KCl; 10mM Imidazol). Posteriormente, as células foram lisadas por sonicação em banho de gelo com um ciclo de 8 minutos, pulso de 15 segundos e repouso de 15 segundos a uma amplitude de 35%. Após realizado a lise celular o extrato foi centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos e a fração solúvel foi recuperada. Em seguida, a coluna Hi-Trap 5mL foi carregada com NiCl₂ de acordo com a recomendação do fabricante, e equilibrada com 5ml do tampão de sonicação. A seguir, foi adicionado o extrato ausente de células e a coluna foi lavada com 20mL do tampão 1 (50mM Tris-HCl pH8; 100mM KCl; 10mM Imidazol). A eluição da proteína N foi executada em um gradiente crescente de Imidazol. Foi adicionado 10 mL do tampão 2 (50mM Tris-HCl pH8; 100mM KCl; 50mM Imidazol), 10 mL do tampão 3 (50mM Tris-HCl pH8; 100mM KCl; 100mM Imidazol), 10 mL do tampão 4 (50mM Tris-HCl pH8; 100mM KCl; 300mM Imidazol) e por fim 10 mL do tampão 5 (50mM Tris-HCl pH8; 100mM KCl; 500mM Imidazol). Foram coletadas alíquotas de 2mL, e 20µL correspondendo a cada fração foi imediatamente submetida a análise de eletroforese (SDS-PAGE), as frações com maiores concentrações foram agrupadas e estocadas a 20° C.

5.2.1 DOSAGEM DE PROTEÍNA

As proteínas purificadas foram quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando o Reagente de Bradford (Sigma). As reações foram conduzidas em microplacas de poliestireno 96 poços (OLEN), sendo utilizados 10 µL de amostra e 150 µL de reagente. A curva padrão, foi construída utilizando albumina bovina (BSA) em concentrações de 0,625 a 10 µg/mL. A leitura da absorbância foi realizada em um leitor de placas TECAN em largura de banda de 9 nm e 25 flashes, em 600 nm.

5.2.2 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA SOB CONDIÇÃO DESNATURANTE (SDS-PAGE)

As análises eletroforéticas de proteínas realizadas em gel de poliacrilamida sob condição desnaturante foram efetuadas conforme descrito por LAEMMLI (1970), (30 g/L Tris-base; 140 g/L glicina; 10 g/L SDS) utilizando o sistema (BioRad). As amostras, antes de serem analisadas por SDS-PAGE, foram misturadas com tampão de amostra (2% SDS (m/v); 10% glicerol (v/v); 0,01% azul de bromofenol (v/v); 0,0625 M Tris-HCl pH 6,8) adicionando 5% de βmercaptoetanol (v/v) na hora do uso e aquecidas a 95°C por 5 minutos. As eletroforeses foram conduzidas a 180-200V em tampão de corrida 1X por aproximadamente 40-50 minutos, posteriormente o gel foi corado com solução de azul de Coomassie e em seguida descorado com solução descorante. A concentração de acrilamida/bis-acrilamida no gel de separação variou de acordo com o tamanho da massa molecular das proteínas que estavam sendo analisadas. As eletroforeses foram realizadas em sistema vertical seguindo recomendação do fabricante (Biorad). As soluções foram acrescentadas e homogeneizadas de acordo com a sequência e quantidades indicadas em cada tabela. Para os géis de separação e empilhamento foram utilizados os componentes indicados nas TABELA 1 e TABELA 2 respectivamente.

TABELA 1: COMPOSIÇÃO DO GEL DE SEPARAÇÃO PARA ANÁLISE DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA SOB CONDIÇÃO DESNATURANTE (SDS-PAGE)

Componentes	Concentração Acrilamida							
	7,5% 1 gel	7,5% 2 géis	10% 1 gel	10% 2 géis	12,5% 1 gel	12,5% 2 géis	15% 1 gel	15% 2 géis
H ₂ O	2,5mL	5mL	2,13mL	4,25mL	1,7mL	3,4mL	1,25mL	2,5mL
Solução 2	1,25mL	2,5mL	1,25mL	2,5mL	1,25mL	2,5mL	1,25mL	2,5mL
Acrilamida 30%	1,25mL	2,5mL	1,63mL	3,25mL	2,05mL	4,1mL	2,5mL	5mL
10% PA	50µL	100µL	50µL	100µL	50µL	100µL	50µL	100µL
TEMED	5µL	10µL	5µL	10µL	5µL	10µL	5µL	10µL

PA: persulfato de amônio e TEMED: N,N,N',N'- Tetrametiletilenodiamina. A Solução 2 é formada por 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 e 0,3% SDS (m/v).

TABELA 2: COMPOSIÇÃO DO GEL DE EMPILHAMENTO PARA ANÁLISE DE ELETROFORESE (SDS-PAGE)

Componentes	1 gel	2 géis
H ₂ O	1,5mL	3,0mL
Solução 3	0,625mL	1,25mL
Acrilamida 30%	0,375mL	0,75mL
10% PA	25µL	50µL
TEMED	2,5µL	5µL

Solução 3 é formada por 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 e 0,4% SDS (m/v).

5.3 AMOSTRAS HUMANAS

Parte das amostras utilizadas na validação deste estudo foram coletadas e fornecidas pelo Hospital de Clínicas (CHC / UFPR) e Hospital Erasto Gaertner (HEG) em Curitiba. As amostras para análise sorológica continham soro e plasma (sangue colhido com EDTA). Os casos positivos para COVID-19 foram confirmados pela detecção de RNA do SARS-CoV-2 por qRT-PCR a partir de *swabs* nasofaringe. O momento da amostragem do soro variou de 1 a 70 dias após o início dos sintomas. A coorte de 210 controles negativos consistia em amostras pré-pandêmicas coletadas

em 2018 pela professora Dr, Fabiane G. Rego. O Comitê de Ética em Pesquisa do CHC / UFPR (n # 30578620.7.0000.0008) e CEP / HEG (n # 31592620.4.1001.0098) aprovou este estudo.

5.4 ELISA INDIRETO

Para o ensaio de ELISA indireto foram utilizadas microplacas de poliestireno de fundo chato de 96 poços (OLEN). A sensibilização das placas foi realizada dispendo como antígeno a proteína purificada nucleocapsídeo (N) de SARS-CoV-2. A proteína purificada foi diluída para uma concentração 2 ng/μL em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8), KCl 100 mM e 10% (v/v) de glicerol, 100μL da diluição foram adicionados a cada poço da placa e armazenada a 4°C (overnight) para adsorção. No dia seguinte, o excesso de proteína não ligado foi removido e os poços das placas foram lavados duas vezes com 200μL de tampão TBST 1x (Tris 2,42 g/L, NaCl 8 g/L e Tween 80 0,1% v/v) (pH 7,6), após efetuado as lavagens, os poços das placas foram bloqueados com 200μL de uma solução contendo leite Molico desnatado a 3% (p/v) diluído em TBST 1x a 4°C (overnight), para prevenir a fixação inespecífica de proteínas no anti-soro.

No dia seguinte, os soros foram diluídos na concentração de 1/1000 em TBST 1x incluindo leite desnatado a 1% (p/v) e posteriormente 100μL de cada diluição foram carregados em seus respectivos poços da placa de ELISA prosseguindo de incubação por 1 hora, em seguida os poços foram lavados três vezes com 200 μL de TBST 1x e posteriormente foi realizada a incubação do anticorpo secundário por 1 hora, adicionando 100 μL a cada poço o conjugado IgG-HPR anti-humano de cabra (Thermo Scientific) diluído a 1: 3000 em TBST 1x, as incubações foram realizadas em temperatura ambiente. Em seguida foram realizadas três lavagens com 200 μL de TBST 1x, para a remoção dos anticorpos que não reagiram com o anticorpo primário.

Para finalizar, foram adicionados 100μL do substrato cromogênio 3,3', 5,5' - tetrametilbenzidina (TMB) a cada poço, e incubado por 10 minutos em temperatura ambiente. A seguir a reação foi interrompida adicionando 100μL de HCl 1M e foram realizadas as leituras das densidades ópticas das amostras a 450 nm utilizando um leitor de placas TECAN em largura de banda de 9 nm e 25 flashes. Com o objetivo de verificar prováveis ligações inespecíficas do anticorpo secundário com o antígeno

adsorvido à placa, foi preparado um controle em “branco” sem a adição de uma amostra sorológica. Todas as amostras a serem investigadas foram analisadas em duplicata, e os valores correspondentes a absorvância de cada soro em todos os experimentos concluídos foi a média aritmética dos valores obtidos da duplicata de cada amostra.

5.5 ANÁLISE DE DADOS

Um soro positivo para COVID-19 confirmado por qRT-PCR foi usado como controle positivo de referência ao longo da validação deste estudo. Todos os dados foram expressos como % deste controle positivo antes da aplicação da Curva característica de Operação do Receptor, do inglês *Receiver Operating Characteristic Curve* (ROC curve). O valor de corte do ensaio foi determinado expressando os valores obtidos da OD450nm como porcentagem (%) do soro COVID-19 positivo (média OD amostra*100/média OD controle positivo), o software utilizado foi o GraphPad Prism 7.0. As análises estatísticas foram realizadas usando o teste T. Este procedimento otimiza a interpretação dos resultados do ELISA quando existem populações positivas e negativas bem definidas disponíveis para análise, a curva ROC é um gráfico da sensibilidade em comparação a especificidade para um sistema classificador binário, usando vários valores de corte, permitindo que o valor de corte que fornece o melhor equilíbrio entre sensibilidade e especificidade seja selecionado para o teste que está sendo considerado (GÓMEZ-MORALES et al., 2008). A variabilidade inter-ensaio foi analisada calculando o coeficiente de variação (CV%) de um soro positivo COVID-19 utilizado como referência ao longo do estudo, em 12 diferentes sessões de trabalho. A variação intra-ensaio foi medida calculando a média do CV% obtido da duplicata de 96 amostras em 12 placas.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA N DO SARS-COV-2

A proteína do nucleocapsídeo é um dos principais alvos imunogênicos para a detecção de anticorpos contra o SARS-CoV-2 em ensaios sorológicos, devido à sua capacidade de desencadear uma resposta imunológica dominante e de longa duração e por ser abundantemente expressa durante a infecção, além de ser consistentemente empregada para detectar anticorpos contra outros coronavírus humanos e de animais (RUMP et al., 2021). Neste estudo, o plasmídeo recombinante contendo a sequência para expressão da proteína N (pLHSarsCoV2-N) foi transformado em células de *E. coli* BL21 (λ DE3) e as colônias transformadas foram cultivadas em 100mL de meio LB e a expressão da proteína induzida com IPTG durante a noite. As células foram coletadas, lisadas e as frações solúvel e insolúvel do extrato celular foram analisadas em géis SDS-PAGE-12%. A proteína N foi superexpressa e não apresentou problemas quanto à solubilidade e obteve o tamanho esperado conforme indicado em outras literaturas, de aproximadamente 46kDa (GUO et al., 2020b; TOZETTO-MENDOZA et al., 2021; ZENG et al., 2020) (FIGURA 6).

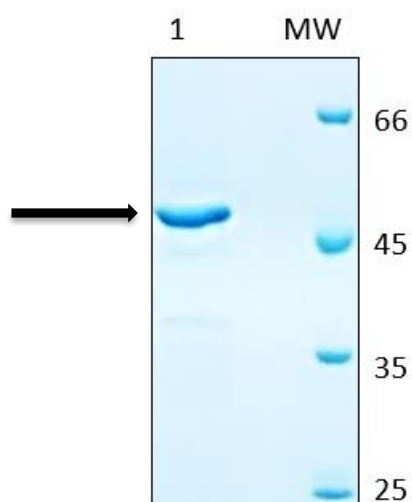


FIGURA 6: PERFIL ELETROFORÉTICO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA N-SARS-COV-2 EM *E.coli* BL21.

Linha 1. Extrato celular induzido por IPTG em *E. coli* BL21 contendo o plasmídeo pLHSarsCoV2-N que expressa a proteína N com aproximadamente 46kDa. MW padrão de massa molecular em kDa. Análise por SDS-PAGE (10%) e coloração com Coomassie Blue.

A fração solúvel foi aplicada em cromatografia de afinidade em uma coluna Hi-Trap-Chelating-Ni²⁺ (GE Healthcare). A eluição foi realizada em um gradiente crescente de imidazol (50, 100, 300 e 500mM). A proteína N foi eluída em quase todas as frações sendo o pico de eluição obtido com 300mM de imidazol (FIGURA 7). As frações contendo as maiores concentrações de proteína purificada foram separadas e armazenadas. O rendimento foi de aproximadamente 8 mg por 100mL de cultura.

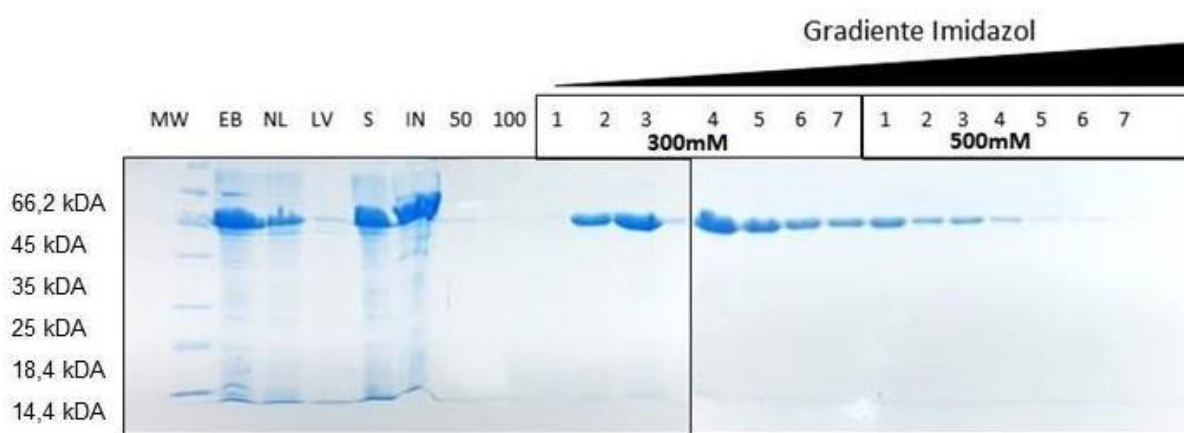


FIGURA 7: PERFIL ELETROFORÉTICO DAS FRAÇÕES OBTIDAS DURANTE A PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA N-SARS-CoV-2.

A purificação do extrato celular induzido por IPTG em *E. coli* BL21 contendo o plasmídeo pLHSarsCoV2-N foi realizada injetando o extrato induzido solúvel (**EB**) em coluna Hi-Trap-Chelating de 5 mL obtendo alíquotas de 2mL. As proteínas que não ligaram na coluna estão mostradas na fração não ligada (**NL**). Fração de lavagem (não ligada à coluna) (**LV**). (**S**) é a fração solúvel (sobrenadante). (**IN**) é fração insolúvel (precipitado). As proteínas ligadas foram eluídas em um gradiente crescente de imidazol (**50, 100, 300 e 500mM**). As frações contendo as maiores concentrações de proteína purificada foram separadas e armazenadas. Análise por SDS-PAGE (10%) e coloração com Coomassie Blue.

6.2 PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES PARA REALIZAÇÃO DE ELISA INDIRETO

Com finalidade de padronizar o ensaio de ELISA indireto a fim de investigar a presença de IgG reativo para a proteína N-SARS-CoV-2, uma placa de poliestireno de 96 poços (OLEN) foi sensibilizada com a proteína N purificada a uma concentração de 2 ng/μl em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8), KCl 100 mM e 10% (v/v) de glicerol, durante a noite. Esta placa foi utilizada para realizar uma diluição seriada de um soro obtido de um paciente controle (COVID-19) positivo confirmado por qRT-PCR e um soro controle negativo coletado antes da pandemia (2018), com o objetivo de determinar a diluição sorológica ideal para os ensaios de validação. Os soros

selecionados foram diluídos em série nas concentrações de 1/100 até 1/100.000. O soro controle positivo demonstrou forte reação com a proteína N mesmo em elevadas condições de diluições (FIGURA 8A). Por outro lado, o soro controle negativo apresentou apenas um *background* baixo de reação cruzada em baixas diluições (FIGURA 8B).

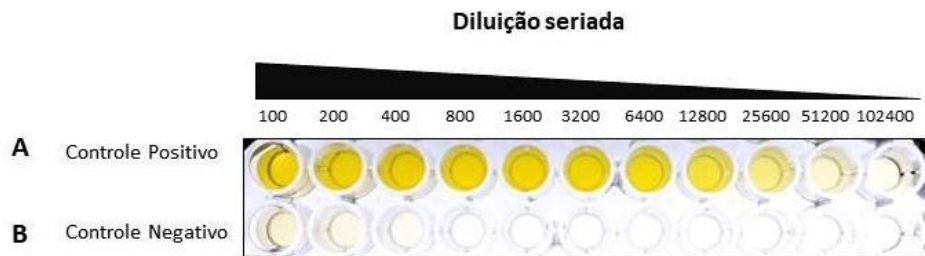


FIGURA 8: COMPARAÇÃO DO PERFIL DE DILUIÇÃO DO CONTROLE POSITIVO E CONTROLE NEGATIVO NO ELISA INDIRETO.

(A) o soro de um caso COVID-19 positivo e (B) um soro de controle negativo pré-pandêmico foram diluídos em série e analisados usando ELISA indireto, os dados foram registrados fotograficamente. O caso positivo demonstrou forte reação com a proteína N até 1/25,600 e o controle negativo apresentou apenas um *background* baixo de reação cruzada em baixas diluições.

A resposta da absorbância da densidade óptica bruta (O.D450nm) em relação ao log da diluição recíproca do controle positivo foi linear entre as diluições de 1/400 a 1/25,600 com $R^2=0,995$. As linhas tracejadas indicam o início da queda logarítmica dos picos de detecção do IgG reativo no soro do controle positivo e mostram a queda de sinal de *background* para o controle negativo, apontando a diluição ideal para ensaios, a diluição de 1/1.000 foi utilizada nos demais ensaios (FIGURA 9).

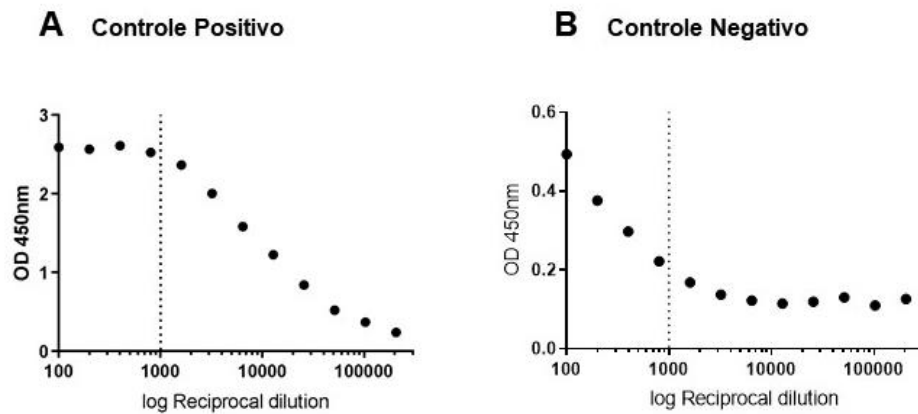


FIGURA 9: RESPOSTA DA DENSIDADE ÓPTICA BRUTA EM RELAÇÃO A DILUIÇÃO RECÍPROCA. **(A)** os dados derivado do caso COVID-19 positivo foram expressos em valores de densidade óptica (O.D450nm) e comparados com a diluição recíproca, **(B)** os dados derivado do controle negativo foram expressos em valores de densidade óptica (O.D450nm) e comparados com a diluição recíproca. As linhas tracejadas indicam o início da queda logarítmica dos picos de detecção do IgG reativo no soro positivo e no sinal de *background* no soro negativo explicando a diluição usada neste estudo (1/1000).

6.3 VARIAÇÃO INTER E INTRA-ENSAIO

De acordo com o guia de protocolos “*The ELISA Guidebook*” a evidência de que um imunoenensaio ELISA seja capaz de ser repetido é necessária para seu posterior desenvolvimento. Para alcançar este propósito é fundamental calcular a variação inter e intra-ensaio usando amostras iguais em placas diferentes e em dias diferentes. É recomendado que o teste em desenvolvimento tenha sido realizado em pelo menos 10 ocasiões separadas, apresentando um CV% igual ou inferior a 15% para os valores de OD bruta, este valor vai indicar repetibilidade adequada durante a fase de desenvolvimento do ensaio (CROWTHER, 2009).

A variabilidade inter-ensaio foi determinada calculando o coeficiente de variação (CV%) de um soro positivo COVID-19 utilizado como referência ao longo do estudo, em 12 diferentes sessões de trabalho. A variação intra-ensaio foi medida calculando a média do CV% obtido da duplicata de 96 amostras em 12 placas. O CV% inter-ensaio foi de 10,3% (mesma amostras executada em um total de 12 placas diferentes em duplicata). Contudo, cabe ressaltar que a placa (número 12) permaneceu armazenada com o antígeno revestido por 3 meses e 17 dias na geladeira (4°C a 6°C) antes de ser testada e o soro positivo utilizado como referência apresentou uma queda no valor de OD450nm (1,8 OD450) equivalente a 15% em

relação à média final calculada do soro positivo nas outras 11 sessões de trabalho (2,4 OD450) (TABELA 3). Caso fosse considerar somente as placas revestida com antígeno dentro de 3 meses de armazenamento o CV% inter-ensaio seria de 7,2%. O CV% médio intra-ensaio foi de 7,6% (CV% médio foi obtido a partir de 96 amostras em duplicata x 12 placas).

Nossos achados demonstram confiança de que o método possa ser reproduzido em ocasiões futuras, por exemplo Krähling et al., (2021) desenvolveram um ELISA indireto para detectar a soroconversão de SARS-CoV-2 direcionados contra proteína S (subunidade S1) os resultados dos valores de variabilidade foram semelhantes ao do presente estudo, os autores afirmaram que o ELISA anti-SARS-CoV-2 S1 provou ser reprodutível e preciso exibindo compatibilidade com os padrões geralmente aceitos de variabilidade intra e inter-ensaio de não mais que 15%, o ensaio desenvolvido apresentou números de variabilidade intra-ensaio de 5,3% e inter-ensaio 10,1% (CV%) dos valores de OD. Em uma outra situação nossos resultados de variabilidade superaram a validação realizada por Meyer et al., (2020) de um imunoenensaio sorológico para SARS-CoV-2 comercialmente disponível, no estudo foi avaliado a precisão de um imunoenensaio Euroimmun SARS-CoV-2 IgG, a variação inter-ensaio foi de 15,6%, segundo os autores a imprecisão inter-ensaio foi devido às limitações de corte de soropositividade do fabricante.

Uma preocupação adicional é a variação potencial de lote para lote entre os testes, o que leva à necessidade de validação repetida para cada lote usado. Conforme apresentado na TABELA 3 o ELISA indireto para detectar soroconversão de IgG SARS-CoV-2 desenvolvido neste estudo apresentou alta reprodutibilidade com placas sendo revestidas com preparações de proteínas diferentes (3 lotes). Ensaio de longo prazo são necessários para garantir dados mais concretos de estabilidade, no entanto estudos iniciais indicaram boa estabilidade em até 107 dias de armazenamento a (4°C a 6°C), apesar de ter apresentado queda no sinal bruto da OD450 essa baixa não afetou significativamente os resultados uma vez que o teste possui correção da OD em % através de um calibrador interno.

TABELA 3: CONTROLE DE ESTABILIDADE PLACAS DE ELISA INDIRETO E MÉDIA OD450 SORO POSITIVO COVID-19

Experimento	Placa	Controle (+)	Média OD450	CV%	Prepara placa	Data de Uso	Armazenagem	Lote proteína
24	1	HC053	2,59	X	13/07/2020	30/07/2020	17 dias	B1- Adrian
30	2	HC053	2,26	4,02	13/07/2020	30/07/2020	17 dias	B1- Adrian
31	3	HC053	2,27	7,82	13/07/2020	03/08/2020	21 dias	B1- Adrian
32	4	HC053	2,23	2,94	13/07/2020	04/08/2020	22 dias	B1- Adrian
33	5	HC053	2,43	6,77	13/07/2020	06/08/2020	24 dias	B1- Adrian
38	6	HC053	2,51	1,26	13/07/2020	25/08/2020	43 dias	B1- Adrian
53	7	HC053	2,37	1,87	17/09/2020	05/10/2020	18 dias	N - I 300mM
54-P1	8	HC053	2,79	6,20	17/09/2020	08/10/2020	21 dias	N - I 300mM
54-P2	9	HC053	2,68	4,40	17/09/2020	08/10/2020	21 dias	N - I 300mM
55	10	HC053	2,52	2,70	17/09/2020	15/10/2020	28 dias	N - I 300mM
57	11	HC053	2,43	1,40	10/09/2020	20/10/2020	40 dias	LB-DESALTING
72	12	HC053	1,83	1,58	10/09/2020	27/01/2021	107 dias	LB-DESALTING

Fonte: O AUTOR (2021).

6.4 VALIDAÇÃO DO ELISA INDIRETO PARA DETECÇÃO SOROLÓGICA DE IgG ANTI-SARS-COV-2

A validação do ensaio ELISA para detectar soroconversão de SARS-CoV-2 em humanos consistiu em um estudo de corte abrangendo um painel de 140 casos positivos de COVID-19 confirmados pelo método qRT-PCR e 210 controles negativos pré-pandêmicos (coletados em 2018). Os soros de controles pré-pandêmicos produziram apenas sinais de fundo que foram claramente distinguidos dos casos de COVID-19 confirmados por qRT-PCR (FIGURA 10A). O valor de corte do ensaio foi determinado expressando os valores obtidos da OD450nm como porcentagem (%) do soro COVID-19 positivo (média OD amostra*100/média OD controle positivo). Para validação do diagnóstico optamos por usar como valor de corte 12,5% (FIGURA 10B), nesta faixa o método opera com 90% de sensibilidade (IC 95%: 83,79% - 94,42%) e 98,1% de especificidade (IC 95%: 95,20% - 99,48%) conforme indicado na figura 11B. Amostras que obtiveram seus resultados superior a esse valor foram consideradas positivas. Esse valor de corte em termos de OD é equivalente a aproximadamente 0,3 e está em conformidade com outros estudos desenvolvidos utilizando o mesmo formato de detecção para soroconversão de SARS-CoV-2 em humanos (ALANDIJANY et al., 2020; KRÄHLING et al., 2021).

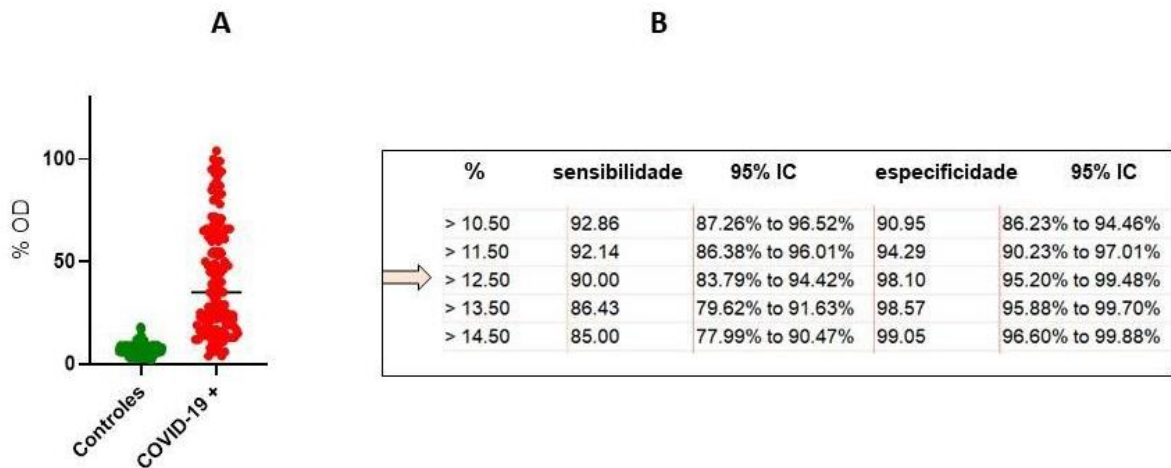


FIGURA 10: ANÁLISES CARACTERÍSTICAS DE OPERAÇÃO DO RECEPTOR (ROC).

(A) a OD450 foi expressa como % do soro COVID-19 positivo que foi utilizado como referência ao longo da validação. O estudo de coorte abrangeu 210 controles negativos pré-pandêmicos (em verde), e 133 casos de COVID-19 confirmados por qRT-PCR (em vermelho). (B) o valor de corte definido foi determinado expressando os valores obtidos da OD450 como % do soro COVID-19 positivo, o ponto de corte final foi considerado 12,5% onde o método operou com 90% de sensibilidade e 98% de especificidade.

De acordo com o valor de corte escolhido, 1,9% (4 amostras) das 210 amostras de controles negativos pré-pandêmicos reagiram falso positivamente com o antígeno N-SARS-CoV-2. A idade dos pacientes controles negativos pré-pandêmicos variou de 21 a 86 anos (com média de 62 anos). É provável que grande parcela desses indivíduos já tenha experimentado infecções anteriores com outros coronavírus humanos, entre eles, os *Alphacoronavirus* NL63, 229E, *Embecovirus* OC43, HKU1 que ocasionam doença respiratória leve recordando a um resfriado comum. Desta maneira, os dados supõem que o ELISA indireto desenvolvido manifesta reatividade cruzada desprezível para IgG gerado contra coronavírus humanos do resfriado comum. No entanto, é importante ressaltar que foram detectadas 4 amostras classificadas como falso positivo dentro as amostras pré-pandêmicas e isto poderia ser explicado por reatividade cruzada dessas amostras para IgG reativo contra coronavírus do resfriado comum.

Entre os casos de COVID-19 confirmados por qRT-PCR é importante ressaltar, 32 amostras encontravam-se em estágio inicial da infecção (≤ 10 dias após a detecção

por PCR) e isso pode explicar a baixa sensibilidade. Na verdade, se apenas as amostras coletadas ≤ 10 dias após a detecção de PCR fossem consideradas, a sensibilidade do ensaio cairia para 81%. Também vale a pena mencionar que 40 amostras da coorte positiva para COVID-19 eram de casos de COVID-19 assintomáticos / leves que são conhecidos por induzir resposta humoral inferior a infecções por SARS-CoV-2. De fato, nossa análise confirmou que o sinal de IgG foi significativamente menor em pacientes COVID-19 leves em relação a caso hospitalizados (FIGURA 11).

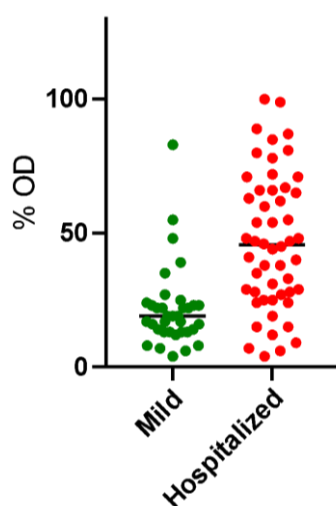


FIGURA 11: COMPARAÇÃO ENTRE OS CASOS DE COVID-19 LEVE E HOSPITALIZADOS. Comparação entre o sinal de IgG reagindo com a proteína do N - SARS-CoV-2 em casos COVID-19 confirmados por qRT-PCR leve (verde) e hospitalizado (vermelho). Os grupos foram comparados usando o teste T. valor $P < 0,0001\%$.

Considerando um cenário onde a especificidade estivesse em 99% a sensibilidade seria reduzida para 85% e o valor de corte seria definido em 14,5% (FIGURA 10B). Nestas condições os resultados de falso positivo reduziriam para 2 amostras, no entanto haveria um aumento significativo de falsos negativos (21 amostras) por esse motivo optamos em validar o ensaio no corte de 12,5%. O ensaio ELISA indireto IgG anti-SARS-CoV-2 desenvolvido operou com uma área com uma área abaixo da curva ROC (AUC) de 0,96 (FIGURA 12).

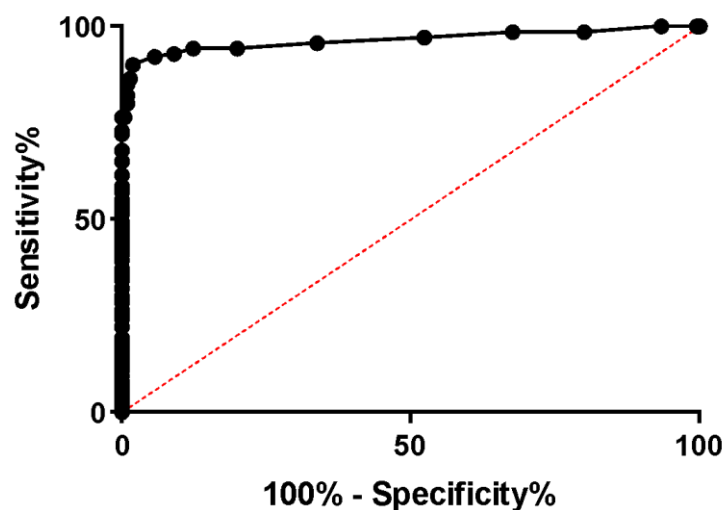


FIGURA 12: ÁREA SOB CURVA (AUC).

A curva ROC foi criada a partir dos resultados obtidos da análise de 210 controles pré-pandêmicos negativos e 140 casos COVID-19 positivos (diluídos 1: 1000) pelo ELISA indireto. A área sob a curva AUC foi de 0,96.

6.5 AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE COM ENSAIOS COMERCIAIS E INTERNOS E VALORES PREDITIVOS POSITIVO E NEGATIVO

A especificidade do ELISA indireto IgG anti-SARS-CoV-2 foi medida analisando 210 amostras de controles negativos pré-pandêmicos de soro humano, em qual 4 delas testaram como falso-positivamente, com base nesses resultados, a especificidade foi calculada em 98,1% % (IC 95%: 95,20% - 99,48%) (FIGURA 11B). A sensibilidade do ensaio foi executada através da análise de 140 amostras de pacientes COVID-19, 10% desse universo amostral (14 amostras) não reagiu suficientemente com a proteína N a ponto de o ELISA indireto detectar a soroconversão de IgG anti-SARS-CoV-2 baseado no valor de cut-off estabelecido durante a validação do ensaio, a sensibilidade do ELISA indireto IgG anti-SARS-CoV-2 foi calculada em 90% (IC 95%: 83,79% - 94,42%) correspondendo a 126 das 140 amostras positivas testadas (FIGURA 11B). O valor de corte em 90% de sensibilidade e 98,1% de especificidade apresentou concordância com outros testes imunológicos desenvolvidos em laboratórios internos para detecção de IgG anti-SARS-CoV-2, conforme mostrado no QUADRO 1.

QUADRO 1: COMPARAÇÃO ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE COM ENSAIOS INTERNOS DESCRITOS NA LITERATURA

Autores	Antígeno	Amostras	População	País	Sensibilidade %	Especificidade %
Perera R et al., 2020	RBD	51	24 (RNA+)	China	74	100
Alandijany A et al., 2020	S	418	109 (RNA+) e 109 controles (-)	Arábia Saudita	100 (IgG)	98,4 (IgG)
Sapkal G et al., 2020	SARS-CoV-2 inativado	513	131(RNA+) e 382 controles (-)	Índia	92,37 (IgG)	97,9 (IgG)
Freeman B et al.,2020	S	618	99 (RNA+), 377 controles (-) e outros	EUA	96 (IgM e IgG)	99,3 (IgM e IgG)
Krahling V et al., 2020	S1	1203	88 (RNA+) e 1115 controles (-)	Alemanha	95 (IgG)	97,8 (IgG)
Tozetto-Mendoza et al., 2020	N	408	134 (RNA+), 94 controles (-) e outros	Brasil	90,3 (IgG)	97,9 (IgG)
Zhao R et al.,2020	S1	481	69 (RNA+) e 412 controles	China	97,1 (IgG)	97,5 (IgG)
Conzentino M et al., 2021	N	343	133 (RNA+) e 210 controles (-)	Brasil	90 (IgG)	98 (IgG)
Huergo L et al., 2021	N	372	90 (RNA+) e 282 controles (-)	Brasil	95 (IgG)	99 (IgG)

Fonte: O AUTOR (2021).

O valor de corte utilizado durante a validação do ensaio ficou dentro dos critérios estabelecidos pela Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos *Food and Drug Administration* (FDA) para testes de anticorpos anti-SARS-CoV-2. Onde se diz que se um teste imunológico foi avaliado com números superiores a 30 controles COVID-19 confirmados por qRT-PCR e 75 controles pré pandêmicos e os limites mais baixos dos intervalos de confiança de 95% forem maiores do que seria mostrado nesta ocasião é considerável aceitável para testes que detectam apenas anticorpos IgG: estimativas não inferiores a 93% para especificidade e não inferior a 87% para sensibilidade.

Na situação atual, onde a prevalência é baixa na maioria dos lugares e grupos testados, a especificidade dos testes é crucial. Em uma situação exemplificada por Keller e Jenny (2020) se um teste tem especificidade de 98% mesmo que ninguém esteja infectado, o teste indicaria erroneamente 2% das pessoas testadas como positivas; já se a especificidade for de 99,9% o teste apontaria falsamente apenas 0,1% de pessoas infectadas (VOGL; LEVIATAN; SEGA, 2021).

Levando em conta essas considerações estimamos dois cenários de valor corte em um exemplo contendo uma população de 1,000 testes com prevalência de 5%. Aplicamos os valores de corte de 90% de sensibilidade e 98% de especificidade (utilizado durante a validação) e 85% de sensibilidade e 99% de especificidade (cenário com especificidade melhorada) e calculamos o número de falso positivos. O número de falso positivos no corte com 98% de especificidade foram substancialmente maiores com 19 casos, enquanto em 99% de especificidade o número foi de 9 casos. Tendo em vista que desses 1,000 testes apenas 50 são positivos, a 90% de sensibilidade o teste indicaria como falso negativos 5 casos e em 85% de sensibilidade 7,5 casos, números relativamente semelhantes. Esses resultados indicam que conforme a prevalência de COVID-19 for aumentando na população o valor de corte do ensaio desenvolvido pode ser alterado para que se obtenha acurácia melhorada e assim não forneça resultados de falso positivos e/ou falso negativos exagerados.

Embora a sensibilidade e a especificidade sejam importantes, os testes também são descritos através de seus valores preditivos positivo e negativo (PPV e NVP), conforme a FDA essas medidas são calculadas usando a sensibilidade do teste e sua especificidade utilizando uma suposição sobre a prevalência de indivíduos na população que tenha anticorpos contra SARS-CoV-2. O PPV e NVP auxiliam aqueles que estão interpretando os testes a entender a prevalência de indivíduos com anticorpos em uma população e fornece a uma pessoa que recebe um resultado positivo a probabilidade de que tenha realmente resposta humoral contra o patógeno investigado, como também a probabilidade de que uma pessoa que receba resultado do teste negativo não tenha desenvolvido anticorpos contra o patógeno (EUA Authorized Serology Test Performance, 2021).

Em agosto de 2020 cerca de 47 testes de anticorpos comerciais foram aprovados pela FDA sob a autorização de uso de emergência nos Estados Unidos, como critério de análise foi estabelecido investigar a performance de desempenho desses testes assumindo uma prevalência de 5% na população para cálculos de PPV e NPV. Desta forma, comparamos a performance do ELISA IgG anti-SARS-CoV-2 elaborado neste estudo com alguns dos principais ensaios aprovados pela agência.

Assumindo prevalência de 5% os imunoensaios comerciais DiaSorin, Abbott e Quanterix Corporation apresentaram números de PPV e NPV análogos ao do

presente estudo, utilizando valor de corte em 85% de sensibilidade e 99% de especificidade como apresentado no QUADRO 2.

QUADRO 2: COMPARAÇÃO ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE, PPV E NPV EM PREVALÊNCIA 5% COM ENSAIOS COMERCIAIS APROVADOS PELA FDA (EUA)

Desenvolvidor	Antígeno	Amostras	Sensibilidade %	Especificidade %	PPV prevalência 5%	NPV prevalência 5%
Emory Medical Laboratories	S	30 (RNA+); 638 controles (-)	100	96,4	59,3	100
EUROIMMUN	S	30 (RNA+); 80 controles (-)	90	100	100	95,5
Quanterix Corporation	S	28 (RNA+); 496 controles (-)	100	99,2	86,7	100
Kantaro Biosciences	S	235 (RNA+); 284 controles (-)	99,1	99,6	93,7	100
Roche	N	29 (RNA+); 5,272 controles (-)	100	99,8	96,5	100
Abbott	N	34 (RNA+); 100 controles (-)	100	99	84	100
DiaSorin	S	122 (RNA+); 2,473 controles (-)	91,8	99,3	86,9	99,6
ELISA UFPR-Litoral	N	140 (RNA+); 210 controles (-)	90	98,1	70	99
ELISA UFPR-Litoral	N	140 (RNA+); 210 controles (-)	85	99	82	99

Fonte: O AUTOR (2021).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de um ensaio imunológico genuinamente nacional é indispensável para o controle da COVID-19 no Brasil, como também suprir a dependência tecnológica. Em resumo, neste trabalho foi desenvolvido um ELISA indireto para detectar anticorpos IgG dirigidos contra a proteína do Nucleocapsídeo de SARS-CoV-2 em soro e/ou plasma humano, o ensaio utiliza um protocolo de baixo custo que pode ser empregado em larga escala para rastrear casos de COVID-19. O teste desenvolvido apresenta alta especificidade e sensibilidade com acurácia análoga a de kits comercialmente disponíveis registrados pela Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos *Food and Drug Administration* (FDA). O teste desenvolvido é um possível candidato para kit comercial e possibilita determinar a taxa de infecção da população. Conforme exposto por Ainsworth et al., (2020) um ensaio otimizado medindo anticorpos contra a proteína do nucleocapsídeo pode ser relevante para a vigilância da doença.

Conclusões:

1. A proteína N do SARS-CoV-2 foi purificada em um único passo com elevado rendimento (aproximadamente 8 mg por 100mL de cultura);
2. Foi desenvolvido um ensaio de Imunoabsorção Enzimática Elisa indireto utilizando a proteína do Nucleocapsídeo como antígeno para detecção de IgG anti-SARS-CoV-2, o qual apresentou sensibilidade de 90% e especificidade de 98%;
3. As placas revestidas com antígeno permaneceram estáveis por até 107 dias a 4°C;
4. O método ELISA descrito é um excelente candidato para ser produzido em escala massiva a fim de rastrear casos de COVID-19;

REFERÊNCIAS

AINSWORTH, M. et al. Performance characteristics of five immunoassays for SARS-CoV-2: a head-to-head benchmark comparison. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 12, p. 1390–1400, 1 dez. 2020.

ALANDIJANY, T. A. et al. Development and Optimization of In-house ELISA for Detection of Human IgG Antibody to SARS-CoV-2 Full Length Spike Protein. **Pathogens**, v. 9, n. 10, p. 803, 28 set. 2020.

AMANAT, F. et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. **Nature Medicine**, v. 26, n. 7, p. 1033–1036, 1 jul. 2020.

ASTUTI, I.; YSRAFIL. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**, v. 14, n. 4, p. 407–412, 1 jul. 2020.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing a principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** v.72, p. 248-254, 1976.

CARTER, L. J. et al. Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. **ACS Central Science**, v. 6, n. 5, p. 591–605, 27 maio 2020.

CERDA-KIPPER, A. S.; MONTIEL, B. E.; HOSSEINI, S. **Immunoassays | Radioimmunoassays and enzyme-linked immunosorbent assay**. 3. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

CHAN, J. F. W. et al. **Cross-species transmission and emergence of novel viruses from birds** **Current Opinion in Virology** Elsevier B.V., , 1 fev. 2015.

CHENG, M. P. et al. **Diagnostic Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2: A Narrative Review** **Annals of internal medicine** NLM (Medline), , 2 jun. 2020. Disponível em: <<https://www.acpjournals.org/doi/abs/10.7326/M20-1301>>. Acesso em: 13 jan. 2021

CONZENTINO, M. S. et al. Antigen production and development of an indirect ELISA based on the nucleocapsid protein to detect 1 human SARS-CoV-2 seroconversion 2 3. **medRxiv**, p. 2021.02.19.21252100, 23 fev. 2021.

CROWTHER, J. **The ELISA Guidebook Series Editor**. [s.l.: s.n.].

CUI, J.; LI, F.; SHI, Z. L. **Origin and evolution of pathogenic coronaviruses** **Nature Reviews Microbiology** Nature Publishing Group, , 1 mar. 2019. Disponível em: <www.nature.com/nrmicro>. Acesso em: 19 ago. 2020

DHAMA, K. et al. Coronavirus disease 2019–COVID-19. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 4, p. 1–48, 1 out. 2020.

ELLIS, P. et al. Decoding Covid-19 with the SARS-CoV-2 Genome. **Current Genetic**

Medicine Reports, p. 1–12, 9 jan. 2021a.

ENGVALL, E; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, n. 9, p. 871-874, 1971.

EUA Authorized Serology Test Performance | FDA. Disponível em: <<https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-disease-2019-covid-19-emergency-use-authorizations-medical-devices/eua-authorized-serology-test-performance>>. Acesso em: 20 fev. 2021.

FØNS, S.; KROGFELT, K. A. OUP accepted manuscript. **Pathogens and Disease**, n. January, p. 1–6, 2020.

FREEMAN, B. et al. Validation of a SARS-CoV-2 spike protein ELISA for use in contact investigations and sero-surveillance. **bioRxiv : the preprint server for biology**, 2020.

FU, L. et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in China: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Infection**, v. 80, n. 6, p. 656–665, 1 jun. 2020.

GÓMEZ-MORALES, M. et al. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of human trichinellosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 11, p. 1723-1729, 2008.

GORBALENYA, A. E. et al. **The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2** *Nature Microbiology* Nature Research, , 1 abr. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>>. Acesso em: 24 set. 2020

GUO, G. et al. **New Insights of Emerging SARS-CoV-2: Epidemiology, Etiology, Clinical Features, Clinical Treatment, and Prevention** *Frontiers in Cell and Developmental Biology* Frontiers Media S.A., , 22 maio 2020a. Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso em: 22 jan. 2021

GUO, L. et al. Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 15, p. 778–785, 28 jul. 2020b.

HARAPAN, H. et al. **Coronavirus disease 2019 (COVID-19): A literature review** *Journal of Infection and Public Health* Elsevier Ltd, , 1 maio 2020.

HARTENIAN, E. et al. **The molecular virology of coronaviruses** *Journal of Biological Chemistry* American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., , 11 set. 2020. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC7489918/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33000000/)>. Acesso em: 25 nov. 2020

HELMY, Y. A. et al. The COVID-19 Pandemic: A Comprehensive Review of Taxonomy, Genetics, Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control. **Journal of Clinical**

Medicine, v. 9, n. 4, p. 1225, 2020.

HOFFMANN, M. et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 271- 280.e8, 16 abr. 2020.

HUERGO, L. F. et al. Magnetic Bead-Based Immunoassay Allows Rapid, Inexpensive, and Quantitative Detection of Human SARS-CoV-2 Antibodies. **ACS sensors**, 2021.

HUERGO, L.F. Regulação do metabolismo do nitrogênio em *Azospirillum brasiliense*. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de ciências biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

HU, B. et al. **Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19** *Nature Reviews Microbiology* Nature Research, , 6 out. 2020. Disponível em: <www.nature.com/nrmicro>. Acesso em: 25 jan. 2021

J ALSAADI, E. A.; JONES, I. M. **Membrane binding proteins of coronaviruses** *Future Virology* Future Medicine Ltd., , 1 abr. 2019. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC7079996/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC7079996/?report=abstract)>. Acesso em: 29 out. 2020

JÄÄSKELÄINEN, A. J. et al. Evaluation of commercial and automated SARS-CoV-2 IgG and IgA ELISAs using coronavirus disease (COVID-19) patient samples. **Eurosurveillance**, v. 25, n. 18, p. 1, 7 maio 2020.

JAYAMOHAN, H. et al. **SARS-CoV-2 pandemic: a review of molecular diagnostic tools including sample collection and commercial response with associated advantages and limitations** *Analytical and Bioanalytical Chemistry* Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, , 18 out. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00216-020-02958-1>>. Acesso em: 13 jan. 2021

JIANG, F. et al. **Review of the Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)** *Journal of General Internal Medicine* Springer, , 1 maio 2020. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11606-020-05762-w>>. Acesso em: 25 jan. 2021

JIN, Y. H. et al. **A rapid advice guideline for the diagnosis and treatment of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infected pneumonia (standard version)** *Military Medical Research* BioMed Central Ltd., , 6 fev. 2020. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC7003341/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC7003341/?report=abstract)>. Acesso em: 14 set. 2020

KANG, S. et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 10, n. 7, p. 1228–1238, 1 jul. 2020.

KELLER, N.; JENNY, M. A. How to Determine When SARS-CoV-2 Antibody Testing Is or Is Not Useful for Population Screening: A Tutorial. **MDM Policy & Practice**, v. 5, n. 2, p. 238146832096306, 5 jul. 2020.

KRÄHLING, V. et al. Development and characterization of an indirect ELISA to detect SARS-CoV-2 spike protein-specific antibodies. **Journal of Immunological Methods**, v. 490, p. 112958, 1 mar. 2021.

KUO, L.; HURST, K. R.; MASTERS, P. S. Exceptional Flexibility in the Sequence Requirements for Coronavirus Small Envelope Protein Function. **Journal of Virology**, v. 81, n. 5, p. 2249–2262, 1 mar. 2007.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T7. **Nature**. v. 277, p. 680-685, 1970.

LAI, C. C. et al. **Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges** *International Journal of Antimicrobial Agents* Elsevier B.V., , 1 mar. 2020.

LAI, M. M.; CAVANAGH, D. **The molecular biology of coronaviruses**. *Advances in virus research* Elsevier, , 1997. Disponível em: </pmc/articles/PMC7130985/?report=abstract>. Acesso em: 22 jan. 2021

LI, Z. et al. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 9, p. 1518–1524, 1 set. 2020.

LIN, D. et al. Evaluations of the serological test in the diagnosis of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) infections during the COVID-19 outbreak. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 39, n. 12, p. 2271–2277, 17 dez. 2020.

LIU, L. et al. A preliminary study on serological assay for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in 238 admitted hospital patients. **Microbes and Infection**, v. 22, n. 4–5, p. 206–211, 1 maio 2020a.

LIU, P. et al. **Are pangolins the intermediate host of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2)?** *PLoS Pathogens* Public Library of Science, , 1 maio 2020b. Disponível em: </pmc/articles/PMC7224457/?report=abstract>. Acesso em: 22 jan. 2021

LIU, W. et al. Evaluation of nucleocapsid and spike protein-based enzyme-linked immunosorbent assays for detecting antibodies against SARS-CoV-2. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n. 6, 1 jun. 2020c.

LLANES, A. et al. Betacoronavirus genomes: How genomic information has been used to deal with past outbreaks and the covid-19 pandemic. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 12, p. 1–28, 1 jun. 2020.

MEYEROWITZ, E. A. et al. Transmission of SARS-CoV-2: A Review of Viral, Host, and Environmental Factors. **Annals of Internal Medicine**, 17 set. 2020.

MEYER, B. et al. Validation of a commercially available SARS-CoV-2 serological

immunoassay. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 10, p. 1386–1394, 1 out. 2020.

NAQVI, A. A. T. et al. **Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach***Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* Elsevier B.V., , 1 out. 2020.

ORTIZ-PRADO, E. et al. **Clinical, molecular, and epidemiological characterization of the SARS-CoV-2 virus and the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), a comprehensive literature review***Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* Elsevier Inc., , 1 set. 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC7260568/?report=abstract>. Acesso em: 25 nov. 2020

PERERA, R. A. P. M. et al. Serological assays for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), March 2020. **Eurosurveillance**, v. 25, n. 16, p. 1, 2020.

POLAND, G. A.; OVSYANNIKOVA, I. G.; KENNEDY, R. B. **SARS-CoV-2 immunity: review and applications to phase 3 vaccine candidates***The Lancet* Lancet Publishing Group, , 14 nov. 2020.

RAHMAN, M. T. et al. Zoonotic diseases: Etiology, impact, and control. **Microorganisms**, v. 8, n. 9, p. 1–34, 1 set. 2020.

RAI, P. et al. Detection technologies and recent developments in the diagnosis of COVID-19 infection. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1–15, 4 jan. 2021.

RUMP, A. et al. Dual ELISA using SARS-CoV-2 nucleocapsid protein produced in *E. coli* and CHO cells reveals epitope masking by N-glycosylation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 534, p. 457–460, 1 jan. 2021.

SAKAMOTO, S. et al. **Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites***Journal of Natural Medicines* Springer Tokyo, , 1 jan. 2018. Disponível em: </pmc/articles/PMC5775980/?report=abstract>. Acesso em: 22 jan. 2021

SAPKAL, G. et al. Development of indigenous IgG ELISA for the detection of anti-SARS-CoV-2 IgG. **Indian Journal of Medical Research**, v. 151, n. 5, p. 444–449, 1 maio 2020.

SCHOEMAN, D.; FIELDING, B. C. **Coronavirus envelope protein: Current knowledge***Virology Journal* BioMed Central Ltd., , 27 maio 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1182-0>. Acesso em: 29 out. 2020

SETHURAMAN, N.; JEREMIAH, S. S.; RYO, A. **Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2***JAMA - Journal of the American Medical Association* American Medical Association, , 9 jun. 2020. Disponível em: <https://jamanetwork.com/>. Acesso em: 13 jan. 2021

SHANG, B. et al. Characterization and application of monoclonal antibodies against N protein of SARS-coronavirus. **Biochemical and Biophysical Research**

Communications, v. 336, n. 1, p. 110–117, 14 out. 2005.

SINGH, A. et al. COVID-19: From bench to bed side. **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**, v. 14, n. 4, p. 277–281, 1 jul. 2020.

SINGHAL, T. **A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19)** *Indian Journal of Pediatrics* Springer, , 1 abr. 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC7090728/?report=abstract>. Acesso em: 17 ago. 2020

SPAAN, W.; CAVANAGH, D.; HORZINEK, M. C. **Coronaviruses: Structure and genome expression** *Journal of General Virology* Microbiology Society, , 1 dez. 1988. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-69-12-2939>. Acesso em: 25 fev. 2021

TOZETTO-MENDOZA, T. R. et al. Nucleoprotein-based ELISA for detection of SARS-CoV-2 IgG antibodies: Could an old assay be suitable for serodiagnosis of the new coronavirus? **Journal of Virological Methods**, v. 290, p. 114064, 1 abr. 2021.

TU, Y. F. et al. **A review of sars-cov-2 and the ongoing clinical trials** *International Journal of Molecular Sciences* MDPI AG, , 1 abr. 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC7177898/?report=abstract>. Acesso em: 19 ago. 2020

UDDIN, M. et al. **SARS-CoV-2/COVID-19: Viral genomics, epidemiology, vaccines, and therapeutic interventions** *Viruses* MDPI AG, , 1 maio 2020b. Disponível em: <https://nextstrain.org/ncov>. Acesso em: 30 set. 2020

VOGL, T.; LEVIATAN, S.; SEGAL, E. SARS-CoV-2 antibody testing for estimating COVID-19 prevalence in the population. **Cell Reports Medicine**, v. 2, n. 2, p. 100191, 16 jan. 2021.

WANG, Y. et al. **Unique epidemiological and clinical features of the emerging 2019 novel coronavirus pneumonia (COVID-19) implicate special control measures** *Journal of Medical Virology* John Wiley and Sons Inc., , 1 jun. 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC7228347/?report=abstract>. Acesso em: 14 set. 2020

WU, D. et al. **The SARS-CoV-2 outbreak: What we know** *International Journal of Infectious Diseases* Elsevier B.V., , 1 maio 2020.

XIAO, S.; WU, Y.; LIU, H. Evolving status of the 2019 novel coronavirus infection: Proposal of conventional serologic assays for disease diagnosis and infection monitoring. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 5, p. 464–467, 17 maio 2020.

YIN, C. Genotyping coronavirus SARS-CoV-2: methods and implications. **Genomics**, v. 112, n. 5, p. 3588–3596, 1 set. 2020.

ZENG, W. et al. Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 527, n. 3, p. 618–623, 30 jun. 2020.

ZENG, W. et al. Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 527, n. 3, p. 618–623,

30 jun. 2020.

ZHAO, R. et al. **Early detection of SARS-CoV-2 antibodies in COVID-19 patients as a serologic marker of infection.** [s.l: s.n.].

ZHU, N. et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, p. 727–733, 20 fev. 2020.

ZUMLA, A. et al. **Coronaviruses-drug discovery and therapeutic options** *Nature Reviews Drug Discovery* Nature Publishing Group, , 1 maio 2016. Disponível em: <www.nature.com/nrd>. Acesso em: 18 ago. 2020

ANEXO 1 – DADOS BRUTOS DE VALIDAÇÃO CASOS COVID-19

Casos positivos	média OD450	Desvio Padrão	CV%	% HC053
157-D3	0,10	0,00	1,19	4,04
44	0,11	0,00	0,94	4,50
61	0,15	0,01	6,90	5,82
111-D10	0,16	0,00	1,36	6,24
66	0,17	0,00	0,50	6,75
216	0,19	0,04	19,70	7,00
54	0,20	0,00	1,10	7,94
42	0,21	0,03	13,10	8,34
88-09/07	0,18	0,02	11,62	9,96
151	0,27	0,02	5,70	10,00
183-20/07	0,19	0,00	2,11	10,60
70	0,29	0,00	0,10	11,66
222	0,33	0,02	5,00	12,00
225	0,33	0,05	15,50	12,00
64	0,33	0,00	0,36	13,10
26	0,32	0,01	3,17	13,35
142	0,35	0,00	1,00	13,35
28	0,30	0,01	3,68	13,35
45	0,34	0,02	7,02	13,35
25	0,32	0,03	10,36	13,54
71	0,36	0,01	2,91	14,48
162-D3	0,38	0,03	7,63	14,96
163-14/07	0,28	0,02	5,67	15,11
73	0,38	0,01	3,91	15,16
80-D3	0,28	0,01	4,61	15,49
169	0,44	0,06	13,00	16,00
52	0,40	0,04	11,06	16,01
51	0,41	0,00	0,97	16,27
23	0,39	0,03	7,00	16,50
109-D3	0,30	0,03	9,69	16,61
68	0,42	0,00	0,96	16,68
10	0,40	0,01	2,06	16,73
172	0,45	0,03	5,70	17,00
63	0,47	0,00	0,14	18,51
13	0,44	0,03	6,15	18,58
22	0,44	0,04	9,04	18,70
207	0,52	0,03	5,00	19,00
642	0,43	0,07	15,35	19,04
226	0,56	0,03	6,00	21,00
49	0,54	0,04	6,58	21,55
160	0,61	0,10	15,80	22,00

229	0,58	0,06	10,40	22,00
104	0,56	0,04	6,64	22,15
93	0,56	0,02	3,91	22,33
53	0,57	0,05	8,37	22,49
67	0,57	0,02	3,57	22,59
155-D10	0,42	0,02	4,41	22,66
32	0,54	0,11	24,00	22,98
31	0,55	0,14	24,92	23,28
172-D10	0,59	0,02	2,60	23,70
241=18/06	0,43	0,02	4,96	23,73
121	0,65	0,03	5,00	24,00
94-D10	0,60	0,02	2,97	24,10
76	0,61	0,01	1,14	24,25
95-29/06	0,45	0,03	5,63	24,53
42-D5	0,62	0,01	1,44	24,58
29	0,60	0,06	10,99	25,04
98	0,64	0,03	4,24	25,24
184-D10	0,67	0,01	1,75	26,51
80	0,69	0,02	3,42	27,32
46	0,70	0,03	4,39	27,69
213	0,75	0,01	1,80	28,00
171-D10	0,71	0,00	0,57	28,32
235-dia26/08	0,70	0,02	2,37	28,83
650	0,66	0,05	7,02	29,01
96-D5	0,78	0,03	3,61	31,14
83-30/06	0,60	0,07	11,93	32,49
167-D5	0,83	0,02	2,56	32,97
48	0,88	0,11	12,03	34,83
178	0,97	0,06	6,40	35,00
54-D3	0,88	0,02	2,40	35,05
116	1,01	0,02	1,80	36,00
161-D7	0,96	0,00	0,15	38,43
186-D10	0,97	0,03	2,68	38,46
176	1,06	0,15	13,70	39,00
50	0,99	0,02	2,11	39,25
194-D10	1,01	0,04	4,01	40,09
644	0,94	0,01	1,30	41,46
125	1,21	0,18	14,70	43,00
646	0,99	0,01	0,78	43,88
143	1,18	0,11	9,20	44,00
141-D1	1,14	0,01	0,99	45,25
170-D10	1,15	0,01	0,89	45,80
93-D5	1,17	0,10	8,32	46,65
641	1,06	0,05	4,47	46,71
16	1,13	0,06	5,79	47,58
21	1,13	0,03	2,55	47,66

110-D10	1,20	0,20	16,89	47,69
174	1,35	0,07	4,80	49,00
114	1,41	0,01	0,60	50,00
227	1,34	0,03	2,00	50,00
219	1,43	0,16	11,00	53,00
230	1,43	0,02	1,40	54,00
130-D10	1,29	0,02	1,49	54,10
648	1,23	0,01	0,71	54,28
83	1,38	0,03	2,03	54,97
15	1,31	0,06	4,62	55,00
158	1,46	0,18	12,40	55,00
40	1,50	0,02	1,32	59,52
224	1,61	0,08	4,70	60,00
139	1,63	0,09	5,50	61,00
167	1,69	0,18	10,40	61,00
193	1,71	0,19	11,40	61,00
132-D7	1,55	0,00	0,28	61,64
647	1,41	0,01	0,58	62,51
242-28/08	1,18	0,01	0,68	64,37
139-D5	1,54	0,06	3,79	64,53
126	1,82	0,19	10,20	65,00
150	1,80	0,24	13,10	65,00
141	1,83	0,16	8,60	66,00
194	1,77	0,05	3,00	66,00
39	1,66	0,04	2,60	66,00
128-D10	1,67	0,11	6,40	66,47
643	1,51	0,01	0,78	66,88
214	1,82	0,11	6,20	68,00
183	1,93	0,13	6,90	69,00
123-D3	1,69	0,05	3,23	70,80
101-D7	1,79	0,17	9,43	71,24
651	1,62	0,06	3,62	71,73
117	2,01	0,06	2,80	72,00
187-D10	1,95	0,00	0,07	77,64
640	1,81	0,06	3,37	80,31
126-D10	2,04	0,03	1,43	81,36
144	2,32	0,20	8,80	83,00
Marcão	2,15			83,01
649	1,91	0,02	0,84	84,57
161	2,29	0,01	0,30	85,00
164	2,33	0,07	3,00	87,00
144-D3	2,19	0,05	2,08	87,08
65-D7	2,11	0,03	1,63	88,71
132	2,57	0,16	6,20	92,00
180	2,49	0,03	1,20	93,00
220	2,51	0,11	4,30	94,00

119	2,64	0,10	3,80	95,00
212	2,55	0,10	3,70	95,00
206	2,58	0,22	8,60	96,00
115	2,72	0,12	4,50	98,00
645	2,24	0,08	3,39	99,10
118	2,90	0,20	6,80	104,00
HC053	2,26	0,09	4,02	99,85
HC053	2,23	0,07	2,94	99,91
HC053	2,51	0,03	1,26	99,95
HC053	2,27	0,18	7,82	100,00
HC053	2,59			100,00
HC053	2,79	0,17	6,20	100,00
HC053	2,68	0,12	4,40	100,00
HC053	2,43	0,03	1,40	100,01
HC053	2,52	0,07	2,70	100,02
HC053	2,43	0,16	6,77	100,07
HC053	2,37	0,04	1,87	100,09

ANEXO 2 – DADOS BRUTOS VALIDAÇÃO CONTROLE PRÉ-PANDÊMICOS

Casos negativos	média OD450	Desvio Padrão	% desvio	% HC053
2382	0,45	0,01	1,42	18,5
2381	0,41	0,01	2,58	16,8
2271	0,32	0,01	3,32	14,2
2276	0,32	0,01	4,77	13,4
2348	0,30	0,00	1,14	12,5
2386	0,30	0,02	5,44	12,5
2366	0,29	0,03	11,56	12,3
25	0,31	0,00	0,68	12,0
2349	0,29	0,04	14,37	12,0
2375	0,28	0,03	10,21	12,0
2349	0,29	0,01	3,55	11,7
2348	0,29	0,03	9,84	11,7
2306	0,28	0,05	17,51	11,6
2374	0,27	0,04	13,96	11,5
2252	0,27	0,03	10,87	11,4
2350	0,27	0,02	7,02	11,2
12	0,29	0,02	6,40	11,0
2360	0,26	0,05	20,64	11,0
2277	0,24	0,02	8,80	10,9
2302	0,24	0,01	5,45	10,8
2395	0,26	0,01	4,08	10,8
2250	0,25	0,05	20,41	10,4
2372	0,24	0,01	3,82	10,0
9	0,27	0,03	12,24	10,0
24	0,29	0,01	2,34	10,0
2251	0,24	0,01	3,02	10,0
2281	0,24	0,01	3,77	9,7
2347	0,24	0,01	3,27	9,7
2358	0,23	0,03	11,00	9,6
2408	0,23	0,00	1,93	9,5
2368	0,22	0,06	26,81	9,4
2385	0,23	0,02	10,10	9,3
11	0,24	0,00	1,30	9,0
13	0,26	0,01	4,72	9,0
16	0,25	0,02	5,92	9,0
17	0,24	0,02	7,16	9,0
19	0,25	0,02	9,10	9,0
20	0,25	0,03	10,44	9,0
40	0,25	0,01	3,65	9,0
2415	0,22	0,02	8,08	9,0
18	0,21	0,00	2,56	8,9
2353	0,21	0,03	12,68	8,9
2351	0,22	0,02	10,83	8,9

2350	0,22	0,02	7,37	8,8
2377	0,21	0,01	2,97	8,8
2402	0,21	0,01	5,89	8,8
2351	0,21	0,04	19,79	8,7
2393	0,21	0,00	2,36	8,5
2261	0,19	0,00	2,52	8,4
2407	0,21	0,00	0,55	8,4
2262	0,19	0,00	1,67	8,4
2416	0,20	0,01	4,40	8,4
2420	0,20	0,02	8,41	8,4
2369	0,20	0,02	11,80	8,4
2289	0,20	0,02	9,81	8,3
2293	0,18	0,01	6,06	8,2
2352	0,19	0,01	7,21	8,1
2388	0,20	0,00	0,00	8,1
2414	0,20	0,01	4,22	8,1
2	0,22	0,01	4,98	8,0
3	0,23	0,00	1,09	8,0
10	0,21	0,01	3,90	8,0
18	0,23	0,00	1,51	8,0
22	0,21	0,00	1,63	8,0
23	0,22	0,03	12,97	8,0
31	0,22	0,01	3,93	8,0
38	0,20	0,01	5,61	8,0
41	0,21	0,00	1,19	8,0
43	0,22	0,01	4,98	8,0
2324	0,19	0,01	4,20	8,0
2403	0,19	0,01	7,77	7,7
2322	0,19	0,01	4,55	7,7
2364	0,18	0,02	13,02	7,7
2363	0,18	0,03	15,50	7,7
2394	0,19	0,01	6,10	7,7
2361	0,139	0,006	4,621	7,6
2405	0,18	0,01	4,90	7,5
2357	0,18	0,02	10,20	7,5
2391	0,18	0,00	0,31	7,4
2294	0,17	0,01	7,06	7,4
2417	0,18	0,00	2,37	7,4
2390	0,18	0,01	7,81	7,3
2308	0,18	0,02	11,95	7,3
2257	0,18	0,00	1,57	7,2
2383	0,18	0,01	2,90	7,2
2345	0,18	0,01	6,42	7,2
2400	0,17	0,01	4,50	7,2
2335	0,18	0,01	4,41	7,2
2413	0,17	0,01	3,39	7,1

2278	0,17	0,00	2,67	7,1
2283	0,17	0,00	2,19	7,1
2359	0,17	0,00	2,11	7,0
2307	0,17	0,25	147,88	7,0
2274	0,17	0,01	5,61	7,0
1	0,21	0,02	7,94	7,0
4	0,19	0,01	3,75	7,0
7	0,20	0,01	5,49	7,0
14	0,20	0,01	6,80	7,0
21	0,19	0,01	5,48	7,0
27	0,19	0,01	3,90	7,0
2279	0,17	0,02	12,07	7,0
2422	0,17	0,00	1,67	7,0
2411	0,17	0,00	2,40	6,9
2300	0,15	0,02	13,64	6,9
2365	0,16	0,03	17,84	6,8
2275	0,16	0,02	11,60	6,8
2419	0,16	0,00	1,29	6,7
2424	0,16	0,00	0,61	6,7
2290	0,16	0,04	22,44	6,7
2291	0,15	0,01	3,73	6,6
2264	0,15	0,01	5,81	6,6
2249	0,16	0,01	4,05	6,6
2285	0,16	0,01	5,59	6,6
2313	0,16	0,00	2,40	6,6
2276	0,16	0,01	4,85	6,5
2399	0,16	0,00	3,03	6,5
2389	0,16	0,00	2,99	6,4
2370	0,15	0,01	8,62	6,4
2352	0,16	0,01	8,08	6,4
2410	0,15	0,01	9,42	6,4
2373	0,15	0,02	10,81	6,4
2396	0,15	0,01	3,89	6,4
2376	0,15	0,00	1,97	6,3
17	0,15	0,01	5,77	6,3
2260	0,14	0,01	7,36	6,3
2305	0,15	0,07	43,28	6,3
2298	0,14	0,00	1,98	6,2
2311	0,15	0,00	1,87	6,2
2254	0,16			6,2
2255	0,16			6,2
2325	0,15	0,02	14,81	6,1
2287	0,15	0,02	10,39	6,1
5	0,16	0,01	7,35	6,0
8	0,17	0,01	5,20	6,0
26	0,15	0,01	5,00	6,0

28	0,15	0,03	17,09	6,0
29	0,16	0,03	15,67	6,0
30	0,17	0,01	4,87	6,0
35	0,17	0,01	3,78	6,0
36	0,15	0,00	1,28	6,0
39	0,15	0,00	2,55	6,0
2299	0,13	0,00	2,06	6,0
2323	0,14	0,01	4,31	5,9
2353	0,15	0,01	3,78	5,9
2256	0,13	0,00	1,08	5,8
2265	0,13	0,01	8,24	5,7
2321	0,14	0,03	18,54	5,7
2269	0,14	0,03	21,26	5,6
19	0,13	0,00	3,31	5,6
2339	0,14	0,01	3,82	5,5
2343	0,14	0,00	0,05	5,5
2326	0,13	0,00	2,17	5,4
2344	0,13	0,00	2,05	5,4
2310	0,13	0,00	0,22	5,3
2425	0,13	0,01	10,59	5,3
2337	0,13	0,01	4,93	5,2
2263	0,12	0,01	4,53	5,2
2320	0,13	0,04	30,33	5,2
2371	0,12	0,01	6,35	5,1
2282	0,12	0,02	15,66	5,1
2296	0,11	0,02	16,75	5,0
2288	0,12	0,01	8,54	5,0
2268	0,12	0,01	10,70	5,0
6	0,13	0,01	8,99	5,0
34	0,14	0,00	3,25	5,0
37	0,14	0,00	2,30	5,0
42	0,14	0,00	3,13	5,0
2295	0,11	0,00	1,71	5,0
2392	0,12	0,00	0,58	5,0
2270	0,12	0,00	3,50	4,9
2421	0,12	0,01	5,95	4,9
2266	0,11	0,01	5,51	4,9
20	0,11	0,01	10,19	4,8
2272	0,11	0,00	2,75	4,7
2267	0,11	0,00	0,82	4,6
2257	0,10	0,01	5,28	4,6
2354	0,11	0,01	8,77	4,6
2384	0,11	0,00	4,07	4,5
2314	0,11	0,01	10,23	4,5
2398	0,11	0,00	0,65	4,5
2356	0,11	0,01	11,27	4,4

2418	0,11	0,00	3,89	4,4
2397	0,11	0,00	3,25	4,4
2273	0,10	0,01	7,73	4,4
2332	0,11	0,00	2,13	4,4
2304	0,10	0,01	14,22	4,3
2367	0,10	0,01	10,27	4,3
2319	0,10	0,03	25,47	4,3
2330	0,10	0,01	5,67	4,2
2303	0,10	0,04	36,38	4,2
2401	0,10	0,00	1,18	4,2
2312	0,10	0,01	12,97	4,2
2258	0,09	0,02	26,64	4,0
2297	0,09	0,00	1,81	4,0
15	0,12	0,01	10,68	4,0
33	0,11	0,01	4,91	4,0
44	0,12	0,01	3,89	4,0
2343	0,10	0,01	11,20	4,0
2347	0,10	0,01	8,24	4,0
2286	0,09	0,00	2,77	3,8
2309	0,09	0,00	3,19	3,6
2327	0,09	0,00	0,08	3,6
2346	0,09	0,00	4,11	3,6
2406	0,09	0,00	3,07	3,6
2345	0,09	0,00	2,67	3,6
Branco sem soro	0,08	0,01	10,25	3,6
2333	0,09	0,00	4,83	3,6
2301	0,08	0,00	0,99	3,5
2340	0,09	0,00	3,05	3,4
2331	0,08	0,00	2,78	3,4
2292	0,07	0,01	9,61	3,3
2412	0,08	0,00	1,06	3,3
2328	0,08	0,00	1,16	3,3
2346	0,08	0,00	1,47	3,3
2336	0,08	0,00	2,62	3,1
2362	0,07	0,01	11,27	3,0
32	0,09	0,00	3,78	3,0
2344	0,07	0,01	13,70	3,0
2341	0,07	0,00	2,68	2,9
Branco sem soro	0,07	0,01	9,21	2,9
2334	0,07	0,00	3,05	2,8
2387	0,07	0,01	9,89	2,7
Branco sem soro	0,06	0,00	1,20	2,6
Branco sem soro	0,06	0,01	17,06	2,6
2342	0,06	0,00	7,98	2,5
Branco sem soro	0,06	0,00	2,13	2,4
Branco sem soro	0,06	0,00	3,23	2,3

Branco sem soro	0,05	0,00	5,60	2,2
Branco sem soro	0,05	0,00	1,06	2,1

ANEXO 3 – ARTIGO PUBLICADO EM REVISTA PRÉ-PRINT MEDRXIV

Antigen production and development of an indirect ELISA based on the nucleocapsid protein to detect human SARS-CoV-2 seroconversion

Marcelo S. Conzentino¹, Karl Forchhammer², Emanuel M Souza³, Fábio O. Pedrosa³, Meri B. Nogueira⁴, Sônia M. Raboni⁴, Fabiane G. M. Rego⁵, Dalila L. Zanette⁶, Mateus N. Aoki⁶, Jeanine M. Nardin⁷, Bruna Fornazari⁷, Hugo M. P. Morales⁷, Paola A. F. Celedon⁸, Carla V. P. Lima⁸, Sibelle B. Mattar⁸, Vanessa H. Lin⁸, Luis G. Morello^{6,8}, Fabricio K. Marchini^{6,8}, Lucas Bochnia Bueno⁹, Rodrigo A. Reis¹ and Luciano F. Huergo^{1*}

From the: ¹Setor Litoral, UFPR Matinhos, PR, Brazil; ²Interfakultäres Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin der Eberhard-Karls Universität Tübingen, Germany; ³Biochemistry and Molecular Biology Department, UFPR Curitiba, PR, Brazil; ⁴Complexo Hospital das Clínicas, UFPR Curitiba, PR, Brazil; ⁵Post-Graduation Program in Pharmaceutical Sciences, UFPR, Curitiba, PR, Brazil; ⁶ Instituto Carlos Chagas – FioCruz, PR, Brazil; ⁷Hospital Erasto Gaertner, Curitiba, PR, Brazil; ⁸Instituto de Biologia Molecular do Paraná, IBMP, Curitiba, PR, Brazil. ⁹Microbiology, Parasitology and Pathology Post Graduate Program, UFPR, Curitiba, PR, Brazil.

* To whom correspondence should be addressed: Luciano F. Huergo, Tel: +55 41 996765856, E-mail: luciano.huergo@gmail.com

Key words: SARS-CoV-2; COVID-19; immunological test; ELISA; Nucleocapsid protein

NOTE: This preprint reports new research that has not been certified by peer review and should not be used to guide clinical practice.

ABSTRACT

Serological assays are important tools to identify previous exposure to SARS-CoV-2, helping to track COVID-19 cases and determine the level of humoral response to SARS-CoV-2 infections and/or immunization to future vaccines. Here the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein was expressed in

Escherichia coli and purified to homogeneity and high yield using a single chromatography step. The purified SARS-CoV-2 nucleocapsid protein was used to develop an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of human SARS-CoV-2

seroconverts. The assay sensitivity and specificity were determined analyzing sera from 140 PCRconfirmed COVID-19 cases and 210 pre-pandemic controls. The assay operated with 90% sensitivity and 98% specificity; identical accuracies were obtained in head-to-head comparison with a commercial ELISA kit. Antigen coated plates were stable for up to 3 months at 4°C). The ELISA method described is ready to mass production and will be an additional toll to track COVID-19 cases.

INTRODUCTION

In December 2019, health authorities in Wuhan, China, reported cases of patients with pneumonia of unknown epidemiological causes, linked to a seafood/animal market. The pathogen in these cases has been identified, through viral isolation, electron microscopy and RNA sequencing, as a new beta-coronavirus called SARS-CoV-2 (Zhu *et al.*, 2020). Shortly after its emergence in China, SARS-CoV-2 spread rapidly across the world. According to the John Hopkins University website (<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>), on 01/02/2021, more than 100 million cases of COVID-19 have been registered worldwide and the disease was responsible for 2,236,000 deaths.

Serological assays are important for epidemiological surveillance studies to monitor COVID-19 cases (Petherick, 2020). The structural Nucleocapsid (N) protein is known to be a major antigen of coronavirus producing a strong humoral response in humans (Cheng *et al.*, 2007). Furthermore, the SARS-CoV-2 Nucleocapsid protein can be used as antigen to detect COVID-19 cases without significant cross-reactivity with common cold coronavirus (den Hartog *et al.*, 2020). Here we describe the develop an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) which allowed accurate detection human anti- IgG SARS-CoV-2 seroconversion.

RESULTS AND DISCUSSION

A codon optimized synthetic gene was obtained and cloned into the pET28a vector to allow the expression of an N-terminal 6xHis tagged SARS-CoV-2 N protein in *Escherichia coli* BL21 (λDE3) (Huergo *et al.*, 2020; F. Huergo *et al.*, 2021). The viral protein was highly expressed and remained partially soluble in *E. coli* cell extracts (Fig. 1A). The protein was purified using a 5 ml His-trap affinity column (Cytiva) followed by elution with an imidazole gradient. The His-tagged SARS-CoV-2 N protein eluted at 300 mM of imidazole to apparent homogeneity on Coomassie stained SDS-PAGE (Fig. 1A). Typical protein yield was 8 mg per 100 ml of culture, the antigen was stored for up to 4 months at -20°C.

The purified N protein was diluted in buffer and used to coat 96 well polystyrene plates overnight at 4°C. Plates were blocked with skimmed milk and serum from a COVID-19 positive case and a negative control serum were serial diluted and placed into the wells of pre-coated plates. The presence of IgG reacting with the SARS-CoV-2 N protein was revealed by incubating with secondary anti-human IgG -HRP followed by chromogenic substrate TMB. The COVID-19 positive serum showed strong reaction with the N protein even at high dilutions (Fig. 1B). On the other hand, the negative control serum showed only minor background cross reaction in low dilutions (Fig. 2A). The OD450nm

response vs serum dilution of the positive serum was linear between the 1,600 to 25,600 dilutions with $R^2 = 0.995$ (Fig. 1C). This positive serum was used as a positive control throughout this study, the inter assay CV% was 7.2% (same sample run in 12 different plates in duplicate). The mean intra assay CV% was 7.6% (mean CV% was obtained from duplicate 96 samples x 12 plates).

Material and Methods

EXPRESSION AND PURIFICATION OF RECOMBINANT SARS-CoV-2 NUCLEOCAPSID PROTEIN (N-PROTEIN)

A codon optimized synthetic gene expressing the full-length SARS-CoV-2 N-protein (Uniprot QHD43423.2) was obtained and cloned into pET28a by General Biosystems (F. Huergo *et al.*, 2021). This plasmid was named pLHSarsCoV2-N and transformed into *E. coli* BL21 (λ DE3) enabling the expression of N-terminal His-tagged N-protein after induction with IPTG. The cells were grown in 100 ml LB medium at 120 rpm at 37°C to OD_{600nm} of 0.4. The incubator temperature was lowered to 16°C, after 30 min, IPTG was added to a final concentration 0.3 mM and the culture was kept at 120 rpm at 16°C over/night. Cells were collected by centrifugation at 3,000 xg for 5 min. The cell pellet was resuspended in 20 ml of buffer 1 (Tris-HCl pH 8 50 mM, KCl 100 mM, glycerol 10%). Cells were disrupted by sonication on an ice bath. The soluble fraction was recovered after centrifugation at 20,000 xg for 20 minutes and loaded onto a 5 ml HisTrap column (Cytiva), which had been previously equilibrated with buffer 1. The column was washed with 10 ml of buffer 1 and bound proteins were eluted with buffer 1 containing increasing concentrations of imidazole. The His-tagged N-protein eluted at 300 mM imidazole. The final protein preparation yield was \approx 8 mg and was homogeneous as judged by SDS-PAGE analysis. The purified protein was stored in aliquots at 4°C for one week or at -20°C for up to four months.

HUMAN SAMPLES

Samples were collected at the Hospital de Clínicas (CHC/UFPR), Hospital Erasto Gaertner, Hospital do Trabalhador and Secretária Municipal de Saúde de Guaratuba. Samples for serological analysis comprised both serum and plasma-EDTA. COVID-19 positive cases were confirmed by the detection of SARS-CoV-2 RNA by real-time RT-PCR from nasopharyngeal sample swabs. The time point of sampling of serum ranged from 1 to 70 days after onset of symptoms. The cohort of 210 negative controls consisted of pre pandemic samples. The Institutional Ethics Review Board of CHC/UFPR (n# 30578620.7.0000.0008), CEP/HEG (n# 31592620.4.1001.0098) and (CEP/HT n# 31650020.5.0000.5225) approved this study.

ELISA ASSAYS

The purified SARS-CoV-2 N-protein was diluted to 2 ng/ μ l in 50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM KCl, 10% (v/v) glycerol and 0.1 ml aliquots were transferred to the wells of ELISA plates (Olen) and incubated overnight at 4°C. Unbound excess protein was removed, and wells were washed twice with 0.2 ml of 1x TBST buffer pH 7.6 (Tris 2.42 g.l⁻¹, NaCl 8 g.l⁻¹ and tween 80 0.1% v/v). Wells were blocked

with 0.2 ml 3% (w/v) skimmed milk in 1x TBST overnight at 4°C. The serum was diluted at 1:1,000 in 1x TBST containing 1% (w/v) skimmed milk and 0.1 ml were loaded onto the ELISA duplicate wells following by incubation at room temperature for 1 hour. The wells were washed three times with 0.2 ml of 1x TBST followed by incubation with 0.1 ml of antihuman IgG-HRP from goat (Thermo Fisher - cat number 62-8420) diluted 1:3,000 in 1x TBST.

Wells were washed three times with 0.2 ml of 1x TBST. The HRP substrate TMB (Thermo Fisher - cat number 00-2023) was added to the wells (0.1 ml). The reaction was stopped after 10 min incubation at room temperature by addition of 0.1 ml 1M HCl. The plates were put on the top of a white light transilluminator device and photographed. Samples were run in duplicates and data were reported as % of a positive reference serum. The optical density was measured at 450 nm using a TECAN M Nano plate reader (TECAN) monochromator at bandwidth 9 nm and 25 flashes.

The commercial Euroimmun Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG test was used following the manufacturer's instructions.

DATA ANALYSIS

One COVID-19 positive serum was used as a positive control and reference throughout the study. All data were expressed as % of this positive control before applying Receiver Operating Analysis using GraphPad Prism 7.0. Statistical analyses were performed using the *t* test.

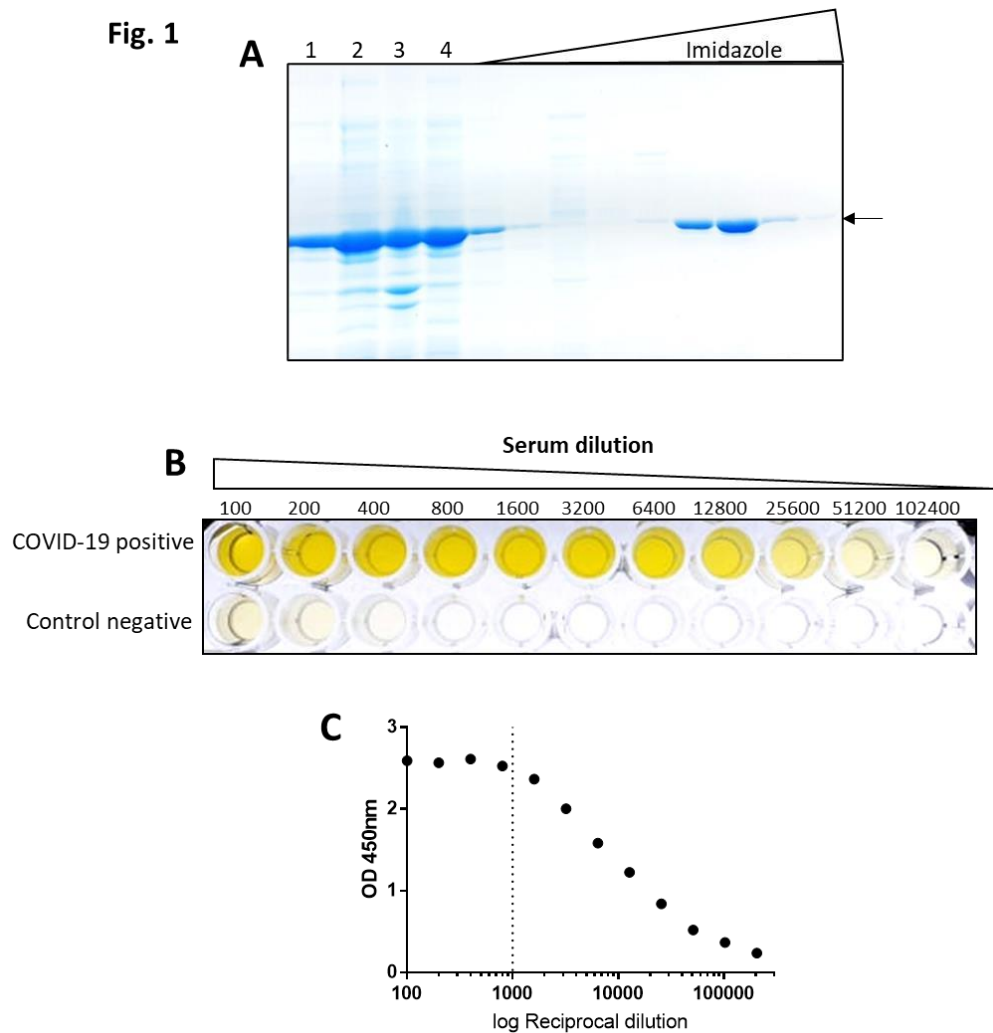


Fig 1. Purification of the SARS-CoV-2 Nucleocapsid protein and serum dilution analysis on ELISA. A) SDS-PAGE analysis of purified His-tagged SARS-CoV-2 N protein. Lane 1, whole cell extract; Lane 2, soluble fraction; Lane 3, insoluble fraction; Lane 4, column flow through; Other lanes, imidazole gradient, the N protein is indicated by an arrow and eluted at 300 mM imidazole. B) The serum from a COVID-19 positive case and from a negative control were serially diluted and analyzed using indirect ELISA, the data were recorded photographically. C) The data derived from the COVID-19 positive case was expressed as OD values vs reciprocal dilution; the dashed line indicates the dilution used during this study.

To validate our ELISA assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans, a cohort consisting of 140 PCR-confirmed COVID-19 cases and 210 pre-pandemic negative controls were used. The pre-pandemic control sera produced only background signal which were clearly distinguished from the PCR-confirmed COVID-19 cases (Fig. 2A). The age of the negative cohort ranged from 21 to 86 years of age (mean = 62). It is likely that most of these subjects had experienced prior infections with common coronaviruses (229E, NL63, OC43, and HKU1) which usually cause mild upper-respiratory tract

disease, like the common cold). These data suggest that our ELISA assay shows negligible cross reactivity for IgG raised against common coronavirus. However, it is worth mentioning that we detected 4 reactive pre-pandemic samples whose signals were above the established cutoff thereby being classified as false positives (Fig. 2A). Such reactivity could be potentially explained by cross reaction with IgG raised against common coronavirus.

The ELISA method operated with an area under the ROC curve of 0.96 (Fig. 2B), the cut off the assay was set at 90% sensitivity and 98% specificity. These values are in the same range for other SARS-CoV-2 immunological IgG testes described previously (Cai *et al.*, 2020; den Hartog *et al.*, 2020; Rikhtegaran Tehrani *et al.*, 2020). It is worth mentioning that among the PCR-confirmed COVID-19 cases, 32 samples were in the early stage of infection (≤ 10 days after PCR detection) and this may explain the low sensitivity. Indeed, if only samples collected ≤ 10 days after PCR detection were considered, the sensitivity dropped to 81%. It is also worth mentioning that 40 samples of the COVID-19 positive cohort were from asymptomatic/mild COVID-19 cases which are known to induce lower humoral response to SARS-CoV-2 infections (Long *et al.*, 2020).

Indeed, our analysis confirmed that the IgG titer was significantly lower in mild versus hospitalized COVID-19 patients (Fig. 2C).

Fig. 2

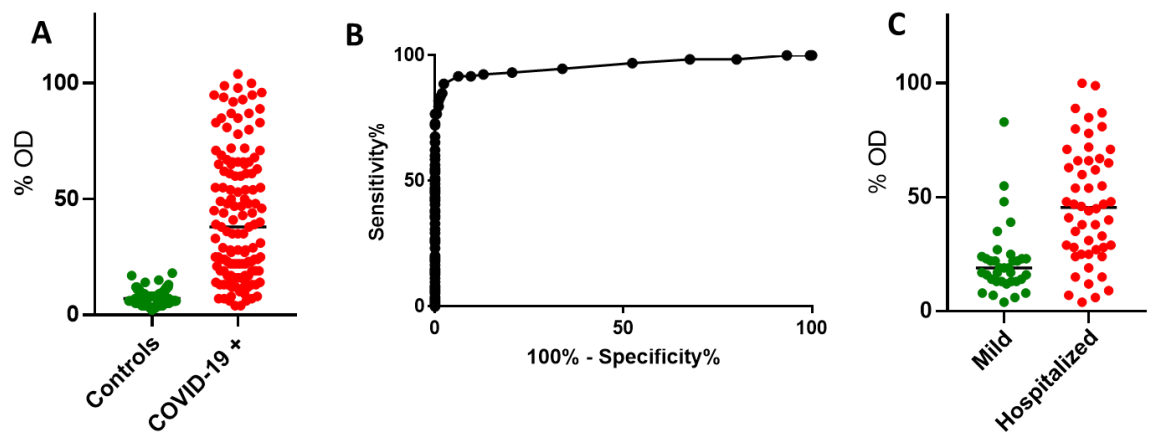


Fig 2. IgG seroconversion response to SARS-CoV-2 infection. A) The OD was expressed as % of reference serum for negative control samples (n=210) and PCR-confirmed COVID-19 cases (n=140). B) Receiver Operating Characteristics analysis (ROC) of the data described in A. C) Comparison between the IgG signal reacting with the SARS-CoV-2 Nucleocapsid protein in Mild and Hospitalized PCR-confirmed COVID-19 cases. Groups were compared using the T test.

A panel of 90 samples was analyzed in parallel by our developed ELISA and the Euroimmun Nucleocapsid-based IgG ELISA. All the 44 pre-pandemic negative samples analyzed were negative in both tests confirming the high specificity of the assays. Out of the 46 PCR confirmed COVID-19 samples, both tests missed 4 samples (false negatives). One sample was negative in both tests and three samples were uniquely negative in each of the two different tests. These data support that our ELISA performed with similar sensitivity to the commercial Euroimmun ELISA test.

In conclusion, here we describe a high yield and simple method to purify the SARS-CoV2 Nucleocapsid antigen using only one simple affinity chromatography step. The antigen preparation was used to develop an indirect ELISA which allowed accurate detection of SARSCoV-2 seroconversion in humans. The developed assay is ready for mass production in order to help to track COVID-19 cases specially in developing countries where access to molecular test is limited.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Alexander von Humboldt foundation and The Federal University of Paraná, Brazil. MC received an undergraduate technological development fellowship from CNPq (PIBIT - UFPR).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Cai, X., Chen, J., li Hu, J.-, Long, Q., Deng, H., Liu, P., *et al.* (2020) A Peptide-Based Magnetic Chemiluminescence Enzyme Immunoassay for Serological Diagnosis of Coronavirus Disease 2019. *J Infect Dis* .
- Cheng, V.C.C., Lau, S.K.P., Woo, P.C.Y., and Kwok, Y.Y. (2007) Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. *Clin Microbiol Rev* .
- F. Huergo, L., A. Selim, K., S. Conzentino, M., C. M. Gerhardt, E., R. S. Santos, A., Wagner, B., *et al.* (2021) Magnetic Bead-Based Immunoassay Allows Rapid, Inexpensive, and Quantitative Detection of Human SARS-CoV-2 Antibodies. *ACS Sensors* **0**.
- Hartog, G. den, Schepp, R.M., Kuijjer, M., GeurtsvanKessel, C., Beek, J. van, Rots, N., *et al.* (2020) SARS-CoV-2–Specific Antibody Detection for Seroepidemiology: A Multiplex Analysis Approach Accounting for Accurate Seroprevalence. *J Infect Dis* .
- Huergo, L.F., Conzentino, M.S., Gerhardt, E.C.M., Santos, A.R.S., Pedrosa, F. de O., Souza, E.M., *et al.* (2020) Magnetic bead-based ELISA allow inexpensive, rapid and quantitative detection of human antibodies against SARS-CoV-2. *medRxiv* .
- Long, Q.X., Tang, X.J., Shi, Q.L., Li, Q., Deng, H.J., Yuan, J., *et al.* (2020) Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med* .
- Petherick, A. (2020) Developing antibody tests for SARS-CoV-2. *Lancet* .

Rikhtegaran Tehrani, Z., Saadat, S., Saleh, E., Ouyang, X., Constantine, N., DeVico, A.L., *et al.* (2020) Specificity and Performance of Nucleocapsid and Spike-based SARS-CoV-2 Serologic Assays. *medRxiv* .

Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., *et al.* (2020) A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* .

ANEXO 4 – MEMORIAIS

INTERAÇÕES CULTURAIS E HUMANÍSTICAS – ICH

As Interações Culturais e Humanísticas ou apenas “ICHs” como são popularmente conhecidas no setor UFPR-Litoral, são espaços reservados na grade curricular que são integrados no Projeto Político Pedagógico de todos os cursos do setor litoral. As ICHs tem como objetivo primordial proporcionar interações de cunho social e humanístico através dos alunos matriculados nos cursos ofertados no setor litoral, tornando uma espaço compartilhado por um grupo diverso envolvendo uma temática central. Ao longo da graduação as ICHs me proporcionaram momentos e aprendizados que com certeza completaram a bagagem de aprendizado adquirida ao longo do curso.

LABORICH (Luciano Fernandes Huergo): Devido as demandas do projeto de pesquisa vinculado a iniciação científica, me inscrevi no ICH Laborich com o intuito de aperfeiçoar e aprender mais sobre as metodologias laboratoriais. Neste ICH aprendemos técnicas de mensuração de massas e volumes. Unidades de medida em química. Introdução a preparo de soluções, medição de pH. Técnicas de espectrofotometria. Técnicas básicas de microbiologia.

BIOQUIMICH (Luciano Fernandes Huergo): Já tendo em mente a área de pesquisa e estudos em que quero me especializar, pedi para meu orientador professor Luciano Huergo que abrisse uma ICH envolvendo a temática de Bioquímica, tendo em vista que a grade curricular do curso não abrange por completo os conceitos dessa disciplina. Neste ICH foram ensinadas os assuntos teóricos que compõem parte da bioquímica como: Química da vida, propriedades de água, ácidos nucleicos, aminoácidos, peptídeos e proteínas, enzimas e cinética enzimática e muito mais, foi enriquecedor.

PANDEMICH (Luciano Fernandes Huergo): Essa ICH foi totalmente centralizada para tratar de assuntos relacionados ao novo coronavírus causador da pandemia de COVID-19. Aprendemos sobre surgimento, estrutura, formas de

transmissão, contágio e prevenção. Métodos de diagnósticos e suas interpretações, vacinas existentes.

O QUE É PATRIMÔNIO CULTURAL? PARANAGUÁ E SEUS BENS CULTURAIS (EDUARDO HARDER): Essa ICH foi realizada no Museu de Arqueologia e Etnologia (MAE/UFPR) no município de Paranaguá. Aprendemos sobre: direitos culturais e os estudos sobre patrimônio cultural. O olhar interdisciplinar e os diferentes campos de conhecimento presentes. A cidade de Paranaguá e seu acervo de bens culturais. O Centro Histórico de Paranaguá e seu tombamento pelo IPHAN e Conselho Estadual de Patrimônio Histórico e Artístico. Educação Patrimonial. Considerações sobre projetos de ação cultural, editais, parcerias e termos de cooperação.

ICH UTOPIAS E DISTOPIAS: A FICÇÃO CIENTÍFICA NO CINEMA (Liliani Tiepolo e Antonio Serbena): A proposta idealizada pelos professores para essa ICH foram refletir sobre diversos aspectos de nossas sociedades por meio de um gênero de filmes conhecido como Ficção Científica. A ideia foi mostrar como questões ambientais, sociais e políticas são retratadas nas distopias e utopias do cinema e associar diversos aspectos com nossas realidades contemporâneas.

PROJETOS DE APRENDIZAGEM

As ideias iniciais de projetos de aprendizagem começaram a surgir quando o professor Luciano Fenandes Huergo me aceitou como seu aluno de Iniciação Científica no Laboratório de Microbiologia Molecular da UFPR-Litoral em qual coordena. Inicialmente desenvolvemos trabalhos com base na identificação taxonômica e caracterização molecular de bactérias do gênero *Streptomyces* de isolados ambientais. Neste projeto, identificamos através do sequenciamento do gene rDNA16s uma bactéria pertencente ao gênero *Streptomyces* que ficou denominada anteriormente por Maria Vanaina como “*Streptomyces S3*”. Ao colonizar essa bactéria em determinados meio de cultura contendo fontes derivados de celulose como fonte de carbono, notamos a capacidade desse microrganismo em produzir enzimas extracelular que catalisam essas moléculas de celulose, essas enzimas são de grande interesse na indústria de biotecnologia já que podem ser aplicadas em múltiplas funcionalidades, incluindo produção de combustíveis de segunda geração. Ao

sequenciar o genoma dessa bactéria a análise confirmou a presença de genes que concedem a degradação de carboidratos como celulose, como considerações finais desse trabalho os dados forneceram suporte adicional de que o *Streptomyces* S3 é adequado para a degradação de polissacarídeos recalcitrantes e uma fonte potencial de enzimas biotecnológicas relevantes, que podem desempenhar um papel importante para o desenvolvimento sustentável.

Já no ano de 2020 com o decreto imposto pela Organização Mundial da Saúde de pandemia mundial causado por um novo coronavírus denominado SARS-CoV-2, houve a demanda gigantesca por produção de insumos para a detecção da passagem do novo coronavírus no corpo humano. Desta maneira, com os conhecimentos do professor Luciano Huergo em bioquímica de proteínas, foi possível produzir proteínas recombinantes do SARS-CoV-2 no laboratório para a produção de diagnósticos imunológicos. Como andamento desse projeto desenvolvemos um Ensaio de Imunoabsorção Enzimática Indireto que resultou no meu trabalho de conclusão de curso, e desenvolvemos um teste rápido para a detecção de anticorpos IgG contra SARS-CoV-2 que não havia sido descrito na literatura até o momento, os dados desse novo método de detecção foram publicados na revista Internacional Qualis A1 "ACS SENSORS" com o título de "Magnetic Bead-Based Immunoassay Allows Rapid, Inexpensive, and Quantitative Detection of Human SARS-CoV-2 Antibodies".

